

## B.66 STTA-IN-VITRO-ASSAYS ZUM NACHWEIS VON ÖSTROGENREZEPTOR-AGONISTEN UND ANTAGONISTEN <sup>23</sup>

Die vollständige Beschreibung dieser Prüfmethode wurde gestrichen.

Die gleichwertige internationale Prüfmethode ist in Teil 0 [Tabelle 2](#) aufgeführt.

Auzug aus: Verordnung (EU) 2019/1390 der Kommission vom 31. Juli 2019 zur Änderung - zwecks Anpassung an den technischen Fortschritt - des Anhangs der Verordnung (EG) Nr. 440/2008 zur Festlegung von Prüfmethoden gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH)

### ALLGEMEINE EINLEITUNG

#### Leistungsbezogene OECD-Prüfrichtlinie

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 455 (2016). TG 455 ist eine PBTG (Performance-Based Test Guideline = leistungsbezogene Prüfrichtlinie), die die Methode der STTA-*in-vitro*-Assays (Stably Transfected Transactivation = Transaktivierung durch stabile Transfektion) zum Nachweis von Östrogenrezeptor-Agonisten und -Antagonisten (Estrogen Receptor (ER) Agonists and Antagonists) (ER-TA-Assays) beschreibt. Sie umfasst mehrere mechanisch und funktionell ähnliche Prüfmethoden zum Nachweis von Östrogenrezeptor-(oder ER $\alpha$ - und/oder ER $\beta$ -)Agonisten und -Antagonisten und sollte die Entwicklung neuer ähnlicher oder modifizierter Prüfmethoden nach den Validierungsgrundsätzen im OECD Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment erleichtern (1). Die folgenden vollständig validierten Referenzprüfmethode (Anlagen 2 und 3) sind Grundlage dieser PBTG:

— Der STTA-Assay (2) unter Verwendung der (h) ER $\alpha$ -HeLa-9903-Zelllinie und

— der VM7Luc-ER-TA-Assay (3) unter Verwendung der VM7Luc4E2-Zelllinie, <sup>(1)</sup> mit dem in erster Linie hER $\alpha$  sowie in beschränktem Umfang hER $\beta$ (4) (5) exprimiert wird.

Zur Entwicklung und Validierung ähnlicher Assays für denselben Gefahren-Endpunkt sollten die verfügbaren Leistungsstandards (PS) (6) (7) verwendet werden. Sie ermöglichen eine frühzeitige Änderung der PBTG 455 zur Aufnahme neuer ähnlicher Assays in eine aktualisierte Fassung der PBTG; ähnliche Assays werden jedoch erst dann aufgenommen, wenn sie von der OECD geprüft wurden und von der OECD bestätigt wurde, dass die Leistungsstandards erfüllt werden. Die in TG 455 aufgenommenen Assays erfüllen die Anforderungen der OECD-Mitgliedstaaten an Prüfergebnisse bei Östrogenrezeptor-Transaktivierungen alle gleichermaßen und ermöglichen die gegenseitige Anerkennung der Daten gemäß dem OECD-Übereinkommen.

#### Hintergrund und Grundsätze der in diese Prüfmethode aufgenommenen Assays

2. Die OECD leitete 1998 mit hoher Priorität die Überarbeitung bestehender Prüfrichtlinien für Screening-Prüfungen und Untersuchungen potenziell endokriner Disruptoren und die Entwicklung neuer Prüfrichtlinien ein. Der „OECD Conceptual Framework (CF) for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals“ wurde 2012 überarbeitet. Die ursprünglichen und überarbeiteten CFs wurden dem OECD Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (8) als Anhänge beigefügt. Der CF umfasst fünf Ebenen mit jeweils eigener biologischer Komplexität. Die in dieser Prüfmethode beschriebenen ER-TA-Assays (ER-TA = Estrogen Receptor Agonists and Antagonists Transactivation) sind Ebene 2 (*In-vitro*-Assays zur Ermittlung von Daten über ausgewählte endokrine Mechanismen/Wirkungspfade) zuzuordnen. Diese Prüfmethode wurde für *In-vitro*-Transaktivierungs-Assays (TA-Assays) zur Ermittlung von Östrogenrezeptor-Agonisten und -Antagonisten (ER-Agonisten und -Antagonisten) entwickelt.
3. Das Zusammenwirken von Östrogenen mit ER kann die Transkription von Genen beeinträchtigen, die durch Östrogene gesteuert werden. Dadurch können Zellprozesse ausgelöst oder gehemmt werden (u. a. für die Zellproliferation, für die normale fetale Entwicklung und für die Reproduktion erforderliche Prozesse) (9) (10) (11). Störungen normaler östrogenen Systeme können Beeinträchtigungen der normalen Entwicklung (Ontogenese), der reproduktiven Gesundheit und des Reproduktionssystems auslösen.
4. *In-vitro*-TA-Assays beruhen auf einer mittelbaren oder unmittelbaren Wechselwirkung der Stoffe mit einem spezifischen Rezeptor, der die Transkription eines Reporter-Genprodukts steuert. Diese Assays wurden in großem Umfang zur Beurteilung der durch spezifische nukleäre Rezeptoren (z. B. ER) gesteuerten Gen-Expression verwendet (12) (13) (14) (15) (16). Sie wurden zur Erkennung einer durch die ER gesteuerten östrogenen Transaktivierung vorgeschlagen (17) (18) (19). Bei nukleären ER sind zumindest die zwei großen Untertypen  $\alpha$  und  $\beta$  zu unterscheiden, die durch verschiedene Gene kodiert werden. Die betreffenden Proteine haben unterschiedliche biologische Funktionen, Gewebeverteilungen und Ligandenbindungsaffinitäten (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). Nukleäre ER $\alpha$  vermitteln die klassische Östrogenreaktion (27) (28) (29) (30). Daher beziehen sich die meisten gegenwärtig zur Messung der

<sup>(1)</sup> Vor Juni 2016 wurde diese Zelllinie als BG1Luc-Zelllinie bezeichnet. BG-1-Zellen wurden ursprünglich von Geisinger u. a. (1998) (35) beschrieben und später von Forschern am National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) charakterisiert (36). Erst vor verhältnismäßig kurzer Zeit wurde entdeckt, dass von BG-1-Zellen zwei Varianten existieren, die von Forschern verwendet werden: BG-1 Fr und BG-1 NIEHS. Eingehende Untersuchungen (u. a. DNA-Tests) der beiden Varianten von BG-1-Zelllinien durch Li u. a. (2014) (37) haben gezeigt, dass die Variante BG-1 Fr eine besondere Zelllinie war und dass die Variante BG-1 NIEHS, d. h. die ursprünglich zur Entwicklung des Assays verwendete Zelllinie, nicht die humane Ovarialkarzinom-Zelllinie BG1, sondern eine Variante der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF7 war. Die in dem Assay verwendete und ursprünglich als BG1Luc4E2 bezeichnete Zelllinie (38) wird nun als VM7Luc4E2 („V“ = Variante; „M7“ = MCF7-Zellen) bezeichnet. Entsprechend wird nun der Assay als VM7Luc-ER-TA-Assay bezeichnet. Die Zelllinien, auf denen der Assay beruht, haben also eine andere Herkunft. Für veröffentlichte Validierungsstudien und für die Verwendbarkeit und den Einsatz dieses Assays zur Untersuchung östrogen/antiöstrogen Chemikalien ist dies jedoch nicht von Bedeutung.

gestrichen - siehe Teil 0

Aktivierung oder Hemmung von ER entwickelten Modelle speziell auf ER $\alpha$ . Die Assays werden zur Ermittlung von Chemikalien verwendet, die nach erfolgter Ligandenbindung die ER aktivieren, was dazu führt, dass der Rezeptor-Ligandenkomplex eine Bindung mit spezifischen DNA-Response-Elementen eingeht und ein Reporter-Gen transaktiviert; dies wiederum bewirkt eine verstärkte zelluläre Expression eines Markerproteins. Für diese Assays können unterschiedliche Reporter-Reaktionen berücksichtigt werden. Bei auf Luciferase basierenden Systemen wandelt das Enzym Luziferase das Luciferinsubstrat in ein biolumineszierendes Produkt um, das mit einem Luminometer einer quantitativen Messung unterzogen werden kann. Weitere Beispiele verbreiteter Reporter-Gene sind fluoreszierende Proteine und das *LacZ*-Gen, das  $\beta$ -Galactosidase kodiert. Dieses Enzym kann das farblose Substrat X-gal (5-Brom-4-chlor-indolyl-galactopyranosid) in ein blaues Produkt umwandeln, das mit einem Spektralfotometer quantitativ bestimmt werden kann. Diese Reporter-Gene können rasch und kostengünstig mit im Handel erhältlichen Test-Kits bewertet werden.

5. In Studien zur Validierung des STTA- und des VM7Luc-TA-Assays wurden die Relevanz und die Zuverlässigkeit im Hinblick auf die vorgesehene Verwendung nachgewiesen (3) (4) (5) (30). Im ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3) werden Leistungsstandards für luminiszenzbasierte ER-TA-Assays mit Brust-Zelllinien berücksichtigt. Diese Leistungsstandards wurden so modifiziert, dass sie sowohl beim STTA- als auch beim VM7Luc-TA-Assay angewendet werden können (2).
6. Die in der vorliegenden Prüfmethode verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

#### **Anwendungsbereich und Begrenzungen bei TA-Assays**

7. Diese Assays werden für Screening- und Priorisierungszwecke vorgeschlagen, können aber auch zu mechanistischen Erkenntnissen führen, die im Rahmen von Beweiskraftermittlungen verwendet werden können. Gegenstand der Assays sind durch TA ausgelöste chemische Bindungen an die ER in einem *In-vitro*-System. Daher sollten Ergebnisse nicht unmittelbar für die komplexen Signal- und Steuerungswirkungen des intakten endokrinen *In-vivo*-Systems extrapoliert werden.
8. Durch ER vermittelte TA gelten als einer der zentralen Mechanismen endokriner Störungen (ED), wenngleich ED auch durch andere Mechanismen hervorgerufen werden können, darunter (i) Wechselwirkungen mit anderen Rezeptoren und Enzymsystemen des endokrinen Systems, (ii) Hormonsynthesen, (iii) Stoffwechselaktivierungen und/oder die Deaktivierung von Hormonen, (iv) die Verteilung von Hormonen an Zielgewebe und (v) die Beseitigung von Hormonen im Körper. Keiner der Assays im Rahmen dieser Prüfmethode hat diese Wirkungsweisen zum Gegenstand.
9. Gegenstand dieser Prüfmethode ist die Fähigkeit von Chemikalien, die ER-gesteuerte Transkription zu aktivieren (d. h. als Agonisten zu wirken) und zu unterdrücken (d. h. als Antagonisten zu fungieren). Einige Chemikalien können je nach Zelltyp sowohl als Agonisten als auch als Antagonisten wirken und sind als selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) bekannt. Chemikalien, für die in diesen Assays negative Ergebnisse ermittelt wurden, könnten einem Assay zur Prüfung der ER-Bindung unterzogen werden, bevor festgestellt wird, dass sie keine Bindung mit dem Rezeptor eingehen. Außerdem geben die Assays wegen der begrenzten Metabolisierung von *In-vitro*-Zellsystemen Aufschluss vermutlich nur über die Aktivität der jeweiligen Ausgangsverbindung. Da bei der Validierung nur einzelne Stoffe verwendet wurden, wurde die Eignung für Prüfgemische nicht untersucht. Dennoch ist die Prüfmethode theoretisch auch für die Prüfung von mehrkomponentigen Stoffen, Stoffen mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexen Reaktionsprodukten oder biologischen Materialien (UVCB) und Gemischen geeignet. Bevor die Prüfmethode bei mehrkomponentigen Stoffen, UVCB oder Gemischen für die Generierung von Daten für einen bestimmten Regulierungszweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob, und falls ja, warum, sie für den beabsichtigten Zweck geeignete Ergebnisse liefert. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs von Rechts wegen vorgeschrieben ist.
10. Tabelle 1 enthält eine Übersicht über die Agonisten-Ergebnisse der 34 Stoffe, die mit den beiden in dieser Prüfmethode beschriebenen vollständig validierten Referenzprüfmethode untersucht wurden. Von diesen Stoffen wurden nach veröffentlichten Berichten (u. a. aufgrund von *In-vitro*-Assays zur Prüfung auf ER-Bindungen und TA und/oder aufgrund des Uterotrophen Bioassays) (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34) 26 Stoffe sicher als ER-Agonisten und 8 als negativ eingestuft. Tabelle 2 enthält eine Übersicht über die Antagonisten-Ergebnisse der 15 Stoffe, die mit den beiden in dieser Prüfmethode beschriebenen vollständig validierten Referenzprüfmethode untersucht wurden. Von diesen Stoffen wurden nach veröffentlichten Berichten (u. a. aufgrund von *In-vitro*-Assays zur Prüfung auf ER-Bindungen und TA) (2) (3) (18) (31) 4 Stoffe sicher/vermutlich als ER-Agonisten und 10 als negativ eingestuft. Nach den in den Tabellen 1 und 2 zusammengefassten Daten ergab sich hinsichtlich der Einstufungen aller Stoffe mit Ausnahme eines Stoffes (Mifepristone) beim Antagonisten-Assay eine 100 %ige Übereinstimmung zwischen den beiden Referenzprüfmethode, und alle Stoffe wurden zutreffend als ER-Agonisten/-Antagonisten bzw. als negativ eingestuft. Ergänzende Informationen über diese Gruppe von Chemikalien sowie über weitere Chemikalien, die im Rahmen der Validierungsstudien mit den STTA- und den VM7Luc-ER-TA-Assays untersucht wurden, sind den Leistungsstandards für die ER-TA (6) (7), Anlage 2 (Tabellen 1, 2 und 3) zu entnehmen.

Tabelle 1  
**Übersicht über die Ergebnisse von STTA- und VM7Luc-ER-TA-Assays bei Stoffen, die in beiden Agonisten-Prüfungen untersucht und als ER-Agonisten (POS) oder als negativ (NEG) eingestuft wurden**

	Stoff	CAS-Nr.	STTA-Assay (1)			VM7Luc-ER-TA-Assay (2)		Datenquelle für die Einstufung (4)		
			ER-TA Aktivität	PC <sub>10</sub> -Wert (M)	PC <sub>50</sub> -Wert (6) (M)	ER-TA-Aktivität	EC <sub>50</sub> -Wert (6), (3) (M)	Sonstige ER-TAs (5)	ER Bindung	Uterotroph
1	17β-Estradiol (4)	50-28-2	POS	< 1,00 × 10 <sup>-11</sup>	< 1,00 × 10 <sup>-11</sup>	POS	5,63 × 10 <sup>-12</sup>	POS (22/22/22)	POS	POS
2	17α-Estradiol (4)	57-91-0	POS	7,24 × 10 <sup>-11</sup>	6,44 × 10 <sup>-10</sup>	POS	1,40 × 10 <sup>-9</sup>	POS (11/11)	POS	POS
3	17α-Ethinylestradiol (4)	57-63-6	POS	< 1,00 × 10 <sup>-11</sup>	< 1,00 × 10 <sup>-11</sup>	POS	7,31 × 10 <sup>-12</sup>	POS (22/22)	POS	POS
4	17β-Trenbolon	10161-33-8	POS	1,78 × 10 <sup>-8</sup>	2,73 × 10 <sup>-7</sup>	POS	4,20 × 10 <sup>-8</sup>	POS (2/2)	NT	NT
5	19-Nortestosteron (3)	434-22-0	POS	9,64 × 10 <sup>-9</sup>	2,71 × 10 <sup>-7</sup>	POS	1,80 × 10 <sup>-6</sup>	POS (4/4)	POS	POS
6	4-Cumylphenol (4)	599-64-4	POS	1,49 × 10 <sup>-7</sup>	1,60 × 10 <sup>-6</sup>	POS	3,20 × 10 <sup>-7</sup>	POS (5/5)	POS	NT
7	4-tert-Octylphenol (3)	140-66-9	POS	1,85 × 10 <sup>-9</sup>	7,37 × 10 <sup>-8</sup>	POS	3,19 × 10 <sup>-8</sup>	POS (21/24)	POS	POS
8	Apigenin (4)	520-36-5	POS	1,31 × 10 <sup>-7</sup>	5,71 × 10 <sup>-7</sup>	POS	1,60 × 10 <sup>-6</sup>	POS (2/6/26)	POS	NT

gestrichen - siehe Teil 0

	Stoff	CAS-Nr.	STTA-Assay (1)			VM7Luc-ER-TA-Assay (2)		Datenquelle für die Einstufung (4)		
			ER-TA Aktivität	PC <sub>10</sub> -Wert (M)	PC <sub>50</sub> -Wert (6) (M)	ER-TA-Aktivität	EC <sub>50</sub> -Wert (6), (7) (M)	Sonstige ER-TAs (6)	ER Bindung	Uterotroph
9	Atrazin (4)	1912-24-9	NEG	—	—	NEG	—	NEG (30/30)	NEG	NT
10	Bisphenol A (4)	80-05-7	POS	2,02 × 10 <sup>-8</sup>	2,94 × 10 <sup>-7</sup>	POS	5,33 × 10 <sup>-7</sup>	POS (65/65)	POS	POS
11	Bisphenol B (4)	77-40-7	POS	2,36 × 10 <sup>-8</sup>	2,11 × 10 <sup>-7</sup>	POS	1,95 × 10 <sup>-7</sup>	POS (6/6)	POS	POS
12	Butylbenzylphthalat (4)	85-68-7	POS	1,14 × 10 <sup>-6</sup>	4,11 × 10 <sup>-6</sup>	POS	1,98 × 10 <sup>-6</sup>	POS (12/14)	POS	NEG
13	Corticosteron (4)	50-22-6	NEG	—	—	NEG	—	NEG (6/6)	NEG	NT
14	Cumestrol (4)	479-13-0	POS	1,23 × 10 <sup>-9</sup>	2,00 × 10 <sup>-8</sup>	POS	1,32 × 10 <sup>-7</sup>	POS (30/30)	POS	NT
15	Daidzein (4)	486-66-8	POS	1,76 × 10 <sup>-8</sup>	1,51 × 10 <sup>-7</sup>	POS	7,95 × 10 <sup>-7</sup>	POS (39/39)	POS	POS
16	Diethylstilbestrol (4)	56-53-1	POS	< 1,00 × 10 <sup>-11</sup>	2,04 × 10 <sup>-11</sup>	POS	3,34 × 10 <sup>-11</sup>	POS (42/42)	POS	NT
17	Di-n-burylphthalat	84-74-2	POS	4,09 × 10 <sup>-6</sup>	—	POS	4,09 × 10 <sup>-6</sup>	POS (6/11)	POS	NEG
18	Ethylparaben	120-47-8	POS	5,00 × 10 <sup>-6</sup>	(ohne PC <sub>50</sub> )	POS	2,48 × 10 <sup>-5</sup>	POS	—	NT
19	Estron (4)	53-16-7	POS	3,02 × 10 <sup>-11</sup>	5,88 × 10 <sup>-10</sup>	POS	2,34 × 10 <sup>-10</sup>	POS (26/28)	POS	POS
20	Genistein (4)	446-72-0	POS	2,24 × 10 <sup>-9</sup>	2,45 × 10 <sup>-8</sup>	POS	2,71 × 10 <sup>-7</sup>	POS (100/102)	POS	POS

	Stoff	CAS-Nr.	STTA-Assay (1)			VM7Luc-ER-TA-Assay (2)		Datenquelle für die Einstufung (4)		
			ER-TA Aktivität	PC <sub>10</sub> -Wert (M)	PC <sub>50</sub> -Wert (b) (M)	ER-TA-Aktivität	EC <sub>50</sub> -Wert (b), (3) (M)	Sonstige ER-TAs (c)	ER Bindung	Uterotroph
21	Haloperidol	52-86-8	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
22	Kaempferol (6)	520-18-3	POS	$1,36 \times 10^{-7}$	$1,21 \times 10^{-6}$	POS	$3,99 \times 10^{-6}$	POS (23/23)	POS	NT
23	Kepon (6)	143-50-0	POS	$7,11 \times 10^{-7}$	$7,68 \times 10^{-6}$	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS (14/18)	POS	NT
24	Ketoconazol	65277-42-1	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT
25	Linuron (6)	330-55-2	NEG	—	—	NEG	—	NEG (8/8)	NEG	NT
26	meso-Hexestrol (6)	84-16-2	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	POS	$1,65 \times 10^{-11}$	POS (4/4)	POS	NT
27	Methyltestosteron (6)	58-18-4	POS	$1,73 \times 10^{-7}$	$4,11 \times 10^{-6}$	POS	$2,68 \times 10^{-6}$	POS (5/6)	POS	NT
28	Morin	480-16-0	POS	$5,43 \times 10^{-7}$	$4,16 \times 10^{-6}$	POS	$2,37 \times 10^{-6}$	POS (2/2)	POS	NT
29	Norethynodrel (6)	68-23-5	POS	$1,11 \times 10^{-11}$	$1,50 \times 10^{-9}$	POS	$9,39 \times 10^{-10}$	POS (5/5)	POS	NT
30	p,p'-Methoxychlor (6)	72-43-5	POS	$1,23 \times 10^{-6}$	(ohne PC <sub>50</sub> ) (b)	POS	$1,92 \times 10^{-6}$	POS (24/27)	POS	POS
31	Phenobarbital (6)	57-30-7	NEG	—	—	NEG	—	NEG (2/2)	NEG	NT

gestrichen - siehe Teil 0

Stoff	CAS-Nr.	STTA-Assay <sup>(1)</sup>			VM7Luc-ER-TA-Assay <sup>(2)</sup>		Datenquelle für die Einstufung <sup>(4)</sup>		
		ER-TA Aktivität	PC <sub>10</sub> -Wert (M)	PC <sub>50</sub> -Wert <sup>(b)</sup> (M)	ER-TA-Aktivität	EC <sub>50</sub> -Wert <sup>(b)</sup> , <sup>(3)</sup> (M)	Sonstige ER-TAs <sup>(c)</sup>	ER Bindung	Uterotroph
32	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	NEG	NEG (4/4)	NEG	NT
33	Spironolacton <sup>(4)</sup>	52-01-7	NEG	—	—	NEG	NEG (4/4)	NEG	NT
34	Testosteron	58-22-0	POS	2,82 × 10 <sup>-8</sup>	9,78 × 10 <sup>-6</sup>	POS	POS (5/10)	POS	NT

Abkürzungen: CAS-NR. = CAS-Registrierungsnummer; M = molar; EC<sub>50</sub> = die Hälfte der maximalen Wirkungskonzentration eines Prüfstoßes; NEG = negativ; POS = positiv; NT = nicht geprüft; PC<sub>10</sub> (und PC<sub>50</sub>) = Konzentration eines Prüfstoßes, bei der die Reaktion 10 % (bzw. 50 % bei PC<sub>50</sub>) der Reaktion entspricht, die auf allen Platten mit der Positivkontrolle (E2, 1 nm) ausgelöst wird.

<sup>(4)</sup> Verbreitete mit dem STTA- und dem VM7Luc-ER-TA-Assay geprüfte Stoffe, die als ER-Agonisten ermittelt oder als negativ eingestuft und in der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (ICCVAM VM7Luc ER TA Evaluation Report, Tabelle 4-1 (3)) zur Bewertung der Genauigkeit verwendet wurden.

<sup>(b)</sup> Die Höchstkonzentration, die dann geprüft wurde, wenn aufgrund einer Zytotoxizität oder einer Unlöslichkeit keine Begrenzungen bestanden, betrug 1 × 10<sup>-5</sup> M (STTA-Assay) bzw. 1 × 10<sup>-3</sup> M (VM7Luc-ER-TA-Assay).

<sup>(c)</sup> Die Zahl in Klammern steht für die Anzahl der Prüfergebnisse, die als positiv (POS) bzw. negativ (NEG) eingestuft wurden, und wird bezogen auf die Gesamtzahl der berücksichtigten Prüfungen angegeben.

<sup>(1)</sup> Angegebene Werte im Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity – The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line (2)

<sup>(2)</sup> ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL<sup>®</sup> ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

<sup>(3)</sup> Die mittleren EC<sub>50</sub>-Werte wurden anhand von Werten berechnet, die die Labors der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (XDS, ECVAM und Hiyoshi) (3) angegeben hatten.

<sup>(4)</sup> Die Einstufung als ER-Agonist oder als negativ beruhte auf Informationen in den ICCVAM Background Review Documents (BRD) zu Assays zur Prüfung der ER-Bindung und zu TA-Assays (31) sowie auf Informationen aus nach Erstellung der ICCVAM BRDs erfolgten und geprüften Veröffentlichungen (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Anmerkungen: Bei den Assays im Rahmen dieser Prüfmethode werden nicht immer dieselben Messungen durchgeführt. Manchmal kann der EC<sub>50</sub>-Wert nicht berechnet werden, weil keine vollständige Dosis-Reaktions-Kurve erzeugt wurde. Beim STTA-Assay ist der PC<sub>10</sub>-Wert ein wichtiger Parameter; in anderen Fällen kann möglicherweise aber auch ein PC<sub>x</sub>-Wert hilfreich sein.

Tabelle 2

Vergleich der Ergebnisse von STTA- und VM7Luc-ER-TA-Assays bei Stoffen, die in beiden Antagonisten-Prüfungen untersucht und als ER-Antagonisten (POS) oder als negativ (NEG) eingestuft wurden

	Stoff <sup>(4)</sup>	CAS-Nr.	ER-STTA-Assay <sup>(1)</sup>		VM7Luc-ER-STTA-Assay <sup>(2)</sup>		Wirkungen Bei ER-STTA-Kandidaten <sup>(4)</sup>	ICCVAM <sup>(2)</sup> -Kontensklassifikation	MeSH <sup>(6)</sup> -Chemikalienklasse	Produktklasse <sup>(7)</sup>
			ER-TA-Aktivität	IC <sub>50</sub> -Wert <sup>(b)</sup> (M)	ER-TA-Aktivität	IC <sub>50</sub> -Wert <sup>(b)</sup> , <sup>(c)</sup> (M)				
1	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	mäßig POS	POS	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
2	Dibenzo(a,h)anthracen	53-70-3	POS	Ohne IC <sub>50</sub>	POS	Ohne IC <sub>50</sub>	POS	PP	Polycyclische Verbindung	Laborchemikalie, Naturprodukt
3	Mifepriston	84371-65-3	POS	$5,61 \times 10^{-6}$	NEG	—	schwach POS	NEG	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis
4	Raloxifen-HCl	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	mäßig POS	POS	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
5	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	POS	POS	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
6	17β-Estradiol	50-28-2	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
7	Apigenin	520-36-5	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Heterocyclische Verbindung	Farbstoff, Naturprodukt, pharmazeutisches Zwischenprodukt

gestrichen - siehe Teil 0

	Stoff <sup>(4)</sup>	CAS-Nr.	ER-STTA-Assay <sup>(1)</sup>		VM7Luc-ER-STTA-Assay <sup>(2)</sup>		Wirkungen Bei ER-STTA-Kandidaten <sup>(4)</sup>	ICCVAM <sup>(5)</sup> -Kon-sensklassifikation	MeSH <sup>(6)</sup> -Chemikalklassenklasse	Produktklasse <sup>(7)</sup>
			ER-TA-Aktivität	IC <sub>50</sub> -Wert <sup>(6)</sup> (M)	ER-TA-Aktivität	IC <sub>50</sub> -Wert <sup>(6)</sup> , <sup>(7)</sup> (M)				
8	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Heterocyclische Verbindung	Herbizid
9	Di-n-burylphthalat	84-74-2	NEG	—	NEG	—	NEG	NEG	Ester, Phthalsäure	Kosmetischer Inhaltsstoff, Industriechemikalie, Weichmacher
10	Fenarimol	60168-88-9	NEG	—	NEG	—	nicht geprüft	PN	Heterocyclische Verbindung, Pyrimidin	Fungizid
11	Flavon	525-82-6	NEG	—	NEG	—	PN	PN	Flavonoid, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt, pharmazeutisches Erzeugnis
12	Flutamid	13311-84-7	NEG	—	NEG	—	NEG	PN	Amid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärsmedizinisches Agens
13	Genistein	446-72-0	NEG	—	NEG	—	PN	NEG	Flavonoid, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt, pharmazeutisches Erzeugnis
14	p-n-Nonylphenol	104-40-5	NEG	—	NEG	—	nicht geprüft	NEG	Phenol	Chemisches Zwischenprodukt

gestrichen - siehe Teil 0



Stoff <sup>(4)</sup>	CAS-Nr.	ER-STTA-Assay <sup>(1)</sup>		VM7Luc-ER-STTA-Assay <sup>(2)</sup>		Wirkungen Bei ER-STTA-Kandidaten <sup>(4)</sup>	ICCVAM <sup>(5)</sup> -Konsensklassifikation	MeSH <sup>(6)</sup> -Chemikalienklasse	Produktklasse <sup>(7)</sup>
		ER-TA-Aktivität	IC <sub>50</sub> -Wert <sup>(b)</sup> (M)	ER-TA-Aktivität	IC <sub>50</sub> -Wert <sup>(b)</sup> , <sup>(2)</sup> (M)				
15	Resveratrol	501-36-0	NEG	—	NEG	PN	NEG	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Naturprodukt

Abkürzungen: CASRN = CAS-Registrierungsnummer; M = molar; IC<sub>50</sub> = die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration eines Prüfstoﬀs; NEG = vermutlich negativ; POS = positiv; PP = vermutlich positiv.

<sup>(a)</sup> Verbreitete mit dem STTA- und dem VM7Luc-ER-TA-Assay geprüfte Stoffe, die als ER-Antagonisten ermittelt oder als negativ eingestuft und in der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays zur Bewertung der Genauigkeit verwendet wurden (2) (3).

<sup>(b)</sup> Die Höchstkonzentration, die dann geprüft wurde, wenn aufgrund einer Zytotoxizität oder einer Unlöslichkeit keine Begrenzungen bestanden, betrug  $1 \times 10^{-3}$  M (STTA-Assay) bzw.  $1 \times 10^{-5}$  M (VM7Luc-ER-TA-Assay).

<sup>(1)</sup> The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2).

<sup>(2)</sup> ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

<sup>(3)</sup> Die mittleren EC<sub>50</sub>-Werte wurden anhand von Werten berechnet, die die Labors der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (XDS, ECVAM und Hiyoshi) (3) angegeben hatten.

<sup>(4)</sup> Aufgrund der angegebenen Wirkungen nach historischen CER1-Daten zum ER-Assay zur Prüfung der Bindewirkung und zum uterotrophen Bioassay sowie nach Informationen aufgrund von Recherchen in oﬀen zugänglicher Literatur (2) vermutete ER-STTA-Aktivität.

<sup>(5)</sup> Die Einstufung als ER-Antagonist oder als negativ beruhte auf Informationen in den ICCVAM Background Review Documents (BRD) zu Assays zur Prüfung der ER-Bindung und zu TA-Assays (31) sowie auf Informationen aus nach Erstellung der ICCVAM BRDs erfolgten und geprüften Veröffentlichungen (2) (3) (18) (31).

<sup>(6)</sup> Die Stoffe wurden nach den Medical Subject Headings (MeSH) der U.S. National Library of Medicine, einem international anerkannten standardisierten Klassifizierungssystem, (siehe <http://www.nlm.nih.gov/mesh>) einer oder mehreren Chemikalienklassen zugeordnet.

<sup>(7)</sup> Die Stoffe wurden nach der Gefährstoﬀ-Datenbank der U.S. National Library of Medicine (siehe <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDb>) einer oder mehreren Produktklassen zugeordnet.

gestrichen - siehe Teil 0

## ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS

**Wesentliche Elemente des Assays**

11. Diese Prüfmethode gilt für Assays unter Verwendung eines stabil transfizierten oder endogenen ER $\alpha$ -Rezeptors und eines stabil transfizierten Reporter-Genprodukts unter Steuerung durch eines oder mehrere Östrogen-Response-Elemente; es können aber auch andere Rezeptoren (z. B. ER $\beta$ ) vorhanden sein. Der Assay beinhaltet die folgenden wesentlichen Elemente:

**Kontrollen**

12. Die Grundlage der vorgeschlagenen gleichzeitigen Referenzstandards für die einzelnen Agonisten- und Antagonisten-Assays sollte erläutert werden. Gegebenenfalls dienen gleichzeitige Kontrollen (Negativ-, Lösungsmittel- und Positivkontrolle) als Anzeichen dafür, dass der Assay unter den Prüfbedingungen funktioniert; außerdem bilden sie eine Grundlage für versuchsübergreifende Vergleiche. In der Regel sind sie Bestandteil der Akzeptanzkriterien für die Versuche (1).

**Standard-Qualitätskontrollverfahren**

13. Die einzelnen Assays sollten Standard-Qualitätskontrollverfahren unterzogen werden, wie jeweils beschrieben, um sicherzustellen, dass die Zelllinie auch nach mehreren Durchgängen stabil bleibt, kein Mycoplasma aufweist (d. h. frei von Bakterienkontaminationen ist) und unverändert in der Lage ist, die erwarteten durch ER vermittelten Reaktionen zu entwickeln. Außerdem sollten die Identität der Zelllinien geprüft und Untersuchungen auf andere Verunreinigungen (z. B. Pilze, Hefen und Viren) vorgenommen werden.

**Nachweis der Eignung des Labors**

14. Vor der Prüfung unbekannter Chemikalien mit einem der Assays dieser Prüfmethode sollte jedes Labor nachweisen, dass es in der Lage ist, den betreffenden Assay durchzuführen. Zum Nachweis seiner Leistungsfähigkeit sollte jedes Labor die 14 Leistungsstoffe in Tabelle 3 für den Agonisten-Assay und die 10 Leistungsstoffe in Tabelle 4 für den Antagonisten-Assay prüfen. Mit dieser Eignungsprüfung wird auch die Empfindlichkeit des Prüfsystems nachgewiesen. Die Liste der Leistungsstoffe ist eine Untergruppe der Referenzstoffe der Leistungsstandards für die ER-TA-Assays (6). Diese Stoffe sind im Handel erhältlich und entsprechen den Chemikalienklassen, bei denen gewöhnlich eine Aktivität von ER-Agonisten bzw. -Antagonisten zu verzeichnen ist. Außerdem zeigen sie ein geeignetes und für ER-Agonisten bzw. -Antagonisten zu erwartendes Wirkungsspektrum (d. h. stark bis schwach) und umfassen auch Negativstoffe. Die Untersuchung der Leistungsstoffe sollte an unterschiedlichen Tagen mindestens zweimal wiederholt werden. Die Leistungsfähigkeit wird durch die ordnungsgemäße Einstufung (positiv/negativ) der einzelnen Leistungsstoffe nachgewiesen. Beim Erlernen der Assays sollte die Eignungsprüfung von jedem einzelnen Labortechniker wiederholt werden. Je nach Zelltyp können sich einige dieser Leistungsstoffe wie selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) verhalten und sowohl als Agonisten als auch als Antagonisten wirken. Die Leistungsstoffe werden in den Tabellen 3 und 4 jedoch nach ihrer bekannten vorwiegenden Aktivität eingestuft, die auch für die Bewertung der Leistungsfähigkeit angenommen werden sollte.

15. Zum Nachweis der Leistungsfähigkeit und zu Qualitätskontrollzwecken sollte jedes Labor Datenbanken mit historischen Daten zu Agonisten und Antagonisten mit Daten zu Referenzstandards (z. B. 17 $\beta$ -Estradiol und Tamoxifen) sowie zu Positiv- und Negativkontrollchemikalien und Lösungsmittelkontrollen (z. B. DMSO) erstellen. Die Datenbank sollte beginnend mit Prüfläufen mit mindestens 10 unabhängigen Agonisten (z. B. 17 $\beta$ -Estradiol) und 10 unabhängigen Antagonisten (z. B. Tamoxifen) erstellt werden. Anschließend sollten die Ergebnisse künftiger Analysen dieser Referenzstandards und Lösungsmittelkontrollen in die Datenbank aufgenommen werden, um die Konsistenz und die Leistungsfähigkeit des im jeweiligen Labor im Laufe der Zeit durchgeführten Bioassays sicherzustellen.

Tabella 3  
**Liste mit (14) Leistungsstoffen für Agonisten-Assays (8)**

Nr. (7)	Stoff	CAS-Nr.	Erwartete Reaktion (1)	STTA-Assay			VM7Luc-ER-TA-Assay		MeSH-Chemikalienklasse (5)	Produktklasse (6)
				PC <sub>10</sub> -Wert (M) (2)	PC <sub>50</sub> -Wert (M) (2)	Prüfkonzentrationsbereich (M)	VM7Luc-EC <sub>50</sub> -Wert (M) (3)	Höchstkonzentration für Vorversuch (M) (4)		
14	Diethylstilbestrol	56-53-1	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,04 \times 10^{-11}$	$10^{-14} - 10^{-8}$	$3,34 \times 10^{-11}$	$3,73 \times 10^{-4}$	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
12	17 $\alpha$ -Estradiol	57-91-0	POS	$4,27 \times 10^{-11}$	$6,44 \times 10^{-10}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-9}$	$3,67 \times 10^{-3}$	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
15	meso-Hexestrol	84-16-2	POS	$< 1,00 \times 10^{-11}$	$2,75 \times 10^{-11}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$1,65 \times 10^{-11}$	$3,70 \times 10^{-3}$	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
11	4-tert-Octylphenol	140-66-9	POS	$1,85 \times 10^{-9}$	$7,37 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$3,19 \times 10^{-8}$	$4,85 \times 10^{-3}$	Phenol	Chemisches Zwischenprodukt
9	Genistein	446-72-0	POS	$2,24 \times 10^{-9}$	$2,45 \times 10^{-8}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$2,71 \times 10^{-7}$	$3,70 \times 10^{-4}$	Flavonoid, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt, pharmazeutisches Erzeugnis
6	Bisphenol A	80-05-7	POS	$2,02 \times 10^{-8}$	$2,94 \times 10^{-7}$	$10^{-11} - 10^{-5}$	$5,33 \times 10^{-7}$	$4,38 \times 10^{-3}$	Phenol	Chemisches Zwischenprodukt

gestrichen - siehe Teil 0

Nr. (7)	Stoff	CAS-Nr.	Erwartete Reaktion (1)	STTA-Assay			VM7Luc-ER-TA-Assay		MeSH-Chemikalienklasse (5)	Produktklasse (6)
				PC <sub>10</sub> -Wert (M) (2)	PC <sub>50</sub> -Wert (M) (2)	Prüfkonzentrationsbereich (M)	VM7Luc-EC <sub>50</sub> -Wert (M) (3)	Höchstkonzentration für Vorversuch (M) (4)		
2	Kaempferol	520-18-3	POS	1,36 × 10 <sup>-7</sup>	1,21 × 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-11</sup> – 10 <sup>-5</sup>	3,99 × 10 <sup>-6</sup>	3,49 × 10 <sup>-3</sup>	Flavonoid, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt
3	Butylbenzylphthalat	85-68-7	POS	1,14 × 10 <sup>-6</sup>	4,11 × 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-11</sup> – 10 <sup>-5</sup>	1,98 × 10 <sup>-6</sup>	3,20 × 10 <sup>-4</sup>	Carboxylsäure, Ester, Phthalsäure	Weichmacher, Industriechemikalie
4	<i>p,p'</i> -Methoxychlor	72-43-5	POS	1,23 × 10 <sup>-6</sup>	—	10 <sup>-11</sup> – 10 <sup>-5</sup>	1,92 × 10 <sup>-6</sup>	2,89 × 10 <sup>-3</sup>	Kohlenwasserstoff (halogeniert)	Pestizid, veterinärmedizinisches Agens
1	Ethylparaben	120-47-8	POS	5,00 × 10 <sup>-6</sup>	—	10 <sup>-11</sup> – 10 <sup>-5</sup>	2,48 × 10 <sup>-5</sup>	6,02 × 10 <sup>-3</sup>	Carboxylsäure, Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, Konservierungsmittel
17	Atrazin	1912-24-9	NEG	—	—	10 <sup>-10</sup> – 10 <sup>-4</sup>	—	4,64 × 10 <sup>-4</sup>	Heterocyclische Verbindung	Herbizid
20	Spirolacton	52-01-7	NEG	—	—	10 <sup>-11</sup> – 10 <sup>-5</sup>	—	2,40 × 10 <sup>-3</sup>	Lacton, Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis

gestrichen - siehe Teil 0

Nr. (7)	Stoff	CAS-Nr.	Erwartete Reaktion (1)	STTA-Assay			VM7Luc-ER-TA-Assay		MeSH-Chemikalienklasse (5)	Produktklasse (6)
				PC <sub>10</sub> -Wert (M) (2)	PC <sub>50</sub> -Wert (M) (2)	Prüfkonzentrationsbereich (M)	VM7Luc-EC <sub>50</sub> -Wert (M) (3)	Höchstkonzentration für Vorversuch (M) (4)		
21	Ketoconazol	65277-42-1	NEG	—	—	10 <sup>-11</sup> – 10 <sup>-5</sup>	—	9,41 × 10 <sup>-5</sup>	Heterocyclische Verbindung	Pharmazeutisches Erzeugnis
22	Reserpin	50-55-5	NEG	—	—	10 <sup>-11</sup> – 10 <sup>-5</sup>	—	1,64 × 10 <sup>-3</sup>	Heterocyclische Verbindung, Indol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärschmedizinisches Agens

Abkürzungen: CAS-NR. = CAS-Registrierungsnummer; EC<sub>50</sub> = die Hälfte der maximalen Wirkungskonzentration eines Prüfstoﬀs; NEG = negativ; POS = positiv; PC<sub>10</sub> (und PC<sub>50</sub>) = Konzentration eines Prüfstoﬀs, bei der die Reaktion 10 % (bzw. 50 % bei PC<sub>50</sub>) der Reaktion entspricht, die auf allen Platten mit der Positivkontrolle (E2, 1 nm) ausgelöst wird.

(1) Die Einstufung der ER-Agonisten-Aktivität als positiv oder als negativ beruhte auf den ICCVAM Background Review Documents (BRD) zu Assays zur Prüfung der ER-Bindung und zu TA-Assays (31) sowie auf empirischen Daten und anderen Informationen aus nach Erstellung der ICCVAM BRDs erfolgten und geprüften Untersuchungen (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

(2) Angegebene Werte im Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-Hela-9903 Cell Line (30).

(3) Die mittleren EC<sub>50</sub>-Werte wurden anhand von Werten berechnet, die die Labors der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (XDS, ECVAM und Hiyoshi) (3) angegeben hatten.

(4) Die angegebenen Konzentrationen waren die höchsten geprüften Konzentrationen (Vorversuch) bei der Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays. Wenn in den Labors unterschiedliche Konzentrationen verwendet wurden, wird die höchste Konzentration angenommen. Siehe Tabelle 4-10 des ICCVAM Test Method Evaluation Report; The LUMI-Cell@ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

(5) Die Stoffe wurden nach den Medical Subject Headings (MeSH) der U.S. National Library of Medicine, einem international anerkannten standardisierten Klassifizierungssystem, (siehe <http://www.nlm.nih.gov/mesh>) einer oder mehreren Chemikalienklassen zugeordnet.

(6) Die Stoffe wurden nach der Gefahrstoﬀ-Datenbank der U.S. National Library of Medicine (siehe <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>) einer oder mehreren Chemikalienklassen zugeordnet.

(7) Aus Tabelle 1 (Liste der Referenzchemikalien (22) zur Beurteilung der Genauigkeit der Prüfung von ER-Agonisten) der Leistungsstandards (6).

(8) Wenn ein Leistungsstoﬀ nicht mehr im Handel erhältlich ist, kann ein Stoﬀ derselben Klassifikation und mit vergleichbarer Wirksamkeit, Wirkungsweise und Klassifizierung verwendet werden.

gestrichen - siehe Teil 0

Tabelle 4  
Liste mit (10) Leistungsstoffen für Antagonisten-Assays

	Stoff <sup>(4)</sup>	CAS-Nr.	ER-STTA-Assay <sup>(1)</sup>			VM7Luc-ER-STTA-Assay <sup>(2)</sup>			Wirkungen Bei ER-STTA <sup>(1)</sup> -Kandidaten	ICCVAM <sup>(5)</sup> -Konsensklassifikation	MeSH <sup>(6)</sup> -Chemikalienklasse	Produktklasse <sup>(7)</sup>
			ER-TA-Aktivität	IC <sub>50</sub> (M)	Prüfkonzentrationsbereich (M)	ER-TA-Aktivität	IC <sub>50</sub> <sup>(3)</sup> (M)	Höchstkonzentration für Vorversuch (M) <sup>(4)</sup>				
1	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	$3,97 \times 10^{-9}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$2,08 \times 10^{-7}$	$2,58 \times 10^{-4}$	mäßig POS	POS	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
2	Raloxifen-HCl	82640-04-8	POS	$7,86 \times 10^{-10}$	$10^{-12} - 10^{-7}$	POS	$1,19 \times 10^{-9}$	$1,96 \times 10^{-4}$	mäßig POS	POS	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
3	Tamoxifen	10540-29-1	POS	$4,91 \times 10^{-7}$	$10^{-10} - 10^{-5}$	POS	$8,17 \times 10^{-7}$	$2,69 \times 10^{-4}$	POS	POS	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis
4	17β-Estradiol	50-28-2	NEG	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	—	$3,67 \times 10^{-3}$	vermutlich negativ <sup>(*)</sup>	PN	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
5	Apigenin	520-36-5	NEG	—	$10^{-9} - 10^{-4}$	NEG	—	$3,70 \times 10^{-4}$	NEG	NEG	Heterocyclische Verbindung	Farbstoff, Naturprodukt, pharmazeutisches Zwischenprodukt
6	Di-n-butylphthalat	84-74-2	NEG	—	$10^{-8} - 10^{-3}$	NEG	—	$3,59 \times 10^{-3}$	NEG	NEG	Ester, Phthalsäure	Kosmetischer Inhaltsstoff, Industriechemikalie, Weichmacher

gestrichen - siehe Teil 0

Stoff <sup>(4)</sup>	CAS-Nr.	ER-STTA-Assay <sup>(1)</sup>			VM7Luc-ER-STTA-Assay <sup>(2)</sup>			Wirkungen Bei ER-STTA <sup>(1)</sup> -Kandidaten	ICCVAM <sup>(5)</sup> -Konsensklassifikation	MeSH <sup>(6)</sup> -Chemikalienklasse	Produktklasse <sup>(7)</sup>
		ER-TA-Aktivität	IC <sub>50</sub> (M)	Prüfkonzentrationsbereich (M)	ER-TA-Aktivität	IC <sub>50</sub> <sup>(3)</sup> (M)	Höchstkonzentration für Vorversuch (M) <sup>(4)</sup>				
7	Flavon	NEG	—	10 <sup>-8</sup> – 10 <sup>-3</sup>	NEG	—	4,50 × 10 <sup>-4</sup>	vermutlich negativ <sup>(*)</sup>	PN	Flavonoid, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt, pharmazeutisches Erzeugnis
8	Genistein	NEG	—	10 <sup>-9</sup> – 10 <sup>-4</sup>	NEG	—	3,70 × 10 <sup>-4</sup>	vermutlich negativ <sup>(*)</sup>	NEG	Flavonoid, heterocyclische Verbindung	Naturprodukt, pharmazeutisches Erzeugnis
9	p-n-Nonylphenol	NEG	—	10 <sup>-9</sup> – 10 <sup>-4</sup>	NEG	—	4,54 × 10 <sup>-4</sup>	nicht geprüft	NEG	Phenol	Chemisches Zwischenprodukt
10	Resveratrol	NEG	—	10 <sup>-8</sup> – 10 <sup>-3</sup>	NEG	—	4,38 × 10 <sup>-4</sup>	vermutlich negativ <sup>(*)</sup>	NEG	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Naturprodukt

Abkürzungen: CASRN = CAS-Registrierungsnummer; M = molar; IC<sub>50</sub> = die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration eines Prüfstoßes; NEG = negativ; PN = vermutlich negativ; POS = positiv.

(\*) Nach einer Literaturrecherche als negativ eingestuft (2).

(4) Verbreitete mit dem STTA- und dem VM7Luc-ER-TA-Assay geprüfte Stoffe, die als ER-Antagonisten ermittelt oder als negativ eingestuft und in der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays zur Bewertung der Genauigkeit verwendet wurden (2) (3).

(1) The Validation Report of the Stably transfected Transcriptional Activation Assay to Detect ER mediated activity, Part B (2).

(2) ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists (3).

(3) Die mittleren EC<sub>50</sub>-Werte wurden anhand von Werten berechnet, die die Labors der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (XDS, ECVAM und Hiyoishi) (3) angegeben hatten.

(4) Die angegebenen Konzentrationen waren die höchsten geprüften Konzentrationen (Vorversuch) bei der Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays. Wenn in den Labors unterschiedliche Konzentrationen verwendet wurden, wird die höchste Konzentration angenommen. Siehe Tabelle 4-11 des ICCVAM Test Method Evaluation Report: The LUMI-Cell@ER (VM7Luc ER TA) Test Method: An *In-Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (3).

(5) Die Einstufung als ER-Antagonist oder als negativ beruhte auf Informationen in den ICCVAM Background Review Documents (BRD) zu Assays zur Prüfung der ER-Bindung und zu TA-Assays (31) sowie auf Informationen aus nach Erstellung der ICCVAM BRDs erfolgten und geprüften Veröffentlichungen (2) (3) (18) (31).

(6) Die Stoffe wurden nach den Medical Subject Headings (MeSH) der U.S. National Library of Medicine, einem international anerkannten standardisierten Klassifizierungssystem, (siehe <http://www.nlm.nih.gov/mesh>) einer oder mehreren Chemikalienklassen zugeordnet.

(7) Die Stoffe wurden nach der Gefahrstoff-Datenbank der U.S. National Library of Medicine (siehe <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>) einer oder mehreren Produktklassen zugeordnet.

gestrichen - siehe Teil 0

### Akzeptanzkriterien für Prüfläufe

16. Ob ein Prüflauf akzeptiert wird, hängt von der Bewertung der Ergebnisse mit den jeweils verwendeten Referenzstandards und Kontrollen ab. Die  $PC_{50}$ - ( $EC_{50}$ -) bzw. die  $IC_{50}$ -Werte bei den Referenzstandards sollten die Akzeptanzkriterien des betreffenden Assays erfüllen (zum STTA-Assay siehe Anlage 2 und zum VM7Luc-ER-TA-Assay siehe Anlage 3), und alle positiven/negativen Kontrollen sollten für jeden akzeptierten Versuch ordnungsgemäß eingestuft werden. Die Fähigkeit zur konsistenten Durchführung der Assays sollte durch den Aufbau und die Pflege einer historischen Datenbank für die Referenzstandards und Kontrollen nachgewiesen werden (Nummer 15). Standardabweichungen (SD) oder Variationskoeffizienten (VK) der Mittelwerte von Parametern zur Anpassung der Referenzstandardkurven aus mehreren Versuchen können als Maßstab für die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Labors herangezogen werden. Darüber hinaus sollten für Akzeptanzkriterien die folgenden Grundsätze gelten:

- Die Daten sollten hinreichend für eine quantitative Bewertung der ER-Aktivierung beim Agonisten-Assay) bzw. zur ER-Unterdrückung (beim Antagonisten-Assay) (d. h. zur Bewertung der Wirksamkeit und Leistungsfähigkeit) sein.
- Die mittlere Reporter-Aktivität bei der Referenzkonzentration des Referenzöstrogens sollte wenigstens der bei den betreffenden Assays für die Vehikelkontrolle (Lösungsmittelkontrolle) spezifizierten Mindestaktivität entsprechen, damit eine angemessene Empfindlichkeit gewährleistet ist. Beim STTA- und beim VM7Luc-ER-TA-Assay beträgt diese Aktivität das Vierfache der Aktivität der mittleren Vehikelkontrolle der jeweiligen Platte.
- Die geprüften Konzentrationen sollten im Löslichkeitsbereich der Prüfchemikalien bleiben und nicht zytotoxisch wirken.

### Analyse der Daten

17. Positive bzw. negative Reaktionen sollten nach dem für den jeweiligen Assay festgelegten Verfahren zur Auswertung der Daten analysiert werden.
18. Die Erfüllung der Akzeptanzkriterien (Nummer 16) deutet darauf hin, dass ein Assay ordnungsgemäß funktioniert. Dies gewährleistet jedoch nicht, dass ein bestimmter Prüflauf tatsächlich exakte Daten ergibt. Die Wiederholung der Ergebnisse des ersten Prüflaufs ist die beste Bestätigung dafür, dass exakte Daten ermittelt wurden. Wenn zwei Prüfläufe zu reproduzierbaren Ergebnissen führen (d. h. wenn für eine Prüfchemikalie in beiden Prüfläufen ein positives Ergebnis ermittelt wurde), ist ein dritter Prüflauf nicht erforderlich.
19. Führen zwei Prüfläufe zu unterschiedlichen Ergebnissen (z. B. bei einer einzigen Prüfchemikalie einmal ein positives und einmal ein negatives Ergebnis) oder wenn eine höhere Gewissheit hinsichtlich des Ergebnisses benötigt wird, sollten mindestens drei unabhängige Prüfläufe durchgeführt werden. In diesem Fall wird die Einstufung anhand der beiden übereinstimmenden Ergebnisse von drei Prüfläufen vorgenommen.

### Allgemeine Kriterien für die Auswertung von Daten

20. Zurzeit besteht keine allgemein anerkannte Methode zur Auswertung der Daten aus ER-TA-Assays. Allerdings sollten qualitative (z. B. positiv/negativ) und/oder quantitative (z. B.  $EC_{50}$ ,  $PC_{50}$  und  $IC_{50}$ ) Bewertungen einer durch ER vermittelten Aktivität auf empirischen Daten und fundierten wissenschaftlichen Beurteilungen beruhen. Nach Möglichkeit sollten positive Ergebnisse sowohl unter Angabe der Größenordnung der Wirkung im Vergleich zur Vehikelkontrolle (Lösungsmittelkontrolle) oder zum Referenzöstrogen als auch der Konzentration beschrieben werden, bei der die Wirkung eintritt (z. B.  $EC_{50}$ ,  $PC_{50}$ ,  $RPC_{Max}$  oder  $IC_{50}$ ).

### Prüfbericht

21. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

*Gehalt:*

- durchgeführter Assay;
- Kontrolle/Referenzstandard/Prüfchemikalie;
- Herkunft, Partienummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;



- Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie in Lösungsmittel, falls bekannt;
- Messung des pH-Werts, Osmolalität und ggf. Niederschlag im Kulturmedium, dem die Prüfchemikalie zugegeben wurde.

*Einkomponentiger Stoff:*

- physikalisches Erscheinungsbild, Wasserlöslichkeit und weitere relevante physikalisch-chemische Eigenschaften;
- chemische Bezeichnung, wie z. B. IUPAC- oder CAS-Bezeichnung, CAS-Nummer, SMILES- oder InChI-Code, Strukturformel, Reinheit, chemische Zusammensetzung von Verunreinigungen, soweit zutreffend und praktisch durchführbar, usw.

*Mehrkomponentiger Stoff, UVCB-Stoffe und Gemische:*

- so weit wie möglich charakterisiert durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten.

*Lösungsmittel/Vehikel:*

- Beschreibung (Art, Lieferant und Charge);
- Begründung der Auswahl des Lösungsmittels/Vehikels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie in Lösungsmittel/in einem Vehikel, falls bekannt.

*Zellen:*

- Art und Herkunft der Zellen:
  - Wurde ER endogen exprimiert? Wenn nicht, welche Rezeptor(en) wurden transfiziert?
  - verwendete(s) Reporter-Genprodukt(e) (einschließlich Spezies);
  - Transfektionsmethode;
  - (ggf.) Auswahlmethode zur Aufrechterhaltung einer stabilen Transfektion);
  - ist die Transfektionsmethode für stabile Linien relevant?
- ggf. Passagenanzahl (nach dem Auftauen);
- Passagenanzahl beim Auftauen;
- zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren.

*Prüfbedingungen:*

- Löslichkeitsgrenzen;
- Beschreibung der eingesetzten Methoden zur Bewertung der Viabilität;
- Medienzusammensetzung, CO<sub>2</sub>-Konzentration;
- Konzentrationen der Prüfchemikalie;
- Volumen des Vehikels und der beigegebenen Prüfchemikalie;
- Inkubationstemperatur und Feuchte;
- Behandlungsdauer;
- Zelldichte zu Beginn und während der Behandlung;
- positive und negative Referenzstandards;
- Reporter-Reagenzien (Produktbezeichnung, Hersteller und Charge);
- Kriterien zur Einstufung der Prüfläufe als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

*Akzeptanzprüfung:*

- n-fache Induktionen der einzelnen Assay-Platten und Angabe, ob damit die Mindestanforderungen des betreffenden Assays nach historischen Kontrollen erfüllt werden;
- tatsächliche Werte der Akzeptanzkriterien, z. B. log<sub>10</sub><sup>-</sup>, EC<sub>50</sub>, log<sub>10</sub><sup>-</sup>, PC<sub>50</sub><sup>-</sup>, logIC<sub>50</sub><sup>-</sup> und Hillslope-Werte für gleichzeitige Positivkontrollen/Referenzstandards.

*Ergebnisse:*

- Rohdaten und normalisierte Daten;
- höchste n-fache Induktion;
- Zytotoxizitätsdaten;
- wenn vorhanden, niedrigste Wirkungskonzentration (LEC);
- ggf. RPC<sub>Max</sub>, PC<sub>Max</sub>, PC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> und/oder EC<sub>50</sub>;
- nach Möglichkeit Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis;

- wenn vorhanden, statistische Analysen sowie Messabweichung und Konfidenzwerte (z. B. SEM, SD, VK oder 95 % CI) sowie Angaben dazu, wie diese Werte ermittelt wurden.

*Erörterung der Ergebnisse.*

*Schlussfolgerung.*

#### LITERATUR

- (1) OECD (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 34), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (2) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (4) Pujol, P., u. a. (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer. Res.*, 58(23): S. 5367-5373.
- (5) Rogers, J.M. und Denison, M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research*, 13(1): S. 67-82.
- (6) OECD (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (7) OECD (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (8) OECD (2012). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 150), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. *Climacteric*, 5 Suppl 2: S. 20-26.
- (10) Welboren, W.J., u. a. (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? *Endocr. Relat. Cancer*, 16(4): S. 1073-1089.
- (11) Younes, M. und Honma, N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): S. 63-66.
- (12) Jefferson, W.N., u. a. (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, *Journal of Chromatography B*, 777(1-2): S. 179-189.

- (13) Sonneveld, E., u. a. (2006). Comparison of *In Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol. Sci.*, 89(1): S. 173-187.
- (14) Takeyoshi, M., u. a. (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, *Toxicology Letters*, 126(2): S. 91- 98.
- (15) Combes, R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 28(1): S. 81-118.
- (16) Escande, A., u. a. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol*, 71(10): S. 1459-1469.
- (17) Gray, L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol. Lett*, 102-103, 677-680.
- (18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.
- (19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (20) Gustafsson, J.Ö. (1999). Estrogen Receptor  $\beta$  – A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, *Journal of Endocrinology*, 163(3): S. 379-383.
- (21) Ogawa, S., u. a. (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor  $\beta$  (hER $\beta$ ) and its Heterodimerization with ER $\alpha$  *In Vivo* and *In Vitro*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(1): S. 122-126.
- (22) Enmark, E., u. a. (1997). Human Estrogen Receptor  $\beta$ -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(12): S. 4258-4265.
- (23) Ball, L.J., u. a. (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 299(2): S. 204-211.
- (24) Barkhem, T., u. a. (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, *Mol. Pharmacol*, 54(1): S. 105-112.
- (25) Deroo, B.J. und Buensuceso, A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor- $\beta$ : Mechanistic Insights from Recent Studies, *Molecular Endocrinology*, 24(9): S. 1703-1714.
- (26) Harris, D.M., u. a. (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, *Experimental Biology and Medicine*, 230(8): S. 558-568.
- (27) Anderson, J.N., Clark, J.H. und Peck, E.J. Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 48(6): S. 1460-1468.
- (28) Toft, D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, *Journal of Steroid Biochemistry*, 3(3): S. 515-522.
- (29) Gorski, J., u. a. (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, *Recent Progress in Hormone Research*, 24: S. 45-80.

- (30) Jensen, E.V., u. a. (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, *Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, 56(3): S. 547-569.
- (31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505).
- (32) Kanno, J., u. a. (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, *Environ. Health Persp.*, 109:785-94.
- (33) Kanno, J., u. a. (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose-Response Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1530-1549.
- (34) Kanno, J., u. a. (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, *Environ. Health Persp.*, 111:1550-1558.
- (35) Geisinger u. a. (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280-288.
- (36) Baldwin u. a. (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649-654.
- (37) Li, Y. u. a. (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072-2081.
- (38) Rogers, J.M. und Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67-82.

## Anlage 1

## BEGRIFFSBESTIMMUNGEN UND ABKÜRZUNGEN

**Agonist:** Ein Stoff, der eine Wirkung (z. B. eine Transkription) hervorruft, wenn er eine Bindung mit einem bestimmten Rezeptor eingeht.

**Aktivkohle-/Dextranbehandlung:** Behandlung von bei Zellkulturen verwendeten Seren. Bei der Behandlung mit Aktivkohle/Dextran (häufig auch als „Stripping“ bezeichnet) werden endogene Hormone und hormonbindende Proteine abgetrennt.

**Akzeptanzkriterien:** Mindeststandards für Kontrollen und Referenzstandards. Damit ein Versuch als gültig betrachtet werden kann, sollten alle Akzeptanzkriterien erfüllt sein.

**Antagonist:** Eine Art Rezeptor-Ligand oder eine Chemikalie, die nach der Bindung an einen Rezeptor an sich keine biologische Reaktion auslöst, aber durch Agonisten vermittelte Reaktionen blockiert oder dämpft.

**Antiöstrogene Aktivität:** Fähigkeit einer Chemikalie zur Unterdrückung der durch Östrogenrezeptoren vermittelten Wirkung von 17 $\beta$ -Estradiol.

**Assay:** Im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode wird als Assay eine Methode bezeichnet, die die beschriebenen Leistungskriterien erfüllt und daher als gültige Methode anerkannt wird. Elemente eines Assays sind beispielsweise die spezifische Zelllinie mit den entsprechenden Wachstumsbedingungen, spezifische Medien, in denen die Untersuchung erfolgt, die Konfiguration der Platten, Anordnung und Verdünnungen von Prüfchemikalien sowie alle sonstigen erforderlichen Qualitätskontrollmaßnahmen und mit der Untersuchung verbundenen Schritte zur Auswertung der Daten.

**CF:** OECD Conceptual Framework for the Testing and Evaluation of Endocrine Disrupters.

**Chemikalie:** Ein Stoff oder ein Gemisch.

**DCC-FBS:** Mit dextranbeschichteter Aktivkohle behandeltes fetales Rinderserum.

**DMEM:** Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium.

**DMSO:** Dimethylsulfoxid.

**E2:** 17 $\beta$ -Estradiol.

**EC<sub>50</sub>:** Die Hälfte der maximalen Wirkungskonzentration einer Prüfchemikalie.

**ED:** Endokrine Störung.

**EFM:** Östrogenfreies Medium. Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM), ergänzt um 4,5 % mit Aktivkohle/Dextran behandeltes fetales Rinderserum (FBS), 1,9 % L-Glutamin und 0,9 % Pen/Strep.

**Eignung:** Die nachgewiesene Fähigkeit zur ordnungsgemäßen Durchführung eines Assays vor der Prüfung unbekannter Stoffe.

**ER:** Östrogenrezeptor.

**ERE:** Östrogen-Response-Element.

**ER-TA:** Östrogenrezeptor-Transaktivierung

**FBS:** Fetales Rinderserum.

**Genauigkeit (Übereinstimmung):** Der Grad an Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen eines Assays und akzeptierten Referenzwerten. Die Genauigkeit ist ein Maß der Leistung eines Assays und ein Aspekt der Relevanz. Der Begriff wird oft im Sinne von „Übereinstimmung“ verwendet und bezeichnet den Anteil der korrekten Ergebnisse eines Assays (1).

**HeLa:** Eine unsterbliche humane Zervikalkarzinom-Zelllinie.

**HeLa9903:** Ein Subklon der HeLa-Zelllinie, in den hER $\alpha$  und ein Luciferase-Reporter-Gen stabil transfiziert wurden.

**hER $\beta$ :** Humaner Östrogenrezeptor  $\beta$ .

**hER $\alpha$ :** Humaner Östrogenrezeptor  $\alpha$ .

**IC<sub>50</sub>:** Die Hälfte der maximalen Wirkungskonzentration einer Prüfchemikalie mit hemmender Wirkung.

**ICCVAM:** Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (das US-amerikanische Validierungszentrum).

**Inter-Labor-Reproduzierbarkeit:** Das Ausmaß, in dem unterschiedliche qualifizierte Laboratorien, die dasselbe Protokoll verwenden und dieselben Prüfstoffe untersuchen, qualitativ und quantitativ vergleichbare Ergebnisse erzielen können. Die Inter-Labor-Reproduzierbarkeit wird während der Prävalidierungs- und Validierungsverfahren ermittelt und zeigt das Maß an, in dem ein Assay erfolgreich zwischen Laboratorien übertragen werden kann (1).

**Intra-Labor-Reproduzierbarkeit:** Das Ausmaß, in dem qualifizierte Personen innerhalb desselben Labors, die dasselbe spezifische Protokoll zu unterschiedlichen Zeiten verwenden, erfolgreich dieselben Ergebnisse replizieren können. Auch als „laborinterne Reproduzierbarkeit“ bezeichnet (1).

**LEC:** Als niedrigste Wirkungskonzentration (Lowest Effective Concentration) wird die niedrigste Konzentration einer Prüfchemikalie bezeichnet, die eine Wirkung hervorruft (d. h. die niedrigste Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der die n-fache Induktion sich statistisch von der gleichzeitigen Vehikelkontrolle unterscheidet).

**Leistungsstandards:** Auf einem validierten Assay beruhende Normen, auf deren Grundlage die Vergleichbarkeit einem vorgeschlagenen, mechanistisch und funktionell ähnlichen Assay bewertet werden kann. Sie umfassen (1) wesentliche Elemente des Assays; (2) ein Mindestverzeichnis von Referenzchemikalien, ausgewählt aus den Chemikalien, die zum Nachweis der akzeptablen Leistung der validierten Referenzmethode verwendet werden, und (3) je nach den für die validierte Referenzmethode erzielten Ergebnissen die vergleichbaren Genauigkeits- und Zuverlässigkeitswerte, die der vorgeschlagene Assay bei der Bewertung anhand des Mindestverzeichnisses von Referenzchemikalien ergeben sollte (1).

**Leistungsstoffe:** Eine Untergruppe der in die Leistungsstandards einbezogenen Referenzstoffe, die von Labors bei standardisierten Prüfmethode zum Nachweis der fachlichen Kompetenz eingesetzt werden können. Auswahlkriterien für diese Stoffe sind u. a., dass sie den Reaktionsbereich abdecken und im Handel erhältlich sein müssen und dass für diese Stoffe hochwertige Referenzdaten verfügbar sein müssen.

**Me-Too-Prüfung:** [Im englischen Sprachraum gemeinsprachliche] Bezeichnung einer Prüfmethode, die strukturell und funktionell mit einer validierten und akzeptierten Referenzprüfmethode vergleichbar ist. Gleichbedeutend mit „vergleichbare Prüfmethode“ verwendet.

**MMTV:** Maus-Mammatumovirus.

**MT:** Metallothionein.

**OHT:** 4-Hydroxytamoxifen.

**Östrogenaktivität:** Fähigkeit einer Chemikalie, wie  $17\beta$ -Estradiol Bindungen Östrogenrezeptoren einzugehen und Östrogenrezeptoren zu aktivieren. Mit dieser Prüfmethode kann durch hER $\alpha$  vermittelte Östrogenaktivität nachgewiesen werden.

**PBTG:** Leistungsbezogene Prüfrichtlinie.

**PC<sub>10</sub>:** Die Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der die gemessene Aktivität in einem Agonisten-Assay auf jeder einzelnen Platte 10 % der durch die PK (1 nM E2 beim STTA-Assay) induzierten maximalen Aktivität beträgt.

**PC<sub>50</sub>:** Die Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der die gemessene Aktivität in einem Agonisten-Assay auf jeder einzelnen Platte 50 % der durch die PK (E2 in der für die jeweilige Prüfmethode spezifizierten Referenzkonzentration) induzierten maximalen Aktivität beträgt.

**PC<sub>Max</sub>:** Die Konzentration einer Prüfchemikalie, die RPCMax induziert.

**PK (Positivkontrolle):** Ein starker Wirkstoff, vorzugsweise  $17\beta$ -Estradiol, der in alle Prüfungen einbezogen wird, um das ordnungsgemäße Funktionieren der Assays sicherzustellen.

**Prüfchemikalie:** Stoff oder Gemisch, der/das mit dieser Prüfmethode untersucht wird.

**Prüflauf:** Ein einzelner Versuch zur Bewertung der Wirkung einer Chemikalie auf das biologische Ergebnis eines Assays. Jeder Prüflauf besteht aus einem vollständigen Versuch an Replikat-Wells mit Zellen, die gleichzeitig aus einem gemeinsamen Zellpool plattiert wurden.

**Referenz-Östrogen (Positivkontrolle, PK):**  $17\beta$ -Estradiol (E2, CAS 50-28-2).

**Referenzprüfmethode:** Die Assays, auf denen die PBTG 455 beruht.

**Referenzstandard:** Ein Referenzstoff zum Nachweis der Eignung eines Assays.  $17\beta$ -Estradiol ist der Referenzstandard für den STTA- und den VM7Luc-ER-TA-Assay.



**Relevanz:** Dieser Begriff bezieht sich auf das Verhältnis zwischen dem Assay und der betreffenden Wirkung und auf die Frage, ob er aussagekräftig und nützlich für einen bestimmten Zweck ist. Er beschreibt das Ausmaß, in dem der Assay die untersuchte biologische Wirkung korrekt misst oder vorhersagt. Die Relevanz schließt eine Beurteilung der Genauigkeit (Übereinstimmung) eines Assays ein (1).

**RLU:** Relative Lichteinheiten.

**RNA:** Ribonukleinsäure.

**RPC<sub>Max</sub>:** Durch eine Prüfchemikalie induzierte maximale Reaktion, ausgedrückt als Prozentanteil der durch 1 nM E2 auf derselben Platte induzierten Reaktion.

**RPMI:** RPMI-1640-Medium, ergänzt um 0,9 % Pen/Strep und 8,0 % fetales Rinderserum (FBS).

**Schwache Positivkontrolle:** Ein schwacher Wirkstoff aus der Liste der Referenzchemikalien, der in alle Prüfungen einbezogen wird, um das ordnungsgemäße Funktionieren der Assays sicherzustellen.

**SD:** Standardabweichung.

**Sensitivität:** Der Anteil aller positiven/wirkenden Prüfstoffe, die durch den Assay korrekt eingestuft werden. Die Sensitivität ist ein Maß der Genauigkeit eines Assays mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung seiner Relevanz (1).

**Spezifität:** Der Anteil aller negativen/wirkungslosen Prüfstoffe, die durch die Prüfung korrekt eingestuft werden. Die Spezifität ist ein Maß der Genauigkeit eines Assays mit kategorialen Ergebnissen und ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung seiner Relevanz (1).

**Stabile Transfektion:** Wenn DNA so in Zellkulturen transfiziert wird, dass sie stabil in das Zellgenom eingefügt wird, erfolgt eine stabile Expression der betreffenden Gene. Klone stabil transfizierter Zellen werden unter Verwendung stabiler Marker (z. B. Resistenz gegenüber G418) selektioniert.

**Stoff:** In der REACH-Verordnung<sup>(1)</sup> werden Stoffe definiert als ein chemisches Element und seine Verbindungen in natürlicher Form oder gewonnen durch ein Herstellungsverfahren, einschließlich der zur Wahrung seiner Stabilität notwendigen Zusatzstoffe und der durch das angewandte Verfahren bedingten Verunreinigungen, aber mit Ausnahme von Lösungsmitteln, die von dem Stoff ohne Beeinträchtigung seiner Stabilität und ohne Änderung seiner Zusammensetzung abgetrennt werden können. Eine sehr ähnliche Begriffsbestimmung wird im Zusammenhang mit dem UN GHS verwendet (1).

**STTA-Assay:** Assay mit transkriptioneller ER $\alpha$ -Aktivierung unter Verwendung der Zelllinie HeLa 9903.

**Studie/Untersuchung:** Eine umfassende experimentelle Untersuchung zur Bewertung eines einzelnen, spezifischen Stoffs mit einem spezifischen Assay. Eine Studie umfasst sämtliche Schritte einschließlich Untersuchungen von Verdünnungen eines Prüfstoffs im Prüfmedium, Vorversuchen zur Dosisfindung, allen erforderlichen Hauptversuchen, Datenanalysen, Qualitätssicherung, Zytotoxizitätsbewertungen usw. Aufgrund einer Studie kann die mit dem jeweiligen Assay zu untersuchende Wirkung der Prüfchemikalie auf das Zielmaterial einer Toxizitätsprüfung bewertet werden (als aktiv, nicht aktiv oder nicht eindeutig) und die Stärke der Wirkung bezogen auf die positive Referenzchemikalie abgeschätzt werden.

<sup>(1)</sup> Verordnung EG (Nr.) 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH), zur Schaffung einer Europäischen Agentur für chemische Stoffe, zur Änderung der Richtlinie 1999/45/EG und zur Aufhebung der Verordnung (EWG) Nr. 793/93 des Rates, der Verordnung (EG) Nr. 1488/94 der Kommission, der Richtlinie 76/769/EWG des Rates sowie der Richtlinien 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/EG und 2000/21/EG der Kommission. ABl. L 304 vom 22.11.2007, S. 1.

**TA (Transaktivierung):** Die Auslösung einer mRNA-Synthese als Reaktion auf ein bestimmtes chemisches Signal wie beispielsweise die Bindung eines Östrogens an einen Östrogenrezeptor.

**Transkription:** mRNA-Synthese.

**Unabhängiger Prüflauf:** Ein getrennter unabhängiger Versuch, mit dem die Wirkung einer Chemikalie auf das biologische Ergebnis eines Assays mit Zellen aus einem anderen Pool sowie mit frisch verdünnten Chemikalien an unterschiedlichen Tagen oder am selben Tag durch unterschiedliche Labortechniker bewertet wird.

**UVCB:** Chemische Stoffe mit unbekannter oder schwankender Zusammensetzung, komplexe Reaktionsprodukte oder biologische Materialien.

**Validierte Prüfmethode:** Ein Assay, für den zwecks Bestimmung ihrer Relevanz (einschließlich Genauigkeit) und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck Validierungsstudien durchgeführt wurden. Es wird darauf hingewiesen, dass eine validierte Prüfmethode möglicherweise nicht so genau und zuverlässig ist, dass sie für den vorgeschlagenen Zweck akzeptiert werden kann (1).

**Validierung:** Prozess, mit dem die Zuverlässigkeit und die Relevanz eines bestimmten Ansatzes, einer Methode, eines Assays, eines Prozesses oder einer Bewertung für einen bestimmten Zweck festgestellt wird (1).

**VK (Vehikelkontrolle):** Das zur Lösung der Prüf- und der Kontrollchemikalien verwendete Lösungsmittel wird ohne gelöste Chemikalie nur als Vehikel geprüft.

**VK:** Variationskoeffizient.

**VM7:** Eine immortalisierte Adenokarzinom-Zelllinie, die einen Östrogenrezeptor endogen exprimiert.

**VM7Luc4E2:** Die VM7Luc4E2-Zelllinie wurde aus immortalisierten VM7-Zellen (humanen Adenokarzinom-Zellen) abgeleitet, die beide Formen von Endogenrezeptoren (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) endogen exprimieren und mit dem Plasmid pGud-Luc7.ERE stabil transfiziert wurden. Dieses Plasmid enthält vier Kopien eines synthetischen Oligonucleotids mit dem Östrogen-Response-Element vor dem MMTV-Promoter (MMTV = Maus-Mammatumovirus) und dem Leuchtkäfer-Luciferase-Gen.

**Zellmorphologie:** Form und Aussehen von Zellen, die in einer Monolayer-Kultur in einem einzelnen Well einer Gewebekultur-Platte gewachsen sind. Absterbende Zellen weisen häufig eine abnormale Zellmorphologie auf.

**Zuverlässigkeit:** Maß der Verlässlichkeit der Reproduzierbarkeit eines Assays innerhalb von und zwischen Laboratorien (Intra- und Inter-Labor-Reproduzierbarkeit) in einem bestimmten Zeitintervall bei einheitlichem Protokoll. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Inter-Labor-Reproduzierbarkeit bewertet.

**Zytotoxizität:** Gefährliche Wirkungen auf Zellstrukturen oder Funktionen, die letztlich zum Absterben von Zellen führen und sich in einer Reduzierung der Anzahl der Zellen auf dem Well am Ende des Expositionszeitraums oder in einer reduzierten Messbarkeit von Zellfunktionen im Vergleich zur gleichzeitigen Vehikelkontrolle äußern können.

## Anlage 2

ASSAY ZUR TRANSAKTIVIERUNG DES STABIL TRANSFIZIERTEN HUMANEN ÖSTROGENREZEPTORS  $\alpha$  ZUM NACHWEIS DER WIRKUNG VON CHEMIKALIEN AUF ÖSTROGEN-AGONISTEN UND -ANTAGONISTEN MIT DER HERA-HELA-9903-ZELLINIE

**AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)**

1. Bei diesem Transaktivierungs-Assay (TA-Assay) wird die hER $\alpha$ -HeLa-9903-Zelllinie zum Nachweis einer durch den humanen Östrogenrezeptor  $\alpha$  (hER $\alpha$ ) vermittelten Östrogen-Agonisten-Aktivität verwendet. Mit der Validierungsstudie des japanischen Chemikalienevaluierungs- und -forschungsinstituts CERI zum STTA-Assay (STTA = Stably Transfected Transactivation) unter Verwendung der hER $\alpha$ -HeLa-9903-Zelllinie zum Nachweis der durch den humanen Östrogenrezeptor  $\alpha$  (hER $\alpha$ ) vermittelten Östrogen-Agonisten- und -Antagonisten-Aktivität wurden die Relevanz des Assays für den vorgesehenen Zweck und seine Zuverlässigkeit nachgewiesen (1).
2. Dieser Assay wurde speziell zum Nachweis von hER $\alpha$  und einer durch hER $\alpha$  vermittelten TA anhand einer Messung der Chemilumineszenz als Endpunkt entwickelt. Bei Phytoöstrogenkonzentrationen von mehr als 1  $\mu$ M wurden infolge der Überaktivierung des Luciferase-Reporter-Gens Luminiszenzsignale festgestellt, die nicht durch Rezeptoren vermittelt wurden (2) (3). Die Dosis-Reaktions-Kurve zeigt, dass die tatsächliche Aktivierung des ER-Systems bei niedrigeren Konzentrationen erfolgt; bei stabil transfizierten ER-TA-Assay-Systemen muss die Luciferase-Expression bei hohen Konzentrationen von Phytoöstrogenen oder ähnlichen Vereinbarungen, bei denen vermutet wird, dass sie eine phytoöstrogenartige Überaktivierung des Luciferase-Reportergens verursachen, jedoch sorgfältig untersucht werden (Anlage 1).
3. Vor der Verwendung dieses Assays für rechtliche Zwecke sollten die Abschnitte „ALLGEMEINE EINLEITUNG“ und „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ gelesen werden. Die in dieser Prüfrichtlinie verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 2.1 erläutert.

**PRINZIP DES ASSAYS (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)**

4. Der Assay wird zur Feststellung von Bindungen des Östrogenrezeptors mit einem Liganden verwendet. Nach der Bindung an den Liganden transloziert der Rezeptor-Liganden-Komplex in den Zellkern, wo er spezifische DNA-Response-Elemente bindet und ein Leuchtkäfer-Luciferase-Reporter-Gen transaktiviert. Dies führt zu einer verstärkten zellulären Expression des Luciferase-Enzyms. Luciferin ist ein Substrat, das durch das Luciferase-Enzym in ein Biolumineszenz-Produkt umgewandelt wird, das mit einem Luminometer quantitativ gemessen werden kann. Die Luciferase-Aktivität kann rasch und kostengünstig mit verschiedenen im Handel erhältlichen Test-Kits bewertet werden.
5. Bei diesem Prüfsystem wird die aus einem humanen Zervikaltumor abgeleitete hER $\alpha$ -HeLa-9903-Zelllinie mit zwei stabil eingefügten Produkten verwendet: (i) der hER $\alpha$ -Expression (mit in voller Länge kodiertem humanem Rezeptor) und (ii) einem Leuchtkäfer-Luciferase-Reporterprodukt mit fünf Tandem-Repeats eines auf ein Maus-Metallothionein(MT)-Promoter-TA-Element reagierenden Vitellogenin-Östrogen-Response-Elements (ERE). Da mit dem Maus-MT-TATA-Genprodukt nachweislich die besten Ergebnisse erzielt werden, wird gewöhnlich dieses Produkt verwendet. Mit dieser hER $\alpha$ -HeLa-9903-Zelllinie kann die Fähigkeit einer Prüfchemikalie zur Induzierung einer durch hER $\alpha$  vermittelten Transaktivierung einer Luciferasegen-Expression gemessen werden.
6. Beim ER-Agonisten-Assay hängt die Auswertung der Daten davon ab, ob die durch eine Prüfchemikalie induzierte maximale Reaktion größer oder gleich einer Agonisten-Reaktion im Umfang von 10 % der Reaktion ist, die durch eine Konzentration der Positivkontrolle (PK) 17 $\beta$ -Estradiol (E2) mit maximaler Induktion (1 nM) (d. h. PC10) induziert wird. Beim ER-Antagonisten-Assay wird die Auswertung der Daten davon bestimmt, ob die Reaktion mindestens in einer 30 %igen Reduzierung der Aktivität infolge der Spike-in-Kontrolle (25 pM E2) ohne Zytotoxizität besteht. Analysen und Auswertungen der Daten siehe Nummern 34-48.

**VERFAHREN****Zelllinien**

7. Für den Assay sollte die stabil transfizierte hER $\alpha$ -HeLa-9903-Zelllinie verwendet werden. Diese Zelllinie kann von der JCRB-Zellbank (JRCB = Japanese Collection of Research Bioresources) <sup>(1)</sup> nach Unterzeichnung einer Materialübertragungsvereinbarung (Material Transfer Agreement, MTA) bezogen werden.
8. Für die Prüfungen sollten ausschließlich als mycoplasmafrei charakterisierte Zellen verwendet werden. Die RT-PCR (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) ist die Methode der Wahl für den empfindlichen Nachweis einer Mycoplasma-Infektion (4) (5) (6).

**Stabilität der Zelllinie**

9. Zur Überwachung der Stabilität der Zelllinie sollten E2, 17 $\alpha$ -Estradiol, 17 $\alpha$ -Methyltestosteron und Corticosteron als Referenzstandards für den Agonisten-Assay verwendet werden, und bei jeder Durchführung des Assays sollte mindestens eine vollständige Konzentrations-Reaktions-Kurve in dem in Tabelle 1 genannten Prüfkonzentrationsbereich gemessen werden. Dabei sollten die in Tabelle 1 genannten Ergebnisse ermittelt werden.
10. Beim Antagonisten-Assays sollten für jeden Prüflauf gleichzeitig vollständige Konzentrationskurven für die beiden Referenzstandards Tamoxifen und Flutamid gemessen werden. Die ordnungsgemäße Einstufung der beiden Chemikalien als positiv oder negativ sollte überwacht werden.

**Bedingungen für die Haltung der Zellkulturen und für die Plattierung**

11. Die Zellen werden in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) ohne Phenolrot ergänzt mit 60 mg/l des Antibiotikums Kanamycin und 10 % mit dextranbeschichteter Aktivkohle behandeltem fetalem Rinderserumdextran (DCC-FBS) in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (5 % CO<sub>2</sub>) bei 37  $\pm$  1 °C gehalten. Wenn eine Konfluenz von 75-90 % erreicht ist, können Zellen mit 10 ml 0,4  $\times$  10<sup>5</sup> – 1  $\times$  10<sup>5</sup> Zellen/ml auf einer 100-mm-Zellkulturschale subkultiviert werden. Dann werden die Zellen mit 10 % FBS-EMEM (identisch mit EMEM mit DCC-FBS) suspendiert und anschließend mit einer Dichte von 1  $\times$  10<sup>4</sup> Zellen/(100  $\mu$ l  $\times$  Well) in Wells einer Mikrotiterplatte plattiert. Danach werden die Zellen in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (5 %) bei 37  $\pm$  1 °C drei Stunden vorinkubiert, bevor sie der zu untersuchenden Chemikalie ausgesetzt werden. Die Verbrauchsmaterialien aus Kunststoff sollten keine Östrogenaktivität aufweisen.
12. Um die Integrität der Reaktion aufrechtzuerhalten, sollten die Zellen im konditionierten Medium über mehr als eine Passage höchstens aber bis zu 40 Passagen des tiefgefrorenen Materials vermehrt werden. Bei der hER $\alpha$ -HeLa-9903-Zelllinie dauert dies weniger als drei Monate. Das Zellwachstum kann jedoch verringert sein, wenn die Zellen unter ungeeigneten Kulturbedingungen vermehrt werden.
13. Das DCC-FBS kann wie in Anlage 2.2 beschrieben zubereitet oder im Handel bezogen werden.

**Akzeptanzkriterien***Positive und negative Referenzstandards für den ER-Agonisten-Assay*

14. Vor und während der Untersuchung sollte die Reaktion des Prüfsystems mit den jeweils geeigneten Konzentrationen eines starken Östrogens verifiziert werden: E2, ein schwaches Östrogen (17 $\alpha$ -Estradiol), ein sehr schwacher Agonist (17 $\alpha$ -Methyltestosteron) und ein Negativstoff (Corticosteron). Tabelle 1 sind annehmbare Bereichswerte angegeben, die aus der Validierungsstudie (1) entnommen wurden. Diese 4 gleichzeitigen Referenzstandards sollten in jeden Versuch einbezogen werden, und die Ergebnisse sollten jeweils im annehmbaren Bereich liegen. Ansonsten sollten die Ursachen dafür ermittelt werden, dass die Akzeptanzkriterien nicht erfüllt werden (z. B. die Handhabung der und

<sup>(1)</sup> JCRB Cell Bank: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan, Telefax: +81-72-641-9812.

der Assay sollte wiederholt werden. Wenn die Akzeptanzkriterien erfüllt werden, ist die konsistente Verwendung von Materialien für die Kultivierung der Zellen von entscheidender Bedeutung, um eine möglichst geringe Variabilität der EC<sub>50</sub>, PC<sub>50</sub>- und PC<sub>10</sub>-Werte sicherzustellen. Die vier gleichzeitigen Referenzstandards, die in alle (unter identischen Bedingungen u. a. in Bezug auf die Materialien, die Passagenanzahl und die Labortechniker durchzuführenden) Versuche einbezogen werden sollten, können die Empfindlichkeit des Assays gewährleisten, da die PC<sub>10</sub>-Werte der drei positiven Referenzstandards ebenso wie die PC<sub>50</sub>- und die EC<sub>50</sub>-Werte (wenn diese berechnet werden können) im annehmbaren Bereich liegen sollten (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1

**Werte im annehmbaren Bereich für die vier Referenzstandards beim ER-Agonisten-Assay**

Name	logPC <sub>50</sub>	logPC <sub>10</sub>	logPC <sub>50</sub>	Hillslope	Prüfbereich
17β-Estradiol (E2) CAS-Nr.: 50-28-2	-11,4~-10,1	< -11	-11,3~-10,1	0,7~1,5	10 <sup>-14</sup> ~10 <sup>-8</sup> M
17α-Estradiol CAS-Nr.: 57-91-0	-9,6~-8,1	-10,7~-9,3	-9,6~-8,4	0,9~2,0	10 <sup>-12</sup> ~10 <sup>-6</sup> M
Corticosteron CAS-Nr.: 50-22-6	—	—	—	—	10 <sup>-10</sup> ~10 <sup>-4</sup> M
17α-Methyltestosteron CAS-Nr.: 58-18-4	-6,0~-5,1	-8,0~-6,2	—	—	10 <sup>-11</sup> ~10 <sup>-5</sup> M

*Positive und negative Referenzstandards für den ER-Antagonisten-Assay*

15. Vor und während der Untersuchung sollte die Reaktion des Prüfsystems mit den jeweils geeigneten Konzentrationen eines Positivstoffs (Tamoxifen) und eines Negativstoffs (Flutamid) verifiziert werden: Tabelle 2 sind annehmbare Bereichswerte angegeben, die aus der Validierungsstudie (1) entnommen wurden. Diese beiden gleichzeitigen Referenzstandards sollten in jeden Versuch einbezogen werden, und die Ergebnisse sollten anhand der Kriterien als akzeptabel bewertet werden. Andernfalls sollten die Ursachen dafür ermittelt werden, dass die Kriterien nicht erfüllt werden (z. B. die Handhabung der Zellen sowie die Qualität und die Konzentration des Serums und der Antibiotika), und der Assay sollte wiederholt werden. Außerdem sollten die IC<sub>50</sub>-Werte eines Positivstoffs (Tamoxifen) berechnet werden. Die Ergebnisse sollten im annehmbaren Bereich liegen. Wenn die Akzeptanzkriterien erfüllt werden, ist die konsistente Verwendung von Materialien für die Kultivierung der Zellen von entscheidender Bedeutung, um eine möglichst geringe Variabilität der IC<sub>50</sub>-Werte sicherzustellen. Die beiden gleichzeitigen Referenzstandards, die in jeden (unter identischen Bedingungen u. a. in Bezug auf die Materialien, die Passagenanzahl und die Labortechniker durchzuführenden) Versuch einbezogen werden sollten, können die Empfindlichkeit des Assays sicherstellen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2

**Kriterien und Werte im annehmbaren Bereich für die beiden Referenzstandards beim ER-Antagonisten-Assay**

Name	Kriterium	LogIC <sub>50</sub>	Prüfbereich
Tamoxifen CAS-Nr.: 10540-29-1	Positiv: IC <sub>50</sub> sollte berechnet werden.	-5,942    -7,596	10-10    10 <sup>-5</sup> M
Flutamid CAS-Nr.: 13311-84-7	Negativ: IC <sub>30</sub> sollte nicht berechnet werden.	—	10 <sup>-10</sup>    10 <sup>-5</sup> M

#### *Positivkontrolle und Vehikelkontrolle*

16. Die Positivkontrolle (PK) des ER-Agonisten-Assays (1 nM E2) und des ER-Antagonisten-Assays (10 µM TAM) sollte pro Platte mindestens dreimal geprüft werden. Auch das zur Auflösung einer Prüfchemikalie verwendete Vehikel ist als Vehikelkontrolle (VK) pro Platte mindestens dreimal zu prüfen. Wenn bei der PK nicht die Prüfchemikalie als Vehikel verwendet wird, sollte zusätzlich zu dieser VK auf der Platte mit der PK eine weitere VK ebenfalls mindestens dreimal geprüft werden.

#### *Qualitätskriterien für den ER-Agonisten-Assay*

17. Die mittlere Luciferase-Aktivität der Positivkontrolle (1 nM E2) sollte mindestens das Vierfache der mittleren VK auf jeder Platte betragen. Dieses Kriterium wird anhand der Zuverlässigkeit der Endpunktwerte der Validierungsstudie geprüft. (In der Regel werden Werte zwischen dem 4- und dem 30-Fachen ermittelt.)
18. Bei der Qualitätskontrolle für diesen Assay sollte die n-fache Induktion entsprechend dem PC10-Wert der gleichzeitigen PK (1 nM E2) größer als 1+2 SD des Wertes der n-fachen Induktion (= 1) der gleichzeitigen VK sein. Bei der Priorisierung kann der PC10-Wert die erforderliche Datenanalyse im Vergleich zu einer statistischen Analyse erleichtern. Eine statistische Analyse liefert wichtige Informationen, ist aber nicht als quantitativer Parameter hinsichtlich eines konzentrationsabhängigen Potenzials zu betrachten und für Priorisierungszwecke daher weniger hilfreich.

#### *Qualitätskriterien für den ER-Antagonisten-Assay*

19. Die mittlere Luciferase-Aktivität der Spike-in-Kontrolle (25 nM E2) sollte mindestens das 4-Fache der mittleren VK auf jeder Platte betragen. Dieses Kriterium wird anhand der Zuverlässigkeit der Endpunktwerte der Validierungsstudie geprüft.
20. Bei der Qualitätskontrolle des Assays sollte die relative transkriptionelle Aktivierung (RTA) von 1 nM E2 mehr als 100 % betragen; die RTA von 1 µM 4-Hydroxytamoxifen (OHT) sollte bei weniger als 40,6 % und die RTA von 100 µM Digonin (Dig) bei weniger als 0 % liegen.

Zum Nachweis der Eignung des Labors siehe Nummer 14 und Tabellen 3 und 4 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ bei dieser Prüfmethode.

#### **Vehikel**

21. Als gleichzeitige VK sollte Dimethylsulfoxid (DMSO) bzw. ein anderes geeignetes Lösungsmittel in der Konzentration verwendet werden, die auch bei den verschiedenen Positiv- und Negativkontrollen sowie bei den Prüfchemikalien zum Einsatz kommt. Die Prüfchemikalien sollten in einem Lösungsmittel gelöst werden, das die betreffende Prüfchemikalie löst und sich mit dem Zellmedium mischt. Geeignete Vehikel sind Wasser, Ethanol (Reinheit 95-100 %) und DMSO. Wenn DMSO verwendet wird, sollte die Konzentration höchstens 0,1 % (v/v) betragen. Bei jedem Vehikel sollte nachgewiesen werden, dass die verwendete Höchstmenge nicht zytotoxisch ist und keine Auswirkungen auf den Assay hat.

#### **Zubereitung der Prüfchemikalien**

22. Im Allgemeinen sollten die Prüfchemikalien in DMSO oder in einem anderen geeigneten Lösungsmittel gelöst und mit diesem Lösungsmittel seriell im üblichen Verhältnis von 1:10 gelöst werden, um Lösungen zur Verdünnung mit Medien zuzubereiten.

#### **Löslichkeit und Zytotoxizität: Hinweise zur Dosisfindung**

23. Mit einem Vorversuch sollte der geeignete Konzentrationsbereich der zu prüfenden Chemikalie ermittelt und festgestellt werden, ob bei der Prüfchemikalie Probleme hinsichtlich der Löslichkeit und der Zytotoxizität bestehen. Zunächst werden die Chemikalien bis zur maximalen Konzentration von 1 µl/ml, 1 mg/ml bzw. 1 mM geprüft. (Maßgeblich ist der niedrigste Wert.) Je nach dem im Vorversuch festgestellten Grad der Zytotoxizität bzw. nach der festgestellten mangelnden Löslichkeit sollte die Prüfchemikalie beim ersten gültigen Prüflauf in logarithmischen, seriellen Verdünnungen beginnend mit der maximal annehmbaren Konzentration (1 mM, 100 µM, 10 µM usw.) untersucht werden. Die Bildung von Trübungen oder Niederschlag sowie eine festgestellte Zytotoxizität sollten protokolliert werden. Die Konzentrationen im zweiten und ggf. im dritten Prüflauf sollten ggf. angepasst werden, um die Konzentrations-Reaktions-Kurve besser zu beschreiben und um Konzentrationen zu vermeiden, bei denen keine Lösung mehr erfolgt oder eine übermäßige Zytotoxizität induziert wird.

24. Bei ER-Agonisten und -Antagonisten kann eine zunehmende Zytotoxizität die typische sigmoidale Reaktion erheblich verändern oder vollständig beseitigen und sollte daher bei der Auswertung der Daten berücksichtigt werden. Für die Prüfungen sollten Methoden zur Untersuchung der Zytotoxizität verwendet werden, aus denen Informationen für eine Zellviabilität von 80 % zu entnehmen sind. Die Untersuchung sollte mit einem nach Laborerfahrungen geeigneten Assay durchgeführt werden.
25. Wenn in der Zytotoxizitätsprüfung festgestellt wird, dass die Konzentration der Prüfchemikalie die Anzahl der Zellen um 20 % oder mehr reduziert hat, ist die betreffende Konzentration als zytotoxisch zu betrachten, und Verdünnungen ab der zytotoxischen Konzentration aufwärts sollten bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden.

#### Chemische Exposition und Anordnung auf der Assay-Platte

26. Das Verfahren für chemische Verdünnungen (Schritte 1 und 2) sowie die Exposition der Zellen (Schritt 3) können wie folgt durchgeführt werden:

Schritt 1: Jede Prüfchemikalie sollte seriell in DMSO oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel verdünnt und in die Wells einer Mikrotiterplatte gegeben werden, um die endgültigen seriellen Verdünnungen herzustellen, die in der Dosisfindungsstudie als maßgeblich ermittelt wurde (in der Regel z. B. 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM und 10 pM ( $10^{-3}$ - $10^{-11}$  M)) bei dreifacher Prüfung.

Schritt 2: Chemische Verdünnung: Zunächst sind 1,5 µl der Prüfchemikalie im Lösungsmittel auf ein Medienvolumen von 500 µl zu verdünnen.

Schritt 3: Exposition der Zellen gegenüber der Chemikalie: 50 µl der (in Schritt 2 zubereiteten) Verdünnung mit dem Medium werden in einen Assay-Well mit  $10^4$  Zellen/100 µl/Well gegeben.

Für jedes Well wird ein endgültiges Medienvolumen von 150 µl als erforderlich empfohlen. Die zu untersuchenden Proben und Referenzstandards können angeordnet werden wie in den Tabellen 3 und 4 angegeben.

Tabelle 3

#### Beispiel für die Anordnung von Konzentrationen der Referenzstandards auf der Assay-Platte des ER-Agonisten-Assays

Reihe	17α-Methyltestosteron			Chemikalie			17α-Estradiol			E2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konz. 1 (10 µM)	→	→	100 µM	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→
B	Konz. 2 (1 µM)	→	→	10 µM	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	Konz. 3 (100 nM)	→	→	1 µM	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	Konz. 4 (10 nM)	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	Konz. 5 (1 nM)	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	Konz. 6 (100 pM)	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	Konz. 7 (10 pM)	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

VK: Vehikelkontrolle (0,1 % DMSO); PK: Positivkontrolle (1 nM E2)

27. Die Referenzstandards (E2, 17 $\alpha$ -Estradiol, 17-Methyltestosteron und Corticosteron) sollten bei jedem Prüflauf untersucht werden (Tabelle 3). PK-Wells mit 1 nM E2, die in ausschließlich mit DMSO (oder mit einem anderen geeigneten Lösungsmittel) behandelten E2- und VK-Wells eine maximale Induktion verursachen können, sollten in alle Assay-Platten einbezogen werden (Tabelle 4). Wenn in einem Versuch Zellen unterschiedlicher Herkunft (unterschiedliche Passagenzahl, unterschiedliche Chargen usw.) verwendet werden, sollten die Referenzstandards für die jeweilige Herkunft der Zellen geprüft werden.

Tabelle 4

**Beispiel für die Anordnung von Konzentrationen der Prüf- und der Kontrollchemikalien auf der Assay-Platte des ER-Agonisten-Assays**

Reihe	Prüfchemikalie 1			Prüfchemikalie 2			Prüfchemikalie 3			Prüfchemikalie 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konz. 1 (10 $\mu$ M)	→	→	1 mM	→	→	1 $\mu$ M	→	→	10 nM	→	→
B	Konz. 2 (1 $\mu$ M)	→	→	100 $\mu$ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	Konz. 3 (100 nM)	→	→	10 $\mu$ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	Konz. 4 (10 nM)	→	→	1 $\mu$ M	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	Konz. 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	Konz. 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0,1 pM	→	→
G	Konz. 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0,01 pM	→	→
H	VK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

VK: Vehikelkontrolle (0,1 % DMSO); PK: Positivkontrolle (1 nM E2)

Tabelle 5

**Beispiel für die Anordnung von Konzentrationen der Referenzstandards auf der Assay-Platte des ER-Antagonisten-Assays**

Reihe	Tamoxifen			Flutamid			Prüfchemikalie 1			Prüfchemikalie 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konz. 1 (10 $\mu$ M)	→	→	10 $\mu$ M	→	→	10 $\mu$ M	→	→	10 $\mu$ M	→	→
B	Konz. 2 (1 $\mu$ M)	→	→	1 $\mu$ M	→	→	1 $\mu$ M	→	→	1 $\mu$ M	→	→
C	Konz. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	Konz. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	Konz. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	Konz. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 $\mu$ M OHT	→	→	100 $\mu$ M Dig	→	→
H	VK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

VK: Vehikelkontrolle (0,1 % DMSO), PK: Positivkontrolle (1 nM E2), OHT: 4-Hydroxytamoxifen, Dig: Digitonin.

 = gespikt mit 25 pM E2



28. Um die Antagonisten-Aktivität von Chemikalien zu ermitteln, sollten in Reihen von A bis G angeordnete Assay-Wells mit 25 pM E2 gespikt werden. Bei jedem Prüflauf sollten auch die Referenzstandards (Tamoxifen und Flutamid) geprüft werden. Jede Assay-Platte sollte mit 1 nM E2 behandelte PK-Wells, die als Qualitätskontrolle für die hER $\alpha$ -HeLa-9903-Zelllinie dienen kann, mit DMSO (oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel) behandelte VK-Wells, Wells mit 0,1 % DMSO, die zusätzlich zum Spiken von E2 durch Zugabe von DMSO entsprechend der Spike-in-Kontrolle behandelt wurden, mit der Endkonzentration von 1  $\mu$ M OHT behandelte Wells und mit 100  $\mu$ M Dig behandelte Wells enthalten (Tabelle 5). Die nächste Assay-Platte sollte die gleiche Anordnung aufweisen, allerdings ohne die Wells mit den Referenzstandards (Tabelle 6). Wenn in einem Versuch Zellen unterschiedlicher Herkunft (unterschiedliche Passagenzahl, unterschiedliche Chargen usw.) verwendet werden, sollten die Referenzstandards für die jeweilige Herkunft der Zellen geprüft werden.

Tabelle 6

**Beispiel für die Anordnung von Konzentrationen der Prüf- und der Kontrollchemikalien auf der Assay-Platte des ER-Antagonisten-Assays**

Reihe	Prüfchemikalie 1			Prüfchemikalie 2			Prüfchemikalie 3			Prüfchemikalie 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Konz. 1 (10 $\mu$ M)	→	→	10 $\mu$ M	→	→	10 $\mu$ M	→	→	10 $\mu$ M	→	→
B	Konz. 2 (1 $\mu$ M)	→	→	1 $\mu$ M	→	→	1 $\mu$ M	→	→	1 $\mu$ M	→	→
C	Konz. 3 (100 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
D	Konz. 4 (10 nM)	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
E	Konz. 5 (1 nM)	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→
F	Konz. 6 (100 pM)	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→
G	0,1 % DMSO	→	→	→	→	→	1 $\mu$ M OHT	→	→	100 $\mu$ M Dig	→	→
H	VK	→	→	→	→	→	PK	→	→	→	→	→

VK: Vehikelkontrolle (0,1 % DMSO), PK: Positivkontrolle (1 nM E2), OHT: 4-Hydroxytamoxifen, Dig: Digitonin.

→ : gespikt mit 25 pM E2

29. Dass keine Randeffekte auftreten, sollte ggf. bestätigt werden, und wenn das Auftreten von Randeffekten als möglich betrachtet wird, sollte die Anordnung der Wells auf den Platten geändert werden, um diese Effekte zu vermeiden. Beispielsweise könnte eine Anordnung gewählt werden, bei der die Rand-Wells nicht berücksichtigt werden.
30. Nach Zugabe der Chemikalien sollten die Assay-Platten 20-24 Stunden in einem Inkubator mit 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 ± 1 °C inkubiert werden, um die Bildung von Reporter-Genprodukten zu induzieren.
31. Bei stark flüchtigen Verbindungen ist besondere Vorsicht geboten. Bei diesen Verbindungen kann es bei unmittelbar benachbarten Kontroll-Wells zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Dies sollte im Hinblick auf erwartete und historische Kontrollwerte beachtet werden. In den seltenen Fällen, in denen die Flüchtigkeit problematisch sein könnte, können Plattenversiegelungen helfen, einzelne Wells während der Prüfung zu isolieren. Dies ist in den betreffenden Fällen zu empfehlen.
32. Um unabhängige Ergebnisse sicherzustellen, sollten die Hauptprüfungen einer Chemikalie an unterschiedlichen Tagen wiederholt werden.

#### Luciferase-Assay

33. Für diesen Assay kann ein im Handel erhältliches Reagens für Luciferase-Assays [z. B. Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega, E2510 oder gleichwertig)] oder ein Luciferase-Assay-Standardsystem (z. B. Promega, E1500 oder gleichwertig) verwendet werden, wenn das Reagens die Akzeptanzkriterien erfüllt. Die Reagenzien für den Assay sollten nach der Empfindlichkeit des zu verwendenden Luminometers ausgewählt werden. Wenn das Luciferase-Assay-Standardsystem verwendet wird, sollte vor der Zugabe des Substrats der Luciferase Zellkultur-Lysispuffer (Cell Culture Lysis Reagent) (z. B. Promega, E1531 oder gleichwertig) hinzugegeben werden. Die Zugabe des Luciferase-Reagens sollte nach den Herstelleranweisungen erfolgen.

## ANALYSE DER DATEN

**ER-Agonisten-Assay**

34. Zur Erzielung einer relativen transkriptionellen Aktivität bei der PK (1 nM E2) können bei einem ER-Agonisten-Assay die Lumineszenzsignale derselben Platte in den folgenden Schritten analysiert werden (wobei auch gleichwertige mathematische Verfahren annehmbar sind):

Schritt 1: Für die VK wird der Mittelwert berechnet.

Schritt 2: Der Mittelwert der VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen, um die Daten zu normalisieren.

Schritt 3: Für die normalisierte PK wird der Mittelwert berechnet.

Schritt 4: Der normalisierte Wert jedes einzelnen Wells auf der Platte wird durch den Mittelwert der normalisierten PK (PK = 100 %) geteilt.

Der endgültige Wert der einzelnen Wells ist die relative transkriptionelle Aktivität dieses Wells im Vergleich zur Reaktion der PK.

Schritt 5: Der Mittelwert der relativen transkriptionellen Aktivität der einzelnen Konzentrationsgruppen der Prüfchemikalie wird berechnet. Bei der Reaktion sind zwei Dimensionen zu beachten: die gemittelte transkriptionelle Aktivität (Reaktion) und die Konzentration, bei der die Reaktion auftritt (siehe folgender Abschnitt).

**Hinweise zur Induktion bei EC<sub>50</sub>, PC<sub>50</sub> und PC<sub>10</sub>**

35. Zur Berechnung des EC<sub>50</sub>-Werts wird die vollständige Konzentrations-Reaktions-Kurve benötigt. Die Erstellung dieser Kurve ist aufgrund von Begrenzungen des Prüfkonzentrationsbereichs (beispielsweise infolge von Zytotoxizität oder von Problemen hinsichtlich der Löslichkeit) allerdings u. U. nicht immer möglich oder praktikabel. Da der EC<sub>50</sub>-Wert und die maximale Induktion (entsprechend dem Höchstwert der Hill-Gleichung) relevante Parameter sind, sollten diese Parameter nach Möglichkeit angegeben werden. Zur Berechnung des EC<sub>50</sub>-Wertes und der maximalen Induktion sollte eine geeignete Statistik-Software verwendet werden (z. B. Graphpad Prism). Wenn die Konzentrations-Reaktions-Daten für die Hill-Logistik-Gleichung verwendet werden können, sollte der EC<sub>50</sub>-Wert mit der folgenden Gleichung (7) berechnet werden:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top}-\text{Bottom}) / (1+10 \exp ((\log \text{EC}_{50} -X) \times \text{Hillslope})), \text{ wobei gilt:}$$

X = Logarithmus der Konzentration und

Y = Reaktion; Y beginnt beim unteren Niveau (Bottom) und steigt in einer Sigmoidkurve bis zum oberen Niveau (Top). Das untere Niveau ist bei der Hill-Logistik-Gleichung gleich Null.

36. Bei den Prüfchemikalien ist jeweils Folgendes anzugeben:

RPCMax (die durch eine Prüfchemikalie induzierte maximale Reaktion, ausgedrückt als Prozentanteil der durch 1 nM E2 auf derselben Platte induzierten Reaktion) sowie PC<sub>Max</sub> (die Konzentration bei RPCMax) und

(bei positiven Chemikalien) die Konzentrationen, bei denen PC10 und ggf. PC50 induziert wird.

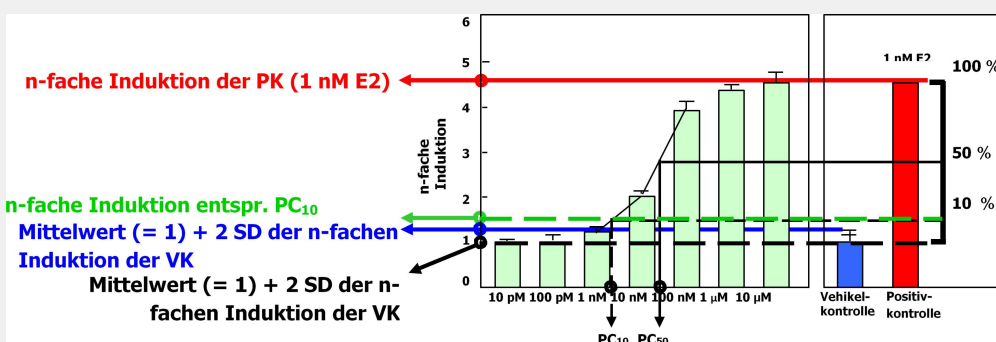
37. Der PCx-Wert kann durch Interpolation zwischen zwei Punkten auf der XY-Koordinate, einem unmittelbar über und einem unmittelbar unter einem PCx-Wert, berechnet werden. Wenn die Datenpunkte unmittelbar über und unter dem PCx-Wert die Koordinaten (a,b) und (c,d) haben, kann der PCx-Wert mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$\log[\text{PCx}] = \log[c] + (x-d)/(d-b)$$

38. Erläuterungen zu den PK-Werten sind der folgenden Abbildung 1 zu entnehmen.

Abbildung 1

Beispiel zur Ableitung von PK-Werten – Die PK (1 nM E2) wird auf jeder Assay-Platte berücksichtigt.



#### ER- Antagonisten-Assay

39. Zur Erzielung einer relativen transkriptionellen Aktivität (RTA) der Spike-in-Kontrolle (25 pM E2) können bei einem ER-Antagonisten-Assay die Lumineszenzsignale derselben Platte in den folgenden Schritten analysiert werden (wobei auch gleichwertige mathematische Verfahren annehmbar sind):

Schritt 1: Für die VK wird der Mittelwert berechnet.

Schritt 2: Der Mittelwert der VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen, um die Daten zu normalisieren.

Schritt 3: Für die normalisierte Spike-in-Kontrolle wird der Mittelwert berechnet.

Schritt 4: Der normalisierte Wert jedes einzelnen Wells auf der Platte wird durch den Mittelwert der normalisierten Spike-in-Kontrolle (Spike-in-Kontrolle = 100 %) geteilt.

Der endgültige Wert der einzelnen Wells ist die relative transkriptionelle Aktivität dieses Wells im Vergleich zur Reaktion der Spike-in-Kontrolle.

Schritt 5: Der Mittelwert der relativen transkriptionellen Aktivität der einzelnen Behandlungen wird berechnet.

#### Hinweise zur Induktion bei IC<sub>30</sub> und IC<sub>50</sub>

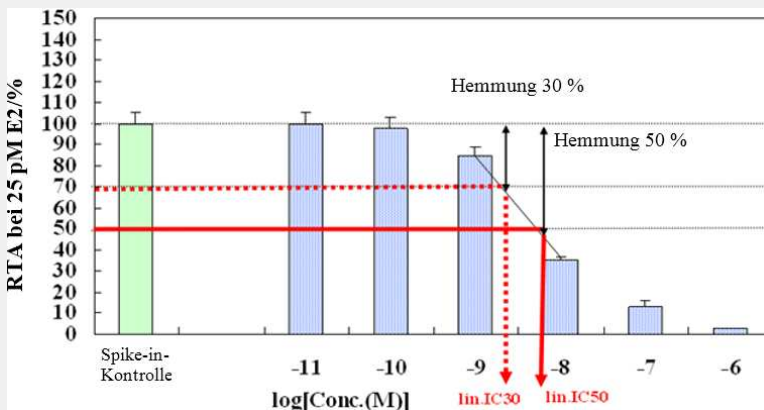
40. Bei positiven Chemikalien sollten die Konzentrationen angegeben werden, bei denen IC<sub>30</sub> und ggf. IC<sub>50</sub> induziert wird.

41. Der IC<sub>x</sub>-Wert kann durch Interpolation zwischen zwei Punkten auf der XY-Koordinate, einem unmittelbar über und einem unmittelbar unter einem IC<sub>x</sub>-Wert, berechnet werden. Wenn die Datenpunkte unmittelbar über und unter dem IC<sub>x</sub>-Wert die Koordinaten (c,d) und (a,b) haben, kann der IC<sub>x</sub>-Wert mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$\text{lin IC}_x = a - (b - (100 - x)) \cdot (a - c) / (b - d)$$

Abbildung 2

Beispiel zur Ableitung von IC-Werten – Der Spike (25 pM E2) wird auf jeder Assay-Platte berücksichtigt.



RTA: relative transkriptionelle Aktivität

42. Die Ergebnisse sollten auf zwei (oder drei) unabhängigen Prüfläufen beruhen. Wenn bei zwei Prüfläufen vergleichbare und daher auch reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden, ist ein dritter Prüflauf nicht erforderlich. Ergebnisse können dann akzeptiert werden, wenn die folgenden Anforderungen erfüllt sind:

- Die Ergebnisse erfüllen die Akzeptanzkriterien (Nummern 14-20)
- und sind reproduzierbar.

**Kriterien für die Auswertung von Daten**

Tabelle 7

**Kriterien für ein positives oder ein negatives Ergebnis beim ER-Agonisten-Assay**

Positiv	Wenn $RPC_{Max}$ bei mindestens zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen größer oder gleich 10 % der Reaktion der Positivkontrolle ist.
Negativ	Wenn $RPC_{Max}$ bei zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen nicht mindestens gleich 10 % der Reaktion der Positivkontrolle ist.

gestrichen - siehe Teil 0

Tabelle 8

**Kriterien für ein positives oder ein negatives Ergebnis beim ER-Antagonisten-Assay**

Positiv	Wenn bei mindestens zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen IC <sub>30</sub> berechnet wird.
Negativ	Wenn IC <sub>30</sub> bei zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen nicht berechnet wird.

43. Kriterien zur Auswertung der Daten sind den Tabellen 7 und 8 zu entnehmen. Positive Ergebnisse werden sowohl durch die Größenordnung der Wirkung als auch durch die Konzentration beschrieben, bei der die Wirkung eintritt. Die Beschreibung von Ergebnissen in Konzentrationen bei denen 50 % (PC<sub>50</sub>) bzw. 10 % (PC<sub>10</sub>) der PK-Werte beim Agonisten-Assay erreicht und 50 % (IC<sub>50</sub>) bzw. 30 % (IC<sub>30</sub>) des Wertes der Spike-in-Kontrolle beim Antagonisten-Assay gehemmt werden, erfüllt beide Anforderungen. Eine Prüfchemikalie wird jedoch als positiv eingestuft, wenn die durch die Prüfchemikalie induzierte maximale Reaktion (RPC<sub>Max</sub>) bei mindestens zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen größer oder gleich 10 % der Reaktion der PK ist. Als negativ werden Prüfchemikalien eingestuft, wenn RPC<sub>Max</sub> in zwei von zwei oder zwei von drei Prüfläufen nicht mindestens 10 % der Reaktion der Positivkontrolle beträgt.
44. Die Berechnungen von PC10, PC50 und PCMax beim ER-Agonisten-Assay und von IC30 und IC50 beim ER-Antagonisten-Assay kann anhand einer Tabelle vorgenommen werden, die auf der öffentlichen Website der OECD <sup>(2)</sup> mit der Prüfrichtlinie bereitgestellt wird.
45. Es sollte hinreichend sein, die PC10- oder PC50- bzw. IC30- oder IC50-Werte mindestens zweimal zu bestimmen. Wenn die ermittelten Normalwerte von Daten im selben Konzentrationsbereich jedoch Unterschiede mit einem unannehmbar hohen Variationskoeffizienten (VK, %) aufweisen, können die Daten nicht als zuverlässig betrachtet werden. In diesem Fall sollte untersucht werden, worauf die hohe Variabilität zurückzuführen ist. Der VK der dreifachen Rohdaten (d. h. der Daten zur Leuchtdichte) der zur Berechnung von PC10 verwendeten Datenpunkte sollte weniger als 20 % betragen.
46. Die Erfüllung der Akzeptanzkriterien deutet darauf hin, dass das Assay-System ordnungsgemäß funktioniert. Dies gewährleistet jedoch nicht, dass ein bestimmter Prüflauf tatsächlich exakte Daten ergibt. Die Wiederholung der Ergebnisse des ersten Prüflaufs ist die beste Bestätigung dafür, dass exakte Daten ermittelt wurden.
47. Wenn beim ER-Agonisten-Assay über die für die Screening- und Priorisierungszwecke dieser Prüfrichtlinie benötigten Daten zu positiven Prüfchemikalien hinaus weitere Informationen benötigt werden (insbesondere für PC<sub>10</sub>- bis PC<sub>49</sub>-Chemikalien sowie bei Chemikalien, bei denen vermutet wird, dass es zu einer Überstimulation der Luciferase kommt), kann mit einem ER $\alpha$ -Antagonisten (siehe Anlage 2.1) bestätigt werden, dass die beobachtete Luciferase-Aktivität ausschließlich eine ER $\alpha$ -spezifische Reaktion ist.

**PRÜFBERICHT**

48. Siehe Nummer 20 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“.

**LITERATUR**

- (1) OECD (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (2) Escande, A., u. a. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
- (3) Kuiper, G.G., u. a. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.

<sup>(2)</sup> <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

- (4) Spaepen, M., u. a. (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, *FEMS Microbiol. Lett.*, 78(1), 89-94.
- (5) Kobayashi, H., u. a. (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769-771.
- (6) Dussurget, O. und Roulland-Dussoix, D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3), 953-959.
- (7) De Lean, A., Munson, P.J. und Rodbard, D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, *Am. J. Physiol.*, 235, E97-E102.

## Anlage 2.1

## FALSCH POSITIVE: BEWERTUNG VON NICHT DURCH REZEPTOREN VERMITTELTEN LUMINISZENZSIGNALEN

1. Falsch positive Ergebnisse beim ER-Agonisten-Assay können auf eine nicht durch ER vermittelte Aktivierung des Luciferase-Gens, auf eine direkte Aktivierung des Genprodukts oder eine sonstige Fluoreszenz zurückzuführen sein. Diese Wirkungen äußern sich in einer unvollständigen oder ungewöhnlichen Dosis-Reaktions-Kurve. Wenn solche Effekte vermutet werden, sollte der Effekt eines ER-Antagonisten (z. B. 4-Hydroxytamoxifen (OHT) in einer nicht toxischen Konzentration) auf die Reaktion untersucht werden. Der reine Antagonist ICI 1827 80 ist für diesen Zweck möglicherweise nicht geeignet, da eine hinreichende Konzentration von ICI 1827 80 eine Reduzierung des VK-Werts bewirken kann und da dies die Datenanalyse beeinträchtigt.
2. Um die Validität dieses Ansatzes sicherzustellen, sollten auf derselben Platte die folgenden Parameter geprüft werden:
  - Agonisten-Aktivität der unbekanntes Chemikalie mit/ohne 10  $\mu$ M OHT,
  - VK (dreifach),
  - OHT (dreifach),
  - 1 nM E2 (dreifach) als Agonisten-PK und
  - 1 nM E2 + OHT (dreifach).

**Kriterien für die Auswertung von Daten**

Hinweis: Alle Wells sollten mit dem Vehikel in der gleichen Konzentration behandelt werden.

- Wenn die Agonisten-Aktivität der unbekanntes Chemikalie durch die Behandlung mit dem ER-Antagonisten NICHT beeinträchtigt wird, ist sie als „negativ“ einzustufen.
- Wird die Agonisten-Aktivität der unbekanntes Chemikalie vollständig gehemmt, sind die Entscheidungskriterien zu berücksichtigen.
- Ist die Agonisten-Aktivität bei der niedrigsten Konzentration größer oder gleich der Reaktion bei PC10 ist, wird die unbekanntes Chemikalie mindestens in der Größenordnung der Reaktion bei PC10 gehemmt. Die Differenz der Reaktionen zwischen den nicht behandelten und den mit dem ER-Antagonisten behandelten Wells wird berechnet. Diese Differenz ist als tatsächliche Reaktion zu betrachten und sollte zur Berechnung der betreffenden Parameter verwendet werden, damit über die Einstufung entschieden werden kann.

**Analyse der Messdaten**

Der Leistungsstandard wird geprüft.

Der VK zwischen unter gleichen Bedingungen behandelten Wells wird geprüft.

1. Der Mittelwert der VK wird berechnet.
2. Vom Wert der einzelnen **nicht** mit OHT behandelten Wells wird der Mittelwert der VK abgezogen.
3. Der OHT-Mittelwert wird berechnet.
4. Vom Wert der einzelnen mit OHT behandelten Wells wird der Mittelwert der VK abgezogen.
5. Der Mittelwert der PK wird berechnet.
6. Die relative transkriptionelle Aktivität aller übrigen Wells wird bezogen auf die PK berechnet.

## Anlage 2.2

## ZUBEREITUNG VON MIT DEXTRANBESCHICHTETER AKTIVKOHLE (DCC) BEHANDELTEM SERUM

1. Die Behandlung von Serum mit dextranbeschichteter Aktivkohle (DDC) ist ein allgemeines Verfahren zur Entfernung von Östrogenverbindungen aus zu einem Zellmedium hinzugegebenem Serum, um verfälschte Reaktionen aufgrund von im Serum verbliebenem Östrogen auszuschließen. Mit diesem Verfahren können 500 ml fetales Rinderserum (FBS) behandelt werden.

**Elemente**

2. Für das Verfahren werden die folgende Ausrüstung und die folgenden Materialien benötigt:

*Materialien*

Aktivkohle

Dextran

Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O)

Saccharose

1 M HEPES-Pufferlösung) (pH 7,4)

Mit einem Filtersystem hergestelltes ultrareines Wasser

*Ausrüstung*

Autoklaviertes Glasgefäß mit geeigneter Größe, normale Laborzentrifuge (die auf eine Temperatur von 4 °C eingestellt werden kann)

**Verfahren**

3. Das folgende Verfahren wird für die Verwendung von 50-ml-Zentrifugenröhrchen angepasst:

[Tag 1] Zur Zubereitung einer Suspension mit dextranbeschichteter Aktivkohle wird 1 l ultrareines Wasser mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 M Saccharose, 2,5 g Aktivkohle, 0,25 g Dextran und 5 mM HEPES gemischt, bei 4 °C umgerührt und über Nacht stehen gelassen.

[Tag 2] Die Suspension wird in 50-ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 4 °C 10 Minuten mit 10 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, und die Hälfte des Aktivkohlesediments zur Verwendung an Tag 3 bei 4 °C aufbewahrt. Die andere Hälfte der Aktivkohle wird mit FBS suspendiert, das zur Vermeidung von Ausfällungen vorsichtig aufgetaut, 30 Minuten bei 56 °C durch Wärme inaktiviert und dann in ein autoklaviertes Glasgefäß (z. B. einen Erlenmeyer-Kolben) gegeben wurde. Diese Suspension wird über Nacht bei 4 °C vorsichtig umgerührt.

[Tag 3] Die Suspension wird in Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 4 °C 10 Minuten mit 10 000 rpm zentrifugiert. Das FBS wird entnommen und in das an Tag 2 zubereitete und aufbewahrte frische Aktivkohlesediment gegeben. Das Aktivkohlesediment wird suspendiert und die erhaltene Suspension vorsichtig in einem autoklavierten Glasgefäß über Nacht bei 4 °C umgerührt.

[Tag 4] Die Suspension wird 10 Minuten bei einer Temperatur von 4 °C mit 10 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand durch einen sterilen 0,2-µm-Filter filtriert. Dieses mit DCC behandelte FBS ist bei -20 °C zu lagern und kann dann innerhalb eines Zeitraums von bis zu einem Jahr verwendet werden.



## Anlage 3

## VM7LUC-ER-TA-ASSAY ZUR BESTIMMUNG VON ÖSTROGENREZEPTOR-AGONISTEN UND -ANTAGONISTEN

## AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

1. Für diesen Assay wird die VM7Luc4E2-Zelllinie verwendet.<sup>(1)</sup> Diese Zelllinie wurde vom National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) und vom Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) validiert (1). Die VM7Luc-Zelllinien exprimieren hauptsächlich den endogenen ER $\alpha$  sowie in geringerer Menge den endogenen ER $\beta$  (2) (3) (4).
2. Dieser Assay ist bei zahlreichen Stoffen anwendbar, die in Dimethylsulfoxid (DMSO; CASRN 67-68-5) gelöst werden können, nicht mit DMSO oder mit dem Zellkulturmedium reagieren und bei der zu untersuchenden Konzentration nicht zytotoxisch wirken. Wenn DMSO nicht verwendet werden kann, kommen auch andere Vehikel wie beispielsweise Ethanol oder Wasser in Betracht (Nummer 12). Angesichts der nachgewiesenen Leistungsfähigkeit des VM7Luc-ER-TA-(Ant)agonisten-Assays ist davon auszugehen, dass mit diesem Assay generierte Daten Aufschluss über durch ER vermittelte Wirkungsmechanismen geben und bei der Priorisierung von Stoffen für weitere Untersuchungen berücksichtigt werden können.
3. Dieser Assay wurde speziell zum Nachweis von hER $\alpha$  und einer durch hER $\beta$  vermittelten TA anhand einer Messung der Chemilumineszenz als Endpunkt entwickelt. Die Berücksichtigung der Chemilumineszenz in Bioassays ist allgemein üblich, da die Lumineszenz ein ausgeprägtes Signal-Rausch-Verhältnis ergibt. Die Aktivität der Leuchtkäfer-Luciferase bei zellbasierten Assays kann jedoch mit der Aktivität von Stoffen verwechselt werden, die das Luciferase-Enzym hemmen und infolge der Proteinstabilisierung sowohl eine erkennbare Hemmung als auch eine erhöhte Lumineszenz bewirken. Außerdem wurden bei einige luciferasebasierten EN-Reporter-Gen-Assays bei Phytoöstrogenkonzentrationen von mehr als 1  $\mu$ M infolge der Überaktivierung des Luciferase-Reporter-Gens Lumineszenzsignale festgestellt, die nicht durch Rezeptoren vermittelt wurden (9) (11). Die Dosis-Reaktions-Kurve zeigt, dass die tatsächliche Aktivierung des ER-Systems bei niedrigeren Konzentrationen erfolgt; bei stabil transfizierten ER-TA-Assay-Systemen muss die Luciferase-Expression bei hohen Konzentrationen von Phytoöstrogenen oder ähnlichen Verbindungen, bei denen vermutet wird, dass sie eine phytoöstrogenartige Überaktivierung des Luciferase-Reportergens verursachen, jedoch sorgfältig untersucht werden.
4. Vor der Verwendung dieses Assays für rechtliche Zwecke sollten die Abschnitte „ALLGEMEINE EINLEITUNG“ und „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ gelesen werden. Die in der vorliegenden Prüfmethode verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

## PRINZIP DES ASSAYS (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

5. Mit dem Assay werden ER-Liganden-Bindungen nach einer Translokation des Rezeptor-Liganden-Komplexes an den Zellkern nachgewiesen. Im Zellkern geht der Rezeptor-Liganden-Komplex eine Bindung mit spezifischen DNA-Response-Elements ein und transaktiviert das Reporter-Gen (*luc*). Dadurch wird die Bildung von Luciferase angeregt und anschließend die Emission von Licht bewirkt, das mit einem Luminometer gemessen werden kann. Die Luciferase-Aktivität kann rasch und kostengünstig mit verschiedenen im Handel erhältlichen Test-Kits bewertet werden. Beim VM7Luc-ER-TA-Assay wird eine auf ER reagierende humane Brustadenokarzinom-Zelllinie (VM7) verwendet, die mit einem Leuchtkäfer-*luc*-Reporter-Genprodukt stabil transfiziert wurde, das kontrolliert durch vier Östrogen-Response-Elemente vor

<sup>(1)</sup> Vor Juni 2016 wurde diese Zelllinie als BG1Luc-Zelllinie bezeichnet. BG-1-Zellen wurden ursprünglich von Geisinger u. a. (1998) (12) beschrieben und später von Forschern am National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) charakterisiert (13). Erst vor verhältnismäßig kurzer Zeit wurde entdeckt, dass von BG-1-Zellen zwei Varianten existieren, die von Forschern verwendet werden: BG-1 Fr und BG-1 NIEHS. Eingehende Untersuchungen (u. a. DNA-Tests) der beiden Varianten von BG-1-Zelllinien durch Li u. a. (2014) (14) haben gezeigt, dass die Variante BG-1 Fr eine besondere Zelllinie war und dass die Variante BG-1 NIEHS, d. h. die ursprünglich zur Entwicklung des Assays verwendete Zelllinie, nicht die humane Ovarialkarzinom-Zelllinie BG1, sondern eine Variante der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF7 war. Die in dem Assay verwendete und ursprünglich als BG1Luc4E2 bezeichnete Zelllinie (15) wird nun als VM7Luc4E2 („V“ = Variante; „M7“ = MCF7-Zellen) bezeichnet. Entsprechend wird nun der Assay als VM7Luc-ER-TA-Assay bezeichnet. Die Zelllinien, auf denen der Assay beruht, haben also eine andere Herkunft. Für veröffentlichte Validierungsstudien und für die Verwendbarkeit und den Einsatz dieses Assays zur Untersuchung östrogen/antiöstrogen Chemikalien ist dies jedoch nicht von Bedeutung.

dem Maus-Mammatumovirus-Promoter (MMTV) angeordnet wurde, um anhand der *In-vitro*-Aktivität eines ER-Agonisten oder -Antagonisten Stoffe nachzuweisen. Dieser MMTV-Promotor bewirkt nur eine geringe Kreuzreaktivität mit anderen Steroiden und nicht steroiden Hormonen (8). Kriterien für die Auswertung der Daten werden in Nummer 41 eingehend beschrieben. Eine positive Reaktion ist kurz gesagt an einer Konzentrations-Reaktions-Kurve mit mindestens drei Punkten mit sich nicht überschneidenden Fehlerbalken (Mittelwert  $\pm$  SD) sowie an einer Änderung der Amplitude (normalisierte relative Lichteinheiten [RLU]) von mindestens 20 % des Höchstwerts für den betreffenden Referenzstandard (17 $\beta$ -Estradiol [E2; CASRN 50-28-2] beim Agonisten-Assay und Raloxifen HCl [Ral; CASRN 84449-90-1]/E2 beim Antagonisten-Assay) zu erkennen.

#### VERFAHREN

##### Zelllinie

6. Für den Assay sollte die stabil transfizierte VM7Luc4E2-Zelllinie verwendet werden. Diese Zelllinie kann gegenwärtig nur nach Maßgabe einer technischen Lizenzvereinbarung von der University of California, Davis, Kalifornien, USA <sup>(2)</sup> und von Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, North Carolina, USA, <sup>(3)</sup> bezogen werden.

##### Stabilität der Zelllinie

7. Um die Stabilität und die Integrität der Zelllinie aufrechtzuerhalten, sollten die Zellen im Erhaltungsmedium über mehr als eine Passage des tiefgefrorenen Materials vermehrt werden (Nummer 9). Die Kultivierung sollte sich auf höchstens 30 Passagen beschränken. Bei der VM7Luc4E2-Zelllinie werden für 30 Passagen etwa drei Monate benötigt.

##### Bedingungen für die Haltung der Zellkulturen und für die Plattierung

8. Die in der Guidance on Good Cell Culture Practice spezifizierten Verfahren (5) (6) sollten eingehalten werden, damit die Qualität aller Materialien und Methoden gewährleistet ist und die Integrität, die Validität und die Reproduzierbarkeit aller durchgeführten Arbeiten gewahrt werden.
9. VM7Luc4E2-Zellen werden im RPMI-1640-Medium ergänzt um 0,9 % Pen/Strep und 8,0 % fetales Rinderserum (FBS) in einem eigenen Inkubator für Gewebekulturen bei einer Temperatur von  $37 \pm 1$  °C,  $90 \pm 5$  % Luftfeuchtigkeit und  $5,0 \pm 1$  % CO<sub>2</sub>/Luft gehalten.
10. Nach Erreichen einer Konfluenz von ~80 % werden die VM7Luc4E2-Zellen subkultiviert und 48 Stunden in einer östrogenfreien Umgebung konditioniert, bevor sie in 96-Well-Platten plattiert werden, wo sie den Prüfchemikalien ausgesetzt und auf eine östrogenbedingte Induzierung einer Luciferase-Aktivität untersucht werden. Das östrogenfreie Medium (EFM) enthält Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM) ohne Phenolrot, ergänzt um 4,5 % mit Aktivkohle/Dextran behandeltes fetales Rinderserum (FBS), 1,9 % L-Glutamin und 0,9 % Pen/Strep. Die Kunststoffmaterialien sollten keine Östrogenaktivität entwickeln [siehe detailliertes Protokoll (7)].

##### Akzeptanzkriterien

11. Ob eine Prüfung akzeptiert oder verworfen wird, hängt von der Auswertung der Ergebnisse mit den Referenzstandards und mit den Kontrollen aller auf einer 96-Well-Platte durchgeführten Prüfungen ab. Jeder Referenzstandard wird in mehreren Konzentrationen geprüft, und von allen Konzentrationen der Referenzstandards und der Kontrollen

<sup>(2)</sup> Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, E-Mail:msdenison@ucdavis.edu, (530) 754-8649.

<sup>(3)</sup> Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, E-Mail: info@dioxins.com, Telefon: 919-688-4804, Telefax: 919-688-4404.

sind mehrere Proben verfügbar. Die Ergebnisse werden mit Qualitätskontrollen (QC) der Parameter verglichen, die aus Datenbanken mit historischen Daten zu Agonisten und Antagonisten abgeleitet wurden, die zum Nachweis ihrer Leistungsfähigkeit von den einzelnen Labors ermittelt wurden. Die Datenbanken mit historischen Datenbanken werden unter Eingabe der Werte der Referenzstandards und der Kontrollen kontinuierlich aktualisiert. Nach Änderungen der Ausrüstung oder der Laborbedingungen müssen die Datenbanken mit historischen Daten unter Umständen aktualisiert werden.

#### *Agonisten-Prüfung*

##### Dosisfindungsstudie

- Induktion: Zur Messung der Platteninduktion wird der höchste mittlere RLU-Wert (RLU = relative Lichteinheit) des E2-Referenzstandards durch den mittleren RLU-Wert der DMSO-Kontrolle geteilt. In der Regel wird eine 5-fache Induktion erreicht; als Akzeptanzkriterium gilt jedoch, dass die Induktion größer oder gleich der 4-fachen Induktion sein sollte.
- Ergebnisse der DMSO-Kontrolle: Die RLU-Werte der Lösungsmittelkontrolle sollten das 2,5-Fache der Standardabweichung des historischen mittleren RLU-Werts der Lösungsmittelkontrolle betragen.
- Eine Prüfung, die keines der beiden Akzeptanzkriterien erfüllt, sollte verworfen und wiederholt werden.

#### Hauptversuch

Der Hauptversuch beinhaltet Akzeptanzkriterien aus der Agonisten-Dosisfindungsstudie sowie Folgendes:

- Ergebnisse der Referenzstandards: Die Konzentrations-Reaktions-Kurve des E2-Referenzstandards sollte sigmoidal verlaufen und mindestens drei Werte im linearen Bereich enthalten.
- Ergebnisse der Positivkontrolle: Die RLU-Werte der Methoxychlor-Kontrolle sollten höher sein als der Mittelwert für DMSO zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung vom DMSO-Mittelwert.
- Eine Prüfung, die keines der Akzeptanzkriterien erfüllt, sollte verworfen und wiederholt werden.

#### *Antagonisten-Prüfung*

##### Dosisfindungsstudie

- Reduktion: Zur Messung der Plattenreduktion wird der höchste mittlere RLU-Wert des Ral/E2-Referenzstandards durch den mittleren RLU-Wert der DMSO-Kontrolle geteilt. In der Regel wird eine 5-fache Reduktion erreicht; als Akzeptanzkriterium gilt jedoch, dass die Reduktion größer oder gleich der 3-fachen Reduktion sein sollte.
- Ergebnisse der E2-Kontrolle: Die RLU-Werte der E2-Kontrolle sollten das 2,5-Fache der Standardabweichung des historischen mittleren RLU-Werts der E2-Kontrolle betragen.
- Ergebnisse der DMSO-Kontrolle: Die RLU-Werte der DMSO-Kontrolle sollten das 2,5-Fache der Standardabweichung des historischen mittleren RLU-Werts der Lösungsmittelkontrolle betragen.

- Eine Prüfung, die keines der Akzeptanzkriterien erfüllt, wird verworfen und wiederholt.

#### Hauptversuch

Der Hauptversuch beinhaltet Akzeptanzkriterien aus der Antagonisten-Dosisfindungsstudie sowie Folgendes:

- Ergebnisse der Referenzstandards: Die Konzentrations-Reaktions-Kurve des Ral/E2-Referenzstandards sollte sigmoidal verlaufen und mindestens drei Werte im linearen Bereich enthalten.
- Ergebnisse der Positivkontrolle: Die RLU-Werte der Tamoxifen/E2-Kontrolle sollten höher sein als der Mittelwert der E2-Kontrolle zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung vom Mittelwert der E2-Kontrolle.
- Eine Prüfung, die keines der Akzeptanzkriterien erfüllt, wird verworfen und wiederholt.

#### Referenzstandards, Positivkontrolle und Vehikelkontrolle

##### *Vehikelkontrolle (Agonisten- und Antagonisten-Assay)*

12. Das zur Auflösung einer Prüfchemikalie verwendete Vehikel sollte als Vehikelkontrolle geprüft werden. Bei der Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays wurde 1 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO, CASRN 67-68-5) verwendet (Nummer 24). Wenn ein anderes Vehikel als DMSO verwendet wird, sollten alle Referenzstandards, Kontrollen und Prüfchemikalien mit diesem Vehikel geprüft werden.

##### *Referenzstandard (Dosisfindung beim Agonisten-Assay)*

13. Als Referenzstandard wird E2 (CASRN 50-28-2) verwendet. Der Referenzstandard für die Dosisfindungsstudie besteht aus einer seriellen Verdünnung mit vier Konzentrationen E2 ( $1,84 \times 10^{-10}$ ,  $4,59 \times 10^{-11}$ ,  $1,15 \times 10^{-11}$  und  $2,87 \times 10^{-12}$  M), wobei jede Konzentration in zwei Wells geprüft wird.

##### *Referenzstandard (Dosisfindung beim Agonisten-Assay)*

14. E2 für den Hauptversuch besteht aus einer seriellen Verdünnung 1:2 mit 11 E2-Konzentrationen (von  $3,67 \times 10^{-10}$  bis  $3,59 \times 10^{-13}$  M) jeweils in zwei Wells.

##### *Referenzstandard (Dosisfindung beim Antagonisten-Assay)*

15. Der Referenzstandard besteht aus einer Kombination von Ral (CASRN 84449-90-1) und E2 (CASRN 50-28-2). Ral/E2 für die Dosisfindungsstudie umfasst eine serielle Verdünnung mit Ral in drei Konzentrationen ( $3,06 \times 10^{-9}$ ,  $7,67 \times 10^{-10}$  und  $1,92 \times 10^{-10}$  M) sowie einer festen Konzentration ( $9,18 \times 10^{-11}$  M) E2 in zwei Wells.

##### *Referenzstandard (Agonisten-Hauptversuch)*

16. Ral/E2 für den Hauptversuch besteht aus einer seriellen Verdünnung von Ral (1:2) mit neun Ral/E2-Konzentrationen von  $2,45 \times 10^{-8}$  bis  $9,57 \times 10^{-11}$  M sowie einer festen Konzentration ( $9,18 \times 10^{-11}$  M) E2 jeweils in zwei Wells.

*Schwache Positivkontrolle (Agonist)*

17. Die schwache Positivkontrolle besteht aus  $9,06 \times 10^{-6}$  M *p,p'*-Methoxychlor (Methoxychlor; CASRN 72-43-5) in einem EFM.

*Schwache Positivkontrolle (Antagonist)*

18. Die schwache Positivkontrolle besteht aus  $3,36 \times 10^{-6}$  M Tamoxifen (CASRN 10540-29-1) mit  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2 in einem EFM.

*E2-Kontrolle (nur Antagonisten-Assay)*

19. Die E2-Kontrolle besteht aus  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2 in einem EFM und dient als Normalwert-Negativkontrolle.

*n-fache Induktion (Agonist)*

20. Die Induktion der Luciferase-Aktivität des Referenzstandards (E2) wird gemessen, indem der höchste mittlere RLU-Wert des E2-Referenzstandards durch den mittleren RLU-Wert der DMSO-Kontrolle geteilt wird; dabei sollte das Ergebnis mehr als das 4-Fache betragen.

*n-fache Reduktion (Antagonist)*

21. Die mittlere Luciferase-Aktivität des Referenzstandards (Ral/E2) wird gemessen, indem der höchste mittlere RLU-Wert des Ral/E2-Referenzstandards durch den mittleren RLU-Wert der DMSO-Kontrolle geteilt wird; dabei sollte das Ergebnis mehr als das 3-Fache betragen.

Zum Nachweis der Eignung des Labors siehe Nummer 14 und Tabellen 3 und 4 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ bei dieser Prüfmethode.

**Vehikel**

22. Die Prüfchemikalien sollten in einem Lösungsmittel gelöst werden, das die betreffende Prüfchemikalie löst und sich mit dem Zellmedium mischt. Geeignete Vehikel sind Wasser, Ethanol (Reinheit 95-100 %) und DMSO. Wenn DMSO verwendet wird, sollte die Konzentration höchstens 1 % (v/v) betragen. Bei jedem Vehikel sollte nachgewiesen werden, dass die verwendete Höchstmenge nicht zytotoxisch ist und keine Auswirkungen auf den Assay hat. Die Referenzstandards und die Kontrollen werden in 100 % Lösungsmittel gelöst und dann in einem EFM auf geeignete Konzentrationen verdünnt.

**Zubereitung der Prüfchemikalien**

23. Die Referenzstandards und die Kontrollen werden in 100 % DMSO (oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel) gelöst und dann in einem EFM auf geeignete Konzentrationen verdünnt. Alle Prüfchemikalien sollten sich vor der Lösung und Verdünnung an die Raumtemperatur anpassen können. Die Lösungen der Prüfchemikalien sollten für jeden Versuch neu zubereitet werden. In den Lösungen sollten kein Niederschlag und keine Trübung zu erkennen sein. Der Referenzstandard und die Kontrollen können in größeren Mengen zubereitet und vorgehalten werden. Der endgültige Referenzstandard, die Verdünnungen der Kontrollen und die Prüfchemikalien sollten jedoch für jeden Versuch frisch zubereitet und innerhalb von 24 Stunden nach der Zubereitung verwendet werden.

**Löslichkeit und Zytotoxizität: Hinweise zur Dosisfindung**

24. Die Dosisfindungsstudie umfasst serielle Verdünnungen (1:10) mit sieben Verdünnungspunkten, die jeweils zweimal geprüft werden. Zunächst werden die Prüfchemikalien bis zur Höchstkonzentration von 1 mg/ml (~1 mM) beim Agonisten-Assay bzw. von 20 µg/ml (~10 µM) beim Antagonisten-Assay geprüft. Mit den Dosisfindungsstudien werden

— die im Hauptversuch zu verwendenden Ausgangskonzentrationen der Prüfchemikalien und

— die im Hauptversuch zu verwendenden Verdünnungen der Prüfchemikalien (1:2 oder 1:5) ermittelt.

25. Die Prüfprotokolle des Agonisten- und der Antagonisten-Assays umfassen eine Bewertung der Zellviabilität/Zytotoxizität (7) im Rahmen der Dosisfindung und des Hauptversuchs. Die Methode zur Ermittlung der Zytotoxizität zur Bewertung der Zellviabilität bei der Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays (1) bestand in einer skalierten qualitativen visuellen Beobachtung; allerdings kann die Zytotoxizität auch mit einer quantitativen Methode bestimmt werden (siehe Protokoll (7)). Daten aufgrund von Konzentrationen der Prüfchemikalien, bei denen die Viabilität um mehr als 20 % beeinträchtigt wird, können nicht berücksichtigt werden.

**Prüfung der chemischen Exposition und Anordnung auf der Assay-Platte**

26. Die Zellen werden gezählt und in 96-Well-Gewebekulturplatten (2 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Well) in ein EFM gegeben und 24 Stunden inkubiert, damit die Zellen an der Platte anhaften können. Das EFM wird entfernt und durch die Prüf- und Referenzchemikalien im EFM ersetzt und 19-24 Stunden inkubiert. Besondere Aufmerksamkeit ist bei stark flüchtigen Stoffen geboten, da durch benachbarte Kontroll-Wells falsch positive Ergebnisse entstehen können. In diesen Fällen können „Plattenversiegelungen“ helfen, die einzelnen Wells während der Prüfung zu isolieren. Dies ist in den betreffenden Fällen zu empfehlen.

*Dosisfindungsstudien*

27. Bei Dosisfindungsstudien werden alle Wells der 96-Well-Platte verwendet, um bis zu sechs Prüfchemikalien in seriellen Verdünnungen (1:10) mit sieben Verdünnungspunkten jeweils zweimal zu prüfen (siehe Abbildungen 1 und 2).
- Bei der Dosisfindungsstudie für *Agonisten* werden als Referenzstandard vier E2-Konzentrationen (jeweils zwei) und vier Replikat-Wells für die DMSO-Kontrolle verwendet.
  - Bei der Dosisfindungsstudie für *Antagonisten* werden als Referenzstandard drei Ra/E2-Konzentrationen mit 9,18 × 10<sup>-11</sup> M E2 (jeweils zwei) und drei Replikat-Wells für die E2- und die DMSO-Kontrolle verwendet.

Abbildung 1

**Anordnung bei Prüfungen zur Dosisfindung bei Agonisten mit einer 96-Well-Platte**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	VK	VK	VK	VK	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4

Abkürzungen: E2-1 bis E2-4 = Konzentrationen des E2-Referenzstandards (hoch bis niedrig); TC1-1 bis TC1-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 1 (TC1); TC2-1 bis TC2-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 2 (TC2); TC3-1 bis TC3-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 3 (TC3); TC4-1 bis TC4-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 4 (TC4); TC5-1 bis TC5-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 5 (TC5); TC6-1 bis TC6-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 6 (TC6); VK = Vehikelkontrolle (DMSO [1 % v/v EFM]).

gestrichen - siehe Teil 0

Abbildung 2

**Anordnung bei Prüfungen zur Dosisfindung bei Antagonisten mit einer 96-Well-Platte**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-1	TC2-1	TC2-1	TC3-1	TC3-1	TC4-1	TC4-1	TC5-1	TC5-1	TC6-1	TC6-1
B	TC1-2	TC1-2	TC2-2	TC2-2	TC3-2	TC3-2	TC4-2	TC4-2	TC5-2	TC5-2	TC6-2	TC6-2
C	TC1-3	TC1-3	TC2-3	TC2-3	TC3-3	TC3-3	TC4-3	TC4-3	TC5-3	TC5-3	TC6-3	TC6-3
D	TC1-4	TC1-4	TC2-4	TC2-4	TC3-4	TC3-4	TC4-4	TC4-4	TC5-4	TC5-4	TC6-4	TC6-4
E	TC1-5	TC1-5	TC2-5	TC2-5	TC3-5	TC3-5	TC4-5	TC4-5	TC5-5	TC5-5	TC6-5	TC6-5
F	TC1-6	TC1-6	TC2-6	TC2-6	TC3-6	TC3-6	TC4-6	TC4-6	TC5-6	TC5-6	TC6-6	TC6-6
G	TC1-7	TC1-7	TC2-7	TC2-7	TC3-7	TC3-7	TC4-7	TC4-7	TC5-7	TC5-7	TC6-7	TC6-7
H	Ral-1	Ral-2	Ral-3	VK	VK	VK	E2	E2	E2	Ral-1	Ral-2	Ral-3

Abkürzungen: E2 = E2-Kontrolle; Ral-1 bis Ral-3 = Konzentrationen des Raloxifen/E2-Referenzstandards (hoch bis niedrig); TC1-1 bis TC1-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 1 (TC1); TC2-1 bis TC2-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 2 (TC2); TC3-1 bis TC3-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 3 (TC3); TC4-1 bis TC4-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 4 (TC4); TC5-1 bis TC5-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 5 (TC5); TC6-1 bis TC6-7 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 6 (TC6); VK = Vehikelkontrolle (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Hinweis: Alle Prüfchemikalien werden mit  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2 geprüft.

28. Für jedes Well wird ein endgültiges Medienvolumen von 200  $\mu$ l als erforderlich empfohlen. Für die Prüfung sind ausschließlich Prüfplatten zu verwenden, bei denen die Zellviabilität in allen Wells mindestens 80 % beträgt.
29. Die Bestimmung von Ausgangskonzentrationen für **Agonisten**-Hauptversuche wird im Protokoll für Agonisten-Assays eingehend beschrieben (7). Dabei sind die folgenden Kriterien zu berücksichtigen:
- Wenn die Konzentrationskurve der Prüfchemikalie keine Punkte enthält, die über dem Mittelwert zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung der DMSO-Kontrolle liegen, wird der Hauptversuch an einer seriellen Verdünnung (1:2) mit 11 Verdünnungspunkten beginnend mit der maximalen löslichen Konzentration vorgenommen.
  - Wenn die Konzentrationskurve der Prüfchemikalie keine Punkte enthält, die über dem Mittelwert zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung der DMSO-Kontrolle liegen, sollte die beim Hauptversuch zu verwendende Verdünnungsreihe mit 11 Verdünnungspunkten um eine logarithmische Einheit höher als die Konzentration sein, bei der beim Vorversuch der höchste bereinigte RLU-Wert ermittelt wurde. Die Verdünnungsreihe mit 11 Verdünnungspunkten beruht auf Verdünnungen im Verhältnis 1:2 oder 1:5; das Verdünnungsverhältnis richtet sich nach den folgenden Kriterien:
 

Eine serielle Verdünnung im Verhältnis 1:2 mit 11 Verdünnungspunkten sollte verwendet werden, wenn der sich ergebende Konzentrationsbereich das gesamte Spektrum der Reaktionen aufgrund der in der Dosisfindungsstudie ermittelten Konzentrations-Reaktions-Kurve abdeckt. Ansonsten ist eine Verdünnung im Verhältnis 1:5 zu verwenden.
  - Wenn eine Prüfchemikalie in der Dosisfindungsstudie eine biphasige Konzentrations-Reaktions-Kurve ergibt, sollten die beiden Phasen auch im Hauptversuch berücksichtigt werden.
30. Die Bestimmung von Ausgangskonzentrationen für **Antagonisten**-Hauptversuche wird im Protokoll für Antagonisten-Assays eingehend beschrieben (7). Dabei sind die folgenden Kriterien zu berücksichtigen:
- Wenn die Konzentrationskurve der Prüfchemikalie keine Punkte enthält, die unter dem Mittelwert abzüglich der 3-fachen Standardabweichung der E2-Kontrolle liegen, wird der Hauptversuch mit einer seriellen Verdünnung (1:2) mit 11 Verdünnungspunkten beginnend mit der maximalen löslichen Konzentration vorgenommen.

- Wenn die Konzentrationskurve der Prüfchemikalie keine Punkte enthält, die unter dem Mittelwert abzüglich der 3-fachen Standardabweichung der E2-Kontrolle liegen, sollte beim Hauptversuch für die Verdünnungsreihe mit 11 Verdünnungspunkten eine der folgenden Ausgangskonzentrationen verwendet werden:
  - die Konzentration mit dem niedrigsten angepassten RLU-Wert bei der Dosisfindung,
  - die maximal lösliche Konzentration (siehe Protokoll zum Antagonisten-Assay (7), Abbildung 14-2),
  - die niedrigste zytotoxische Konzentration (Beispiel siehe Antagonisten-Protokoll (7), Abbildung 14-3).
- Die Verdünnungsreihe mit 11 Verdünnungspunkten beruht auf Verdünnungen im Verhältnis 1:2 oder 1:5; das Verdünnungsverhältnis richtet sich nach den folgenden Kriterien:

Eine serielle Verdünnung im Verhältnis 1:2 mit 11 Verdünnungspunkten sollte verwendet werden, wenn der sich ergebende Konzentrationsbereich das gesamte Spektrum der Reaktionen aufgrund der in der Dosisfindungsstudie ermittelten Konzentrations-Reaktions-Kurve abdeckt. Ansonsten sollte eine Verdünnung im Verhältnis 1:5 verwendet werden.

#### Hauptversuche

31. Ein Hauptversuch besteht aus seriellen Verdünnungen mit 11 Verdünnungspunkten (je nach Ausgangskonzentration für die Kriterien des Hauptversuchs entweder 1:2 oder 1:5), wobei jede Konzentration an drei Wells der 96-Well-Platte zu prüfen ist (siehe Abbildungen 3 und 4).
  - Bei den *Agonisten*-Hauptversuchen wird E2 in 11 Konzentrationen jeweils zweifach als Referenzstandard geprüft. Jede Platte enthält 4 Replikat-Wells mit der DMSO-Kontrolle und 4 Replikat-Wells mit der Methoxychlor-Kontrolle ( $9,06 \times 10^{-6}$  M).
  - Bei den *Antagonisten*-Hauptversuchen werden Ral/E2 in 9 Konzentrationen mit  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2 jeweils zweifach als Referenzstandard, 4 Replikat-Wells mit der  $9,18 \times 10^{-11}$  M E2 als Kontrolle, 4 Replikat-Wells als DMSO-Kontrolle und 4 Replikat-Wells mit  $3,36 \times 10^{-6}$  M Tamoxifen geprüft.

Abbildung 3

#### Anordnung bei Agonisten-Hauptversuchen mit 96-Well-Platten

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VK
B	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VK
C	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VK
D	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VK
E	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
F	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Meth
G	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth
H	E2-1	E2-2	E2-3	E2-4	E2-5	E2-6	E2-7	E2-8	E2-9	E2-10	E2-11	Meth

Abkürzungen: TC1-1 bis TC1-11 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 1; TC2-1 bis TC2-11 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 2; E2-1 bis E2-11 = Konzentrationen des E2-Referenzstandards (hoch bis niedrig); Meth = p,p'-Methoxychlor, schwach positive Kontrolle; VK = DMSO (1 % v/v) EFM Vehikelkontrolle.



Abbildung 4

**Anordnung bei Antagonisten-Hauptversuchen mit 96-Well-Platten**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VK
<b>B</b>	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VK
<b>C</b>	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	TC1-9	TC1-10	TC1-11	VK
<b>D</b>	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	VK
<b>E</b>	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
<b>F</b>	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	TC2-9	TC2-10	TC2-11	Tam
<b>G</b>	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam
<b>H</b>	Ral-1	Ral-2	Ral-3	Ral-4	Ral-5	Ral-6	Ral-7	Ral-8	Ral-9	E2	E2	Tam

Abkürzungen: E2 = E2-Kontrolle; Ral-1 bis Ral-9 = Konzentrationen des Raloxifen-/E2-Referenzstandards (hoch bis niedrig); Tam = Tamoxifen/E2, schwach positive Kontrolle; TC1-1 bis TC1-11 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 1 (TC1); TC2-1 bis TC2-11 = Konzentrationen (hoch bis niedrig) der Prüfchemikalie 2 (TC2); VK = Vehikelkontrolle (DMSO [1 % v/v EFM.]).

Hinweis: Alle Referenz- und alle Prüf-Wells enthalten jeweils E2 in einer bestimmten Konzentration ( $9,18 \times 10^{-11}$  M).

32. Um unabhängige Ergebnisse sicherzustellen, sollten die Hauptversuche zur Prüfung der Chemikalien an unterschiedlichen Tagen wiederholt werden. In jedem Fall sollten mindestens zwei Hauptversuche durchgeführt werden. Wenn die Prüfergebnisse einander widersprechen (z. B. ein positives und ein negatives Ergebnis) oder wenn eine der durchgeführten Prüfungen nicht berücksichtigt werden kann, sollte eine dritte Prüfung durchgeführt werden.

**Messung der Luminiszenz**

33. Die Luminiszenz wird im Bereich von 300-650 nm mit einem Injektionsluminometer und einer Software zur Steuerung des Injektionsvolumens und des Messintervalls gemessen (7). Die Lichtemission der einzelnen Wells wird in RLU pro Well angegeben.

## ANALYSE DER DATEN

Bestimmung von  $EC_{50}$  /  $IC_{50}$

34. Aus den Konzentrations-Reaktions-Daten werden der  $EC_{50}$ -Wert (die Hälfte der maximalen Wirkungskonzentration einer Prüfchemikalie [Agonisten]) und der  $IC_{50}$ -Wert (die Hälfte der maximalen Hemmkonzentration einer Prüfchemikalie [Antagonisten]) bestimmt. Bei Prüfchemikalien, die in einer oder mehreren Konzentrationen positiv bewertet wurden, wird die Konzentration, die die Hälfte der maximalen Wirkung auslöst, ( $IC_{50}$  bzw.  $EC_{50}$ ) mit einer Hill-Funktion oder mit einer geeigneten alternativen Funktion berechnet. Die Hill-Funktion ist ein logistisches mathematisches Modell mit vier Parametern, bei dem die Konzentration einer Prüfchemikalie mit der folgenden Formel in Bezug zu einer Wirkung (die gewöhnlich einer Sigmoidkurve folgt) gesetzt wird:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(\lg EC_{50} - X) Hill Slope}}$$

Dabei gilt:

Y = Wirkung (d. h. RLU-Werte),

X = Logarithmus der Konzentration,

Bottom = Mindestwirkung,

Top = maximale Wirkung,

$\lg EC_{50}$  (bzw.  $\lg IC_{50}$ ) = Logarithmus von X als Mittelwert der Mindestwirkung und der maximalen Wirkung und

Hillslope = Steilheit der Kurve.

Mit dem Modell wird die beste Anpassung (best fit) für die Parameter Top, Bottom, Hillslope, und  $IC_{50}$  und  $EC_{50}$  ermittelt. Für die Berechnung der  $EC_{50}$ - und der  $IC_{50}$ -Werte sollte eine geeignete Statistik-Software verwendet werden (z. B. Graphpad Prism<sup>®</sup>).

### **Bestimmung von Ausreißern**

35. Eine fundierte statistische Bewertung könnte (u. a.) durch die Einbeziehung des Q-Tests (siehe Protokolle zum Agonisten- und zum Antagonisten-Assay (7)) zur Ermittlung nicht verwendbarer und aus der Datenanalyse auszuschließender Wells erleichtert werden.
36. Beim E2-Referenzstandard (zwei Proben) werden alle angepassten RLU-Werte eines Replikat-Wells bei einer bestimmten E2-Konzentration als Ausreißer betrachtet, bei denen der Wert mehr als 20 % über oder unter dem angepassten RLU-Wert dieser Konzentration in der Datenbank der historischen Daten liegt.

### **Erfassung und Anpassung von Luminometer-Daten für die Dosisfindungsstudie**

37. Die Rohdaten des Luminometers werden in ein Tabellenformular für den Assay übertragen. Dabei sollte geprüft werden, ob die Daten auszuschließende Ausreißer beinhalten (siehe Akzeptanzkriterien der Prüfung in Bezug auf die in den Analysen ermittelten Parameter). Folgende Berechnungen sind durchzuführen:

#### *Agonisten*

Schritt 1 Der Mittelwert der DMSO-Vehikelkontrolle (VK) wird berechnet.

Schritt 2 Der Mittelwert der DMSO-VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen, um die Daten zu normalisieren.

Schritt 3 Für den Referenzstandard (E2) wird die mittlere n-fache Induktion ermittelt.

Schritt 4 Für die Prüfchemikalien wird der mittlere  $EC_{50}$ -Wert ermittelt.

#### *Antagonisten*

Schritt 1 Der Mittelwert der DMSO-VK wird berechnet.

Schritt 2 Der Mittelwert der DMSO-VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen, um die Daten zu normalisieren.

Schritt 3 Für den Referenzstandard (E2) wird die mittlere n-fache Reduktion ermittelt.

Schritt 4 Der Mittelwert des E2-Referenzstandards wird berechnet.

Schritt 5 Für die Prüfchemikalien wird der mittlere  $IC_{50}$ -Wert ermittelt.

### Erfassung und Anpassung von Luminometer-Daten für Hauptversuche

38. Die Rohdaten des Luminometers werden in ein Tabellenformular für den Assay übertragen. Dabei sollte geprüft werden, ob die Daten auszuschließende Ausreißer beinhalten (siehe Akzeptanzkriterien der Prüfung in Bezug auf die in den Analysen ermittelten Parameter). Folgende Berechnungen sind durchzuführen:

#### *Agonisten*

Schritt 1 Der Mittelwert der DMSO-VK wird berechnet.

Schritt 2 Der Mittelwert der DMSO-VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen, um die Daten zu normalisieren.

Schritt 3 Für den Referenzstandard (E2) wird die mittlere n-fache Induktion ermittelt.

Schritt 4 Für die Prüfchemikalien wird der mittlere EC<sub>50</sub>-Wert ermittelt.

Schritt 5 Für Methoxychlor wird der mittlere angepasste RLU-Wert berechnet.

#### *Antagonisten*

Schritt 1 Der Mittelwert der DMSO-VK wird berechnet.

Schritt 2 Der Mittelwert der DMSO-VK wird vom Wert jedes einzelnen Wells abgezogen, um die Daten zu normalisieren.

Schritt 3 Für den Referenzstandard (Ral/E2) wird die mittlere n-fache Induktion ermittelt.

Schritt 4 Für Ral/E2 und für die Prüfchemikalien wird der mittlere IC<sub>50</sub>-Wert ermittelt.

Schritt 5 Für Tamoxifen wird der mittlere angepasste RLU-Wert berechnet.

Schritt 6 Der Mittelwert des E2-Referenzstandards wird berechnet.

### Kriterien für die Auswertung von Daten

39. Der VM7Luc-ER-TA-Assay soll im Rahmen einer Beweiskraftermittlung die Priorisierung von Stoffen für die *In-vivo*-Prüfung von ED unterstützen. In diesem Verfahren werden die Prüfchemikalien hinsichtlich der Aktivität von ER-Agonisten oder -Antagonisten als positiv oder negativ eingestuft. Die Kriterien für die Einstufung als positiv oder negativ in der Studie zur Validierung des VM7Luc-ER-TA-Assays werden in Tabelle 1 beschrieben:

Tabelle 1

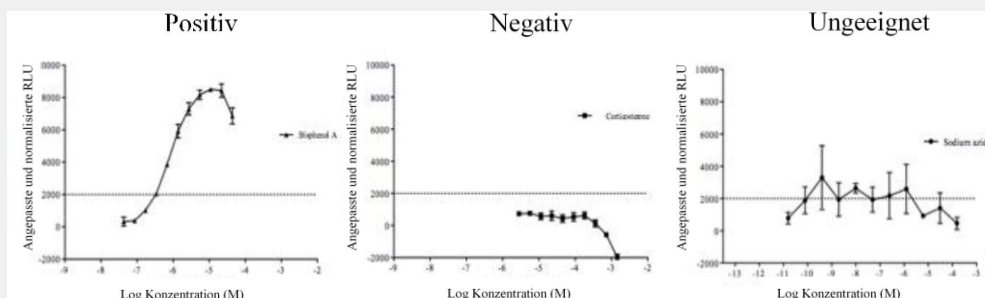
**Kriterien für die Einstufung als positiv oder als negativ**

AGONISTEN-AKTIVITÄT	
Positiv	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Bei allen hinsichtlich der ER-Agonisten-Aktivität als <i>positiv</i> eingestuften Prüfchemikalien sollte die Konzentrations-Reaktions-Kurve eine Basislinie gefolgt von einer positiven Steigung aufweisen und in einem Plateau oder einem Peak schließen. Manchmal sind vielleicht nur zwei dieser Merkmale (Basislinie – positive Steigung oder positive Steigung – Peak) ausgeprägt.</li> <li>— Der Kurvenverlauf im Bereich der positiven Steigung sollte mindestens drei Punkte mit einander nicht überschneidenden Fehlerbalken enthalten (Mittelwert <math>\pm</math> SD). Die Punkte auf der Basislinie werden nicht berücksichtigt. Der lineare Verlauf der Kurve kann jedoch den Peak oder den ersten Punkt des Plateaus beinhalten.</li> <li>— Eine Einstufung als positiv setzt eine bestimmte Reaktionsamplitude voraus, d. h. eine Differenz zwischen Basislinie und Peak von mindestens 20 % des maximalen Wertes beim Referenzstandard E2 (mindestens 2 000 RLU, wenn der maximale Reaktionswert der Referenzstandards [E2] auf 10 000 RLU angepasst wurde).</li> <li>— Nach Möglichkeit sollte für jede positiv eingestufte Prüfchemikalie ein <math>EC_{50}</math>-Wert berechnet werden.</li> </ul>
Negativ	Der mittlere angepasste RLU-Wert einer bestimmten Konzentration entspricht höchstens dem mittleren RLU-Wert der DMSO-Kontrolle zuzüglich der 3-fachen Standardabweichung des DMSO-RLU-Werts.
Ungeeignet	Daten, die aufgrund erheblicher qualitativer oder quantitativer Einschränkungen nicht als gültig zum Nachweis des Vorliegens oder des Fehlens einer Aktivität akzeptiert werden können, sind als ungeeignet zu betrachten und können für die Entscheidung, ob eine Prüfchemikalie als positiv oder als negativ einzustufen ist, nicht herangezogen werden. In diesen Fällen sollten die betreffenden Chemikalien nochmals geprüft werden.
ANTAGONISTEN-AKTIVITÄT	
<b>Positiv</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Die Prüfchemikalie ergibt eine Konzentrations-Reaktions-Kurve bestehend aus einer Basislinie mit anschließender negativer Steigung.</li> <li>— Der Kurvenverlauf im Bereich der negativen Steigung sollte mindestens drei Punkte mit einander nicht überschneidenden Fehlerbalken enthalten. Die Punkte auf der Basislinie werden nicht berücksichtigt. Der lineare Bereich der Kurve kann jedoch den ersten Punkt des Plateaus enthalten.</li> <li>— Die Aktivität des Werts der maximalen Reaktion beim Referenzstandard Ral/E2 sollte um mindestens 20 % reduziert werden (d. h. auf höchstens 8 000 RLU, wenn der Wert der maximalen Reaktion des Referenzstandards [Ral/E2] auf 10 000 RLU angepasst wurde).</li> <li>— Die höchsten nicht zytotoxischen Konzentrationen der Prüfchemikalie sollten höchstens <math>1 \times 10^{-5}</math> M betragen.</li> <li>— Nach Möglichkeit sollte für jede positiv eingestufte Prüfchemikalie ein <math>IC_{50}</math>-Wert berechnet werden.</li> </ul>
Negativ	Alle Datenpunkte liegen bei Konzentrationen unter $1,0 \times 10^{-5}$ M über dem $EC_{80}$ -Wert (80 % der E2-Rektion oder 8 000 RLU).
Ungeeignet	Daten, die aufgrund erheblicher qualitativer oder quantitativer Einschränkungen nicht als gültig zum Nachweis des Vorliegens oder des Fehlens einer Aktivität akzeptiert werden können, sind als ungeeignet zu betrachten und können für die Entscheidung, ob eine Prüfchemikalie als positiv oder als negativ einzustufen ist, nicht herangezogen werden. In diesen Fällen sollten die betreffenden Chemikalien nochmals geprüft werden.

40. Positive Ergebnisse werden möglichst sowohl durch die Größenordnung der Wirkung als auch durch die Konzentration beschrieben, bei der die Wirkung eintritt. Den Abbildungen 5 und 6 sind Beispiele für als positiv, negativ und nicht geeignet zu bewertende Daten zu entnehmen.

Abbildung 5

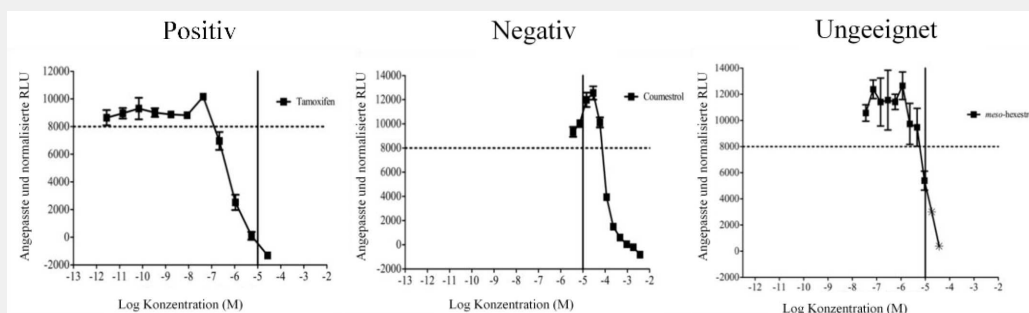
### Beispiele Agonisten: Als positiv, negativ und nicht geeignet zu bewertende Daten



Die gestrichelte Linie bezeichnet 20 % der E2-Reaktion, 2 000 angepasste und normalisierte RLU-Werte.

Abbildung 6

### Beispiele Antagonisten: Als positiv, negativ und nicht geeignet zu bewertende Daten



Die gestrichelte Linie bezeichnet 80 % der Ral/E2-Reaktion, 8 000 angepasste und normalisierte RLU-Werte.

Die durchgehende Linie bezeichnet die Konzentration  $1,00 \times 10^{-5}$  M. Eine als positiv einzustufende Reaktion sollte bei Konzentrationen unter  $1,00 \times 10^{-5}$  M unter der 8 000-RLU-Linie liegen.

Bei mit einem Sternchen gekennzeichneten Konzentrationen im meso-Hexestrol-Diagramm liegt die Viabilität bei mindestens 2.

Die Prüfergebnisse für meso-Hexestrol werden als nicht geeignete Daten betrachtet, da die einzige Reaktion unter 8 000 RLU bei einer Konzentration von  $1,00 \times 10^{-5}$  M erfolgt.

41. Die Berechnung der  $EC_{50}$ - und der  $IC_{50}$ -Werte kann mit einer Hill-Funktion mit vier Parametern vorgenommen werden (siehe Protokolle zu Agonisten- und Antagonisten-Assays (7)). Die Erfüllung der Akzeptanzkriterien deutet darauf hin, dass das System ordnungsgemäß funktioniert. Dies gewährleistet jedoch nicht, dass ein bestimmter Prüflauf tatsächlich exakte Daten ergibt. Die Wiederholung der Ergebnisse des ersten Prüflaufs ist die beste Bestätigung dafür, dass exakte Daten ermittelt wurden (siehe Nummer 19 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“).

## PRÜFBERICHT

42. Siehe Nummer 20 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“.

## LITERATUR

- (1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An In Vitro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.
- (2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor  $\alpha$  and  $\beta$  Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, *J. Cell Biochem.*, 82(3): 467-479.
- (3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 58(23): 5367-5373.
- (4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER)  $\beta$ , a Modulator of ER $\alpha$  in the Uterus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11): 936-941.
- (5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), *ALTEX*, 23(Suppl): S 270-273.
- (6) Coecke, S., u. a. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *Alternatives to Laboratory Animals*, 33: S. 261-287.
- (7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7850.
- (8) Rogers, J.M., Denison, M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro Mol. Toxicol.*, 13(1):67-82.
- (9) Escande, A., u. a. (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.*, 71(10):1459-1469.
- (10) Thorne, N., Inglese, J., Auld, D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology*, 17(6):646-657.
- (11) Kuiper, G.G, u. a. (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinology*, 139(10):4252-4263.

- (12) Geisinger u. a. (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, *Cancer* 63, 280-288.
- (13) Baldwin u. a. (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal*, 34, 649-654.
- (14) Li, Y., u. a. (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, *Mol. Endo.* 28, 2072-2081.
- (15) Rogers, J.M. und Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro & Molec. Toxicol.* 13, 67-82.

## ANLAGE 4

ASSAY ZUR TRANSAKTIVIERUNG DES STABIL TRANSFIZIERTEN HUMANEN ÖSTROGENREZEPTORS  $\alpha$  ZUM NACHWEIS DER WIRKUNG VON CHEMIKALIEN AUF ÖSTROGEN-AGONISTEN UND -ANTAGONISTEN MIT DER ERA-CALUX-ZELLINIE

## AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

1. Beim ER $\alpha$ -CALUX-Transaktivierungs-Assay wird die humane U2OS-Zelllinie zum Nachweis einer durch den humanen Östrogenrezeptor  $\alpha$  (hER $\alpha$ ) vermittelten Östrogen-Agonisten- und -Antagonisten-Aktivität verwendet. In der Studie zur Validierung des ER $\alpha$ -CALUX-Bioassays mit stabil transfiziertem ER $\alpha$  durch BioDetection Systems BV (Amsterdam, Niederlande) wurden die Relevanz und die Zuverlässigkeit des Assays für den vorgesehenen Zweck nachgewiesen (1). Die ER $\alpha$ -CALUX-Zelllinie exprimiert ausschließlich den humanen ER $\alpha$  (2) (3).
2. Dieser Assay wurde speziell zum Nachweis von hER $\alpha$  und einer durch hER $\alpha$  vermittelten Transaktivierung anhand einer Messung der Biolumineszenz als Endpunkt entwickelt. In Anbetracht des hohen Signal-Rausch-Verhältnisses ist bei Bioassays die Berücksichtigung der Biolumineszenz allgemein üblich (4).
3. Bei Phytoöstrogen-Konzentrationen von mehr als 1  $\mu$ M wurde eine Überaktivierung des Luciferase-Reportergens mit der Folge einer nicht durch den Rezeptor vermittelten Lumineszenz festgestellt (5) (6) (7). Daher müssen höhere Konzentrationen von Phytoöstrogenen oder ähnlichen Verbindungen sorgfältig untersucht werden, die bei Transaktivierungs-Assays mit stabil transfiziertem ER zu einer Überaktivierung der Luciferase-Expression führen können (siehe Anlage 2).
4. Vor der Verwendung dieses Assays für rechtliche Zwecke sollten die Abschnitte „ALLGEMEINE EINLEITUNG“ und „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ gelesen werden. Die in der vorliegenden Prüfmethode verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

## PRINZIP DES ASSAYS (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

5. Mit dem Bioassay werden ER-Liganden-Bindungen nach einer Translokation des Rezeptor-Liganden-Komplexes an den Zellkern bewertet. Im Zellkern bindet der Rezeptor-Liganden-Komplex spezifische DNA-Response-Elemente und transaktiviert ein Leuchtkäfer-Luciferase-Reporter-Gen. Dies führt zu einer verstärkten zellulären Expression des Luciferase-Enzyms. Nach der Zugabe des Luciferase-Substrats Luciferin wird das Luciferin in ein biolumineszierendes Produkt umgewandelt. Das emittierte Licht kann mit einem Luminometer leicht erkannt und gemessen werden.
6. Für das Prüfsystem werden stabil transfizierte ER $\alpha$ -CALUX-Zellen verwendet. Die ER $\alpha$ -CALUX-Zellen stammen aus der humanen Osteoblasten-Osteosarkom-Zelllinie U2OS. Die humanen U2OS-Zellen wurden durch Copräzipitation mit Calciumphosphat mit 3xHRE-TATA-Luc und pSG5-neo-hER $\alpha$  stabil transfiziert. Die U2OS-Zelllinie wurde als am besten geeignete Responsive-Reporter-Zelllinie für Östrogen (und andere Steroidhormone) ausgewählt, da diese Zelllinie nur eine geringe bzw. keinerlei endogene Rezeptor-Aktivität entwickelte. Das Fehlen endogener Rezeptoren wurde nur mit Luciferase-Reporter-Plasmiden geprüft, bei denen nach Zugabe von Rezeptor-Liganden keine Aktivität festgestellt werden konnte. Außerdem stimulierte diese Zelllinie starke hormonvermittelte Reaktionen bei vorübergehender Zugabe verwandter Rezeptoren (2) (3) (8).
7. Die Prüfung von Chemikalien auf eine östrogene bzw. antiöstrogene Aktivität mit der ER $\alpha$ -CALUX-Zelllinie besteht aus einem Vorversuch mit anschließenden Hauptversuchen. Im Vorversuch werden die Löslichkeit, die Zytotoxizität und ein engerer Konzentrationsbereich von Prüfchemikalien für den Hauptversuch ermittelt. Bei den Hauptversuchen werden die engeren Konzentrationsbereiche der Prüfchemikalien zunächst mit den ER $\alpha$ -CALUX-Bioassays untersucht. Anschließend erfolgt die Einstufung der Prüfchemikalien aufgrund ihrer Wirkung als Agonisten oder Antagonisten.



8. Kriterien für die Auswertung der Daten werden in Nummer 59 eingehend beschrieben. Eine Prüfchemikalie wird kurz gesagt dann als Agonist eingestuft, wenn zwei aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie eine Reaktion induzieren, die größer oder gleich 10 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards 17 $\beta$ -Estradiol (PC<sub>10</sub>) ist. Entsprechend wird eine Prüfchemikalie als Antagonist eingestuft, wenn zwei aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie eine Reaktion induzieren, die kleiner oder gleich 80 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards Tamoxifen (PC<sub>80</sub>) ist.

#### VERFAHREN

##### Zelllinien

9. Für den Assay sollte die stabil transfizierte U2OS-ER $\alpha$ -CALUX-Zelllinie verwendet werden. Die Zelllinie kann nach Maßgabe einer technischen Lizenzvereinbarung von BioDetection Systems BV, Amsterdam, Niederlande, bezogen werden.
10. Für die Prüfung sollten ausschließlich mycoplasmafreie Zellkulturen verwendet werden. Die zu verwendenden Zellchargen sollten entweder in Bezug auf Mycoplasma-Kontaminationen als negativ zertifiziert sein oder vor der Verwendung auf Mycoplasma untersucht werden. Die RT-PCR (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) sollte für den empfindlichen Nachweis einer Mycoplasma-Infektion verwendet werden (9).

##### Stabilität der Zelllinie

11. Um die Stabilität und die Integrität der CALUX-Zellen zu erhalten, sollten die Zellen in flüssigem Stickstoff (bei -80 °C) aufbewahrt werden. Nach dem Auftauen der Zellen zum Ansetzen einer neuen Kultur sollten die Zellen mindestens zweimal subkultiviert werden, bevor sie zur Bewertung der Agonisten- bzw. Antagonisten-Aktivität von Chemikalien verwendet werden. Die Subkultivierung sollte sich auf höchstens 30 Passagen beschränken.
12. Zur Überwachung der Stabilität der Zelllinie sollte die Empfindlichkeit des Systems zur Prüfung der Agonisten- bzw. Antagonisten-Wirkung anhand der EC<sub>50</sub>- bzw. der IC<sub>50</sub>-Werte des Referenzstandards untersucht werden. Außerdem sollten die relative Induktion der Positivkontrollprobe (PK) und der Negativkontrollprobe (NK) überwacht werden. Die Ergebnisse sollten mit den Akzeptanzkriterien des ER $\alpha$ -CALUX-Bioassays zur Untersuchung der Agonisten- (Tabelle 3C) bzw. der Antagonisten-Wirkung (Tabelle 4C) übereinstimmen. Die Referenzstandards sowie die Positiv- und die Negativkontrollen für Agonisten und Antagonisten sind in den Tabellen 1 und 2 angegeben.

##### Bedingungen für die Haltung der Zellkulturen und für die Plattierung

13. Die U2OS-Zellen sollten im Nährmedium (DMEM/F12 (1:1) mit Phenolrot als pH-Indikator ergänzt um fetales Rinderserum (7,5 %), nicht essentielle Aminosäuren (1 %), 10 Einheiten/ml Penicillin, Streptomycin und Geneticin (G-418) als Selektionsmarker) kultiviert werden. Anschließend werden die Zellen bei 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Wenn die Zellen eine Konfluenz von 85-95 % erreicht haben, werden sie entweder subkultiviert oder zum Überimpfen in 96-Well-Mikrotiterplatten vorbereitet. Im letztgenannten Fall sind 1x10<sup>5</sup> Zellen/ml im östrogenfreien Assay-Medium (DMEM/F12 (1:1) (ohne Phenolrot und ergänzt um mit dextranbeschichteter Aktivkohle behandeltes fetales Rinderserum (5 % v/v), nicht essentielle Aminosäuren (1 % v/v) und 10 Einheiten/ml Penicillin und Streptomycin) neu zu suspendieren und in die Wells der 96-Well-Mikrotiterplatten (100  $\mu$ l homogenisierte Zellsuspension) zu plattieren. Vor der Exposition werden die Zellen 24 Stunden in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit) vorinkubiert. Verwendetes Kunststoffmaterial muss östrogenfrei sein.

##### Akzeptanzkriterien

14. Die Agonisten- und die Antagonisten-Aktivität der Prüfchemikalie(n) werden in Prüfreiien untersucht. Eine Prüfreihe umfasst höchstens 6 Mikrotiterplatten. Jede Prüfreihe beinhaltet mindestens eine vollständige Verdünnungsreihe eines Referenzstandards, eine Positivkontrollprobe, eine Negativkontrollprobe und Lösungsmittelkontrollen. In den Abbildungen 1 und 2 ist die Anordnung auf den Platten für Prüfreiien zur Ermittlung der Agonisten- bzw. Antagonisten-Aktivität dargestellt.

15. Jede Verdünnung der Referenzstandards, der Prüfchemikalien und aller Lösungsmittelkontrollen sowie alle Positiv- und alle Negativkontrollen sollten jeweils dreimal untersucht werden. Jede der drei Untersuchungen sollte die in den Tabellen 3A und 4A genannten Anforderungen erfüllen.
16. Bei allen Prüfreiheiten wird jeweils auf der ersten Platte eine vollständige Verdünnungsreihe des Referenzstandards (17 $\beta$ -Estradiol für Agonisten und Tamoxifen für Antagonisten) gemessen. Um die Ergebnisse der Untersuchungen der übrigen 5 Mikrotiterplatten mit den Ergebnissen der ersten Mikrotiterplatte mit der vollständigen Konzentrations-Reaktions-Kurve des Referenzstandards vergleichen zu können, sollten alle Platten 3 Kontrollproben enthalten: die Lösungsmittelkontrolle, die höchste geprüfte Konzentration des Referenzstandards und die ungefähre EC<sub>50</sub>- (Agonisten) bzw. IC<sub>50</sub>-Konzentration (Antagonisten) des Referenzstandards. Das Verhältnis der durchschnittlichen Kontrollproben auf der ersten Platte und den übrigen 5 Platten sollte die Anforderungen in Tabelle 3C (Agonisten) bzw. in Tabelle 4C (Antagonisten) erfüllen.
17. Für jede der Mikrotiterplatten einer Prüfreihe wird der z-Faktor berechnet (10). Die Berechnung des z-Faktors ist anhand der Reaktionen bei der höchsten und bei der niedrigsten Konzentration des Referenzstandards vorzunehmen. Eine Mikrotiterplatte ist dann gültig, wenn sie die Anforderungen in Tabelle 3C (Agonisten) bzw. in Tabelle 4C (Antagonisten) erfüllt.
18. Die Dosis-Reaktions-Kurve des Referenzstandards muss sigmoidal verlaufen. Die aus der Reaktion der Verdünnungsreihe des Referenzstandards abgeleiteten EC<sub>50</sub>- bzw. IC<sub>50</sub>-Werte sollten die Anforderungen in Tabelle 3C (Agonisten) bzw. Tabelle 4C (Antagonisten) erfüllen.
19. Jede Prüfreihe sollte mindestens eine Positivkontrollprobe und eine Negativkontrollprobe enthalten. Die berechnete relative Induktion der Positiv- und der Negativkontrollprobe sollte die Anforderungen in Tabelle 3C (Agonisten) bzw. in Tabelle 4C (Antagonisten) erfüllen.
20. Bei allen Messungen wird der Induktionsfaktor der höchsten Konzentration des Referenzstandards gemessen, indem der höchste mittlere RLU-Wert des 17 $\beta$ -Estradiol-Referenzstandards durch den mittleren RLU-Wert der Referenz-Lösungsmittelkontrolle geteilt wird. Dieser Induktionsfaktor sollte die Mindestanforderungen für die n-fache Induktion in Tabelle 3C (Agonisten) bzw. in Tabelle 4C (Antagonisten) erfüllen.
21. Nur Mikrotiterplatten, die alle oben genannten Akzeptanzkriterien erfüllen, werden als gültig betrachtet und können zur Bewertung der Reaktion der Prüfchemikalien berücksichtigt werden.
22. Die Akzeptanzkriterien gelten sowohl für Vorversuche als auch für die Hauptversuche.

Tabelle 1

**Konzentrationen des Referenzstandards, der Positivkontrolle (PK) und der Negativkontrolle (NK) beim CALUX-Antagonisten-Bioassay**

	Stoff	CAS-Nr.	Prüfbereich (M)
Referenzstandard	17 $\beta$ -Estradiol	50-28-2	1*10 <sup>-13</sup> - 1*10 <sup>-10</sup>
Positivkontrolle (PK)	17 $\alpha$ -Methyltestosteron	58-18-4	3*10 <sup>-6</sup>
Negativkontrolle (NK)	Corticosteron	50-22-6	1*10 <sup>-8</sup>

Tabelle 2

**Konzentrationen des Referenzstandards, der Positivkontrolle (PK) und der Negativkontrolle (NK) beim CALUX-Agonisten-Bioassay**

	Stoff	CAS-Nr.	Prüfbereich (M)
Referenzstandard	Tamoxifen	10540-29-1	$3 \cdot 10^{-9}$ - $1 \cdot 10^{-5}$
Positivkontrolle (PK)	4-Hydroxytamoxifen	68047-06-3	$1 \cdot 10^{-9}$
Negativkontrolle (NK)	Resveratrol	501-36-0	$1 \cdot 10^{-5}$

Tabelle 3

**Akzeptanzkriterien des ER $\alpha$ -CALUX-Agonisten-Bioassays**

<b>A – einzelne Proben auf einer Platte</b>		<b>Kriterium</b>
1	Maximale %SD bei 3 Wells (NK und PK sowie alle Verdünnungen der Prüfchemikalie und des Referenzstandards außer C0)	< 15 %
2	Maximale %SD bei 3 Wells (Referenzstandard und Lösungsmittelkontrollen der Prüfchemikalie (C0, SC))	< 30 %
3	Maximale LDH-Freisetzung als Maß der Zytotoxizität	< 120 %
<b>B – innerhalb einer einzelnen Mikrotiterplatte</b>		
4	Verhältnis der Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards (C0, Platte 1) und der Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie (SC, Platten 2 bis x)	0,5 bis 2,0
5	Verhältnis zwischen der ungefähren EC <sub>50</sub> und den höchsten Konzentrationen des Referenzstandards auf Platte 1 und der ungefähren EC <sub>50</sub> und den höchsten Konzentrationen des Referenzstandards auf den Platten 2 bis x (C4, C8)	0,70 bis 1,30
6	z-Faktor der einzelnen Platten	> 0,6
<b>C – innerhalb einer Untersuchungsreihe (alle Platten einer Reihe)</b>		
7	Sigmoidkurve des Referenzstandards	Ja (17 $\beta$ -Estradiol)
8	EC50-Bereich des Referenzstandards 17 $\beta$ -Estradiol	$4 \cdot 10^{-12}$ – $4 \cdot 10^{-11}$ M
9	Geringste n-fache Induktion der höchsten 17 $\beta$ -Estradiol-Konzentration bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards	5
10	Relative Induktion (%) PK	> 30 %
11	Relative Induktion (%) NK	< 10 %

PK: Positivkontrolle; NK: Negativkontrolle; SC: Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie; C0: Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards; SD: Standardabweichung; LDH: Laktatdehydrogenase

Tabelle 4

**Akzeptanzkriterien des ER $\alpha$ -CALUX-Antagonisten-Bioassays**

<b>A – einzelne Proben auf einer Platte</b>		<b>Kriterium</b>
1	Maximale %SD bei 3 Wells (NK und PK sowie alle Verdünnungen der Prüfchemikalie und des Referenzstandards, Lösungsmittelkontrolle (C0))	< 15 %
2	Maximale %SD bei 3 Wells (Vehikelkontrolle (VK) und höchste Konzentration des Referenzstandards (C8))	< 30 %
3	Maximale LDH-Freisetzung als Maß der Zytotoxizität	< 120 %
<b>B – innerhalb einer einzelnen Mikrotiterplatte</b>		
4	Verhältnis der Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards (C0, Platte 1) und der Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie (SC, Platten 2 bis x)	0,70 bis 1,30
5	Verhältnis zwischen der ungefähren IC <sub>50</sub> -Konzentrationen des Referenzstandards auf Platte 1 und den ungefähren IC <sub>50</sub> -Konzentrationen des Referenzstandards auf den Platten 2 bis x (C8)	0,70 bis 1,30
6	Verhältnis der höchsten Konzentrationen des Referenzstandards auf Platte 1 und den höchsten Konzentrationen des Referenzstandards auf den Platten 2 bis x (C8)	0,50 bis 2,0
7	z-Faktor der einzelnen Platten	> 0,6
<b>C – innerhalb einer Untersuchungsreihe (alle Platten einer Reihe)</b>		
8	Sigmoidkurve des Referenzstandards	Ja (Tamoxifen)
9	IC <sub>50</sub> -Bereich des Referenzstandards (Tamoxifen)	1*10 <sup>-8</sup> - 1*10 <sup>-7</sup> M
10	Niedrigste n-fache Induktion der Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards in Bezug auf die höchste Tamoxifen-Konzentration	2,5
11	Relative Induktion (%) PK	< 70 %
12	Relative Induktion (%) NK	< 85 %

PK: Positivkontrolle; NK: Negativkontrolle; VK: Vehikelkontrolle (Lösungsmittelkontrolle ohne feste Konzentration des Agonisten-Referenzstandards); SC: Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie; C0: Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards; SD: Standardabweichung; LDH: Laktatdehydrogenase

**Lösungsmittel-/Vehikelkontrolle, Referenzstandards, Positivkontrollen, Negativkontrollen**

23. Sowohl für den Vorversuch als auch für die Hauptversuche sollten die gleichen Lösungsmittel-/Vehikelkontrollen, Referenzstandards, Positivkontrollen und Negativkontrollen verwendet werden. Außerdem sollte die Konzentration von Referenzstandards, Positivkontrollen und Negativkontrollen identisch sein.

*Lösungsmittelkontrolle*

24. Das zur Auflösung einer Prüfchemikalie verwendete Lösungsmittel sollte als Lösungsmittelkontrolle geprüft werden. Bei der Validierung des ER $\alpha$ -CALUX-Bioassays wurde Dimethylsulfoxid (DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5) als Vehikel verwendet. Wenn ein anderes Vehikel als DMSO verwendet wird, sollten alle Referenzstandards, Kontrollen und Prüfchemikalien mit diesem Vehikel geprüft werden. Dabei ist zu beachten, dass die Lösungsmittelkontrolle bei den Agonisten-Untersuchungen den Agonisten-Referenzstandard 17 $\beta$ -Estradiol in einer bestimmten Konzentration (etwa EC<sub>50</sub>) enthält. Zur Untersuchung des bei Antagonisten-Assays zu verwendenden Lösungsmittels sollte eine Vehikelkontrolle zubereitet und geprüft werden.

*Vehikelkontrolle (Antagonisten)*

25. Dabei ist zu beachten, dass zum Assay-Medium der Agonisten-Referenzstandard 17 $\beta$ -Estradiol in einer bestimmten Konzentration (etwa EC<sub>50</sub>) hinzugegeben wurde. Um das zur Lösung der Prüfchemikalien für Antagonisten zu verwendende Lösungsmittel zu prüfen, ist ein Assay-Medium ohne bestimmte Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17 $\beta$ -Estradiol zuzubereiten. Diese Kontrollprobe wird als Vehikelkontrolle bezeichnet. Bei der Validierung des ER $\alpha$ -CALUX-Bioassays wurde Dimethylsulfoxid (DMSO, 1 % (v/v); CASRN 67-68-5) als Vehikel verwendet. Wenn ein anderes Vehikel als DMSO verwendet wird, sollten alle Referenzstandards, Kontrollen und Prüfchemikalien mit diesem Vehikel geprüft werden.

*Referenzstandards*

26. Der Referenzstandard für Agonisten ist 17 $\beta$ -Estradiol (Tabelle 1). Die Referenzstandards umfassen eine Verdünnungsreihe mit 17 $\beta$ -Estradiol in acht Konzentrationen ( $1 \cdot 10^{-13}$ ,  $3 \cdot 10^{-13}$ ,  $1 \cdot 10^{-12}$ ,  $3 \cdot 10^{-12}$ ,  $6 \cdot 10^{-12}$ ,  $1 \cdot 10^{-11}$ ,  $3 \cdot 10^{-11}$  und  $1 \cdot 10^{-10}$  M).
27. Der Referenzstandard für Antagonisten ist Tamoxifen (Tabelle 2). Die Referenzstandards umfassen eine Verdünnungsreihe mit Tamoxifen in acht Konzentrationen ( $3 \cdot 10^{-9}$ ,  $1 \cdot 10^{-8}$ ,  $3 \cdot 10^{-8}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $3 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $3 \cdot 10^{-6}$  und  $1 \cdot 10^{-5}$  M). Jede der Konzentrationen des Antagonisten-Referenzstandards wird parallel mit einer bestimmten Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17 $\beta$ -Estradiol ( $3 \cdot 10^{-12}$  M) inkubiert.

*Positivkontrolle*

28. Als Positivkontrolle für Agonisten-Assays wird 17 $\alpha$ -Methyltestosteron verwendet (Tabelle 1).
29. Die Positivkontrolle für Antagonisten-Assays besteht aus 4-Hydroxytamoxifen (Tabelle 2). Die Antagonisten-Positivkontrolle wird parallel mit einer bestimmten Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17 $\beta$ -Estradiol ( $3 \cdot 10^{-12}$  M) inkubiert.

*Negativkontrolle*

30. Als Negativkontrolle für Agonisten-Assays wird Corticosteron verwendet (Tabelle 1).
31. Die Negativkontrolle für Antagonisten-Assays besteht aus Resveratrol (Tabelle 2). Die Antagonisten-Negativkontrolle wird parallel mit einer bestimmten Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17 $\beta$ -Estradiol ( $3 \cdot 10^{-12}$  M) inkubiert.

Zum Nachweis der Eignung des Labors siehe Nummer 14 und Tabellen 3 und 4 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“ bei dieser Prüfmethode.

### **Vehikel**

32. Das Vehikel zur Lösung von Prüfchemikalien sollte die Prüfchemikalien vollständig auflösen und sich mit dem Zellmedium mischen. Geeignete Lösungsmittel sind DMSO, Wasser und Ethanol (mit einer Reinheit 95-100 %). Wenn DMSO als Lösungsmittel verwendet wird, sollte die maximale DMSO-Konzentration nicht mehr als 1 % (v/v) betragen. Vor der Verwendung sollte in einer Prüfung sichergestellt werden, dass das Lösungsmittel nicht zytotoxisch wirkt und die Durchführung des Assays nicht beeinflusst.

### **Zubereitung der Referenzstandards, Positivkontrollen, Negativkontrollen und Prüfchemikalien**

33. Referenzstandards, Positivkontrollen, Negativkontrollen und Prüfchemikalien werden in 100 % DMSO (oder einem sonstigen geeigneten Lösungsmittel) gelöst. Anschließend werden von diesem Lösungsmittel geeignete (serielle) Verdünnungen zubereitet. Vor der Lösung sollten sich alle Stoffe an die Raumtemperatur anpassen können. Frisch zubereitete Vorratslösungen der Referenzstandards, der Positivkontrollen, der Negativkontrollen und der Prüfchemikalien sollten keine erkennbaren Niederschläge oder Trübungen aufweisen. Vorräte des Referenzstandards und der Kontrollen können in größeren Mengen zubereitet werden. Vorratslösungen der Prüfchemikalien sollten für jeden Versuch frisch zubereitet werden. Endverdünnungen von Referenzstandards, Positivkontrollen, Negativkontrollen und Prüfchemikalien sollten für jeden Versuch frisch zubereitet und innerhalb von 24 Stunden nach der Zubereitung verwendet werden.

### **Löslichkeit, Zytotoxizität und Dosisfindung**

34. Beim Vorversuch wird die Löslichkeit der Prüfchemikalien im gewählten Lösungsmittel bestimmt. Für den Versuch wird eine Vorratslösung mit einer Konzentration von maximal 0,1 M zubereitet. Bei Lösungsproblemen bei dieser Konzentration sollten Vorratslösungen mit niedrigeren Konzentrationen zubereitet werden, bis die Prüfchemikalien vollständig gelöst sind. Beim Vorversuch werden serielle Verdünnungen der Prüfchemikalie im Verhältnis 1:10 untersucht. Bei der Prüfung von Agonisten und Antagonisten liegt die maximale Assay-Konzentration bei 1 mM. Nach dem Vorversuch wird ein geeigneter angepasster Konzentrationsbereich für die Prüfchemikalien ermittelt, der dann bei den Hauptversuchen zu untersuchen ist. Für Hauptversuche sollten folgende Verdünnungen verwendet werden: 1x, 3x, 10x, 30x, 100x, 300x, 1000x und 3000x.
35. Im Protokoll des Agonisten- und des Antagonisten-Assays ist eine Zytotoxizitätsprüfung vorgesehen (11). Die Zytotoxizitätsprüfung ist Bestandteil sowohl des Vorversuchs als auch der Hauptversuche. Bei der Validierung des ERA-CALUX-Bioassays wurde die Zytotoxizität nach der Exposition gegenüber den Prüfchemikalien anhand einer Untersuchung auf freigesetzte Laktatdehydrogenase (LDH) in Verbindung mit einer qualitativen visuellen Prüfung der Zellen (siehe Anlage 4.1) bewertet. Andere quantitative Methoden zur Bestimmung der Zytotoxizität (z. B. eine auf Tetrazolium beruhende kolorimetrische (MTT-)Prüfung oder ein CALUX-Bioassay zur Zytotoxizitätsprüfung) können aber ebenfalls zur Anwendung kommen. Im Allgemeinen werden Konzentrationen von Prüfchemikalien, die die Zellviabilität um mehr als 20 % beeinträchtigen, als zytotoxisch betrachtet und können bei der Auswertung der Daten daher nicht berücksichtigt werden. Bei der Untersuchung auf freigesetztes LDH ist die jeweilige Konzentration der Prüfchemikalie dann als zytotoxisch zu betrachten, wenn der Anteil des freigesetzten LDH mehr als 120 % beträgt.

### **Prüfung der chemischen Exposition und Anordnung auf der Assay-Platte**

36. Nach der Trypsinierung eines Fläschchens konfluenter kultivierter Zellen werden die Zellen mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in einem östrogenfreien Assay-Medium resuspendiert. 100  $\mu$ l resuspendierte Zellen werden in die inneren Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte resuspendiert. In die äußeren Wells werden 200  $\mu$ l Phosphatpuffer (PBS) gegeben (siehe Abbildungen 1 und 2). Die plattierten Zellen werden 24 Stunden in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit) vorinkubiert.
37. Nach der Vorinkubierung werden die Platten auf sichtbare Anzeichen von Zytotoxizität (siehe Anlage 4.1) sowie auf Kontaminationen und auf Konfluenz untersucht. Nur Platten ohne sichtbare Anzeichen für eine Zytotoxizität und für Kontaminationen sowie Platten mit einer Konfluenz von mindestens 85 % werden für die Versuche verwendet. Das Medium aus den inneren Wells wird vorsichtig entnommen und durch 200  $\mu$ l östrogenfreies Assay-Medium mit geeigneten seriellen Verdünnungen von Referenzstandards, Prüfchemikalien, Positivkontrollen, Negativkontrollen und

Lösungsmittelkontrollen ersetzt (Tabelle 5: Agonisten-Assays; Tabelle 6: Antagonisten-Assays). Alle Referenzstandards, Prüfchemikalien, Positivkontrollen, Negativkontrollen und Lösungsmittelkontrollen werden dreimal geprüft. In Abbildung 1 ist die Anordnung auf der Platte bei Agonisten-Assays dargestellt. Abbildung 2 ist die Anordnung auf der Platte bei Antagonisten-Assays zu entnehmen. Die Anordnung auf den Platten beim Vorversuch und beim Hauptversuch ist identisch. Bei der Untersuchung von Agonisten enthalten alle inneren Wells mit Ausnahme der Wells mit der Vehikelkontrolle (VK) auch eine bestimmte Konzentration des Agonisten-Referenzstandards  $17\beta$ -Estradiol ( $3 \cdot 10^{-12}$  M). Auf alle Platten mit der Prüfchemikalie (TC) sollten auch die Referenzstandards C8 und C4 gegeben werden.

38. Nachdem die Zellen allen Chemikalien ausgesetzt wurden, werden die 96-Well-Mikrotiterplatten weitere 24 Stunden in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert.

Abbildung 1

**Anordnung auf der 96-Well-Mikrotiterplatte für Vorversuche und für die endgültige Bewertung der Agonisten-Wirkung**

**Platte 1**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PK	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PK	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	PK	
E		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK:	
F		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK:	
G		SC	TC1-1	TC1-2	TC1-3	TC1-4	TC1-5	TC1-6	TC1-7	TC1-8	NK:	
H												

**Folgende Platten**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
E		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC <sub>50</sub> )	
F		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC <sub>50</sub> )	
G		SC	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C4 (EC <sub>50</sub> )	
H												

C0 = Lösungsmittel Referenzstandard

C(1-8) = Verdünnungsreihe (1-8, niedrige bis hohe Konzentrationen) des Referenzstandards

PK = Positivkontrolle

NK = Negativkontrolle

TCx-(1-8) = Verdünnungen (1-8, niedrige bis hohe Konzentrationen) der Prüfchemikalie für den Vorversuch und für die Bewertung der Agonisten-Wirkung der Prüfchemikalie x.

SC = Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie (möglichst desselben Lösungsmittels wie bei C0, wobei dies aber aus einer anderen Charge stammen kann)

Graue Zellen: = Äußere Wells, aufgefüllt mit 200 µl PBS

Abbildung 2

**Anordnung auf der 96-Well-Mikrotiterplatte für Vor- und Hauptversuche zur Bewertung der Antagonisten-Wirkung**

**Platte 1**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VK	
C		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VK	
D		C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	VK	
E		NK:	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PK	
F		NK:	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-		
G		NK:	TC1-	TC1-2	TC1-3	TC	TC1-5	TC1-	TC1-	TC1-	PK	
H												

**Folgende Platten**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
C		SC	TC2-1	TC2-2	TC2-3	TC2-4	TC2-5	TC2-6	TC2-7	TC2-8	C8 (max)	
D		SC	TC2-1									
E		C4 (IC <sub>50</sub> )	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
F		C4 (IC <sub>50</sub> )	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
G		C4 (IC <sub>50</sub> )	TCx-1	TCx-2	TCx-3	TCx-4	TCx-5	TCx-6	TCx-7	TCx-8	C8 (max)	
H												

C0 = Lösungsmittel Referenzstandard

C(1-8) = Verdünnungsreihe (1-8, niedrige bis hohe Konzentrationen) des Referenzstandards

NK = Negativkontrolle

PK = Positivkontrolle

TCx-(1-8) = Verdünnungen (1-8, niedrige bis hohe Konzentrationen) der Prüfchemikalie für den Vorversuch und für die Bewertung der Agonisten-Wirkung der Prüfchemikalie x.

SC = Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie (möglichst desselben Lösungsmittels wie bei C0, wobei dies aber aus einer anderen Charge stammen kann)

VK = Vehikelkontrolle (Lösungsmittelkontrolle ohne feste Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17β-Estradiol).

Graue Zellen: = Äußere Wells, aufgefüllt mit 200 µl PBS

Hinweis: Die inneren Wells mit Ausnahme der Wells mit der Vehikelkontrolle (VK) enthalten alle auch eine bestimmte Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17β-Estradiol (3,0\*10<sup>-12</sup> M).

gestrichen - siehe Teil 0



### Messung der Luminiszenz

39. Die Messung der Luminiszenz wird im Protokoll zum Agonisten- und zum Antagonisten-Assay (10) eingehend beschrieben. Das Medium wird aus den Wells entnommen. Nach 24-stündiger Inkubation werden die Zellen lysiert, um die Zellmembran aufzuschließen und die Luciferase-Aktivität messen zu können.
40. Zur Messung der Luminiszenz wird für dieses Verfahren ein Luminometer mit zwei Injektoren benötigt. Die Luciferase-Reaktion wird durch Injektion des Luciferinsubstrats induziert. Durch Zugabe von 0,2 M NaOH wird die Reaktion gestoppt. Dadurch werden Luminiszenzübertragungen zwischen den Wells verhindert.
41. Das von den einzelnen Wells emittierte Licht wird in RLU (relativen Lichteinheiten) pro Well ausgedrückt.

### Vorversuch

42. Anhand der Vorversuche wird ein optimierter Konzentrationsbereich der Prüfchemikalien für den Hauptversuch ermittelt. Die Auswertung der Ergebnisse des Vorversuchs und die Ermittlung des optimierten Konzentrationsbereichs der Prüfchemikalien für den Hauptversuch werden eingehend im Protokoll zum Agonisten- und zum Antagonisten-Assay (10) beschrieben. Im Folgenden werden die Verfahren zur Ermittlung des Konzentrationsbereichs der Prüfchemikalien für die Agonisten- und die Antagonisten-Prüfung beschrieben. Informationen zur Gestaltung der Verdünnungsreihen sind den Tabellen 5 und 6 zu entnehmen.

#### *Auswahl von Konzentrationen zur Bewertung agonistischer Wirkungen*

43. Im Vorversuch sollten die Prüfchemikalien mit den in den Tabellen 5 (Agonisten) und 6 (Antagonisten) genannten Verdünnungen geprüft werden. Alle Konzentrationen sind in drei Wells zu prüfen, die auf den Platten angeordnet werden, wie in Abbildung 1 (Agonisten) bzw. Abbildung 2 (Antagonisten) beschrieben.
44. Nur Untersuchungsergebnisse, die die in Tabelle 3 genannten Akzeptanzkriterien erfüllen, werden als gültig betrachtet und können zur Bewertung der Reaktion der Prüfchemikalien berücksichtigt werden. Wenn bei einer Untersuchung eine oder mehrere Mikrotiterplatten die Akzeptanzkriterien nicht erfüllen, sollten die betreffenden Mikrotiterplatten nochmals geprüft werden. Erfüllt die erste Platte mit der vollständigen Verdünnungsreihe des Referenzstandards die Akzeptanzkriterien nicht, muss die gesamte Prüfreihe (6 Platten) neu geprüft werden.
45. In folgenden Fällen sollten die Ausgangskonzentrationsbereiche der Prüfchemikalien angepasst und der Vorversuch wiederholt werden:
  - In der Prüfung wurde eine zytotoxische Wirkung festgestellt. Der Vorversuch sollte mit niedrigeren nicht zytotoxischen Konzentrationen der Prüfchemikalie wiederholt werden.
  - Im Vorversuch mit der Prüfchemikalie wurde keine vollständige Dosis-Reaktions-Kurve ermittelt, weil bei den geprüften Konzentrationen bereits die maximale Induktion erreicht wird. Der Vorversuch sollte mit niedrigeren Konzentrationen der Prüfchemikalie wiederholt werden.
46. Wenn eine gültige dosisabhängige Reaktion festgestellt wird, sollte die (niedrigste) Konzentration mit maximaler Induktion, aber ohne Anzeichen einer Zytotoxizität, gewählt werden. Die in den Hauptversuchen zu prüfende höchste Konzentration der Prüfchemikalie wird dreimal mit dieser gewählten Konzentration geprüft.
47. Beginnend mit der oben ermittelten maximalen Konzentration wird eine vollständige optimierte Verdünnungsreihe der Prüfchemikalie mit den in Tabelle 5 angegebenen Verdünnungsschritten zubereitet.
48. Prüfchemikalien, bei denen keine agonistische Wirkung festgestellt wurde, werden in den Hauptversuchen beginnend mit der im Vorversuch ermittelten maximalen nicht zytotoxischen Konzentration geprüft.

#### *Auswahl von Konzentrationen zur Bewertung antagonistischer Wirkungen*

49. Nur Untersuchungsergebnisse, die die in Tabelle 4 genannten Akzeptanzkriterien erfüllen, werden als gültig betrachtet und können zur Bewertung der Reaktion der Prüfchemikalien berücksichtigt werden. Wenn bei einer Untersuchung eine oder mehrere Mikrotiterplatten die Akzeptanzkriterien nicht erfüllen, sollten die betreffenden Mikrotiterplatten nochmals geprüft werden. Erfüllt die erste Platte mit der vollständigen Verdünnungsreihe des Referenzstandards die Akzeptanzkriterien nicht, muss die gesamte Prüfreihe (6 Platten) neu geprüft werden.
  
50. In folgenden Fällen sollten die Ausgangskonzentrationsbereiche der Prüfchemikalien angepasst und der Vorversuch wiederholt werden:
  - In der Prüfung wurde eine zytotoxische Wirkung festgestellt. Der Vorversuch sollte mit niedrigeren nicht zytotoxischen Konzentrationen der Prüfchemikalie wiederholt werden.
  
  - Im Vorversuch mit der Prüfchemikalie wurde keine vollständige Dosis-Reaktions-Kurve ermittelt, weil bei den geprüften Konzentrationen bereits die maximale Hemmung erreicht wird. Der Vorversuch sollte mit niedrigeren Konzentrationen der Prüfchemikalie wiederholt werden.
  
51. Wenn eine gültige dosisabhängige Reaktion festgestellt wird, sollte die (niedrigste) Konzentration mit maximaler Hemmung, aber ohne Anzeichen einer Zytotoxizität, gewählt werden. Die in den Hauptversuchen zu prüfende höchste Konzentration der Prüfchemikalie wird dreimal mit dieser gewählten Konzentration geprüft.
  
52. Beginnend mit der oben ermittelten maximalen Konzentration wird eine vollständige optimierte Verdünnungsreihe der Prüfchemikalie mit den in Tabelle 6 angegebenen Verdünnungsschritten zubereitet.
  
53. Prüfchemikalien, bei denen keine antagonistische Wirkung festgestellt wurde, werden in den Hauptversuchen beginnend mit der im Vorversuch geprüften maximalen nicht zytotoxischen Konzentration geprüft.

#### **Hauptversuche**

54. Nach der Bestimmung der optimalen Konzentrationsbereiche sollten die Prüfchemikalien mit den in den Tabellen 5 (Agonisten) und 6 (Antagonisten) genannten Verdünnungen geprüft werden. Alle Konzentrationen sind in drei Wells zu prüfen, die auf den Platten angeordnet werden, wie in Abbildung 1 (Agonisten) bzw. Abbildung 2 (Antagonisten) beschrieben.
  
55. Nur Untersuchungsergebnisse, die die in den Tabellen 3 und 4 genannten Akzeptanzkriterien erfüllen, werden als gültig betrachtet und können zur Bewertung der Reaktion der Prüfchemikalien berücksichtigt werden. Wenn bei einer Untersuchung eine oder mehrere Mikrotiterplatten die Akzeptanzkriterien nicht erfüllen, sollten die betreffenden Mikrotiterplatten nochmals geprüft werden. Erfüllt die erste Platte mit der vollständigen Verdünnungsreihe des Referenzstandards die Akzeptanzkriterien nicht, muss die gesamte Prüfreihe (6 Platten) neu geprüft werden.

Tabelle 5

**Konzentrationen und Verdünnungen von Referenzstandards, Kontrollen und Prüfchemikalien für die Agonisten-Prüfung**

Referenzstandard 17 $\beta$ -Estradiol		TCx – Vorversuch		TCx – Vorversuch		Kontrollen	
Konz. (M)		Verdünnung		Verdünnung		Konz. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PK	3*10 <sup>-6</sup>
C1	1*10 <sup>-13</sup>	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NC	1*10 <sup>-8</sup>
C2	3*10 <sup>-13</sup>	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	1*10 <sup>-12</sup>	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	3*10 <sup>-12</sup>	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	6*10 <sup>-12</sup>	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x		
C6	1*10 <sup>-11</sup>	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x		
C7	3*10 <sup>-11</sup>	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x		
C8	1*10 <sup>-10</sup>						

TCx –Prüfchemikalie x

PK –Positivkontrolle (17 $\alpha$ -Methyltestosteron)

NK –Negativkontrolle (Corticosteron)

C0 –Lösungsmittelkontrolle Referenzstandard

SC –Lösungsmittelkontrolle Prüfchemikalie

gestrichen - siehe Teil 0

Tabelle 6

**Konzentrationen und Verdünnungen von Referenzstandards, Kontrollen und Prüfchemikalien für die Antagonisten-Prüfung**

Referenzstandard Tamoxifen		TCx – Vorversuch		TCx – Vorversuch		Kontrollen	
Konz. (M)		Verdünnung		Verdünnung		Konz. (M)	
C0	0	TCx-1	10 000 000 x	TCx-1	3 000 x	PK	$1 \cdot 10^{-9}$
C1	$3 \cdot 10^{-9}$	TCx-2	1 000 000 x	TCx-2	1 000 x	NK	$1 \cdot 10^{-5}$
C2	$1 \cdot 10^{-8}$	TCx-3	100 000 x	TCx-3	300 x	C0	0
C3	$3 \cdot 10^{-8}$	TCx-4	10 000 x	TCx-4	100 x	SC	0
C4	$1 \cdot 10^{-7}$	TCx-5	1 000 x	TCx-5	30 x		
C5	$3 \cdot 10^{-7}$	TCx-6	100 x	TCx-6	10 x	<b>Hinzugegebener Agonist</b>	
C6	$1 \cdot 10^{-6}$	TCx-7	10 x	TCx-7	3 x	<b>Konz. (M)</b>	
C7	$3 \cdot 10^{-6}$	TCx-8	1 x	TCx-8	1 x	17 $\beta$ -Estradiol	$3 \cdot 10^{-12}$
C8	$1 \cdot 10^{-5}$						

TCx –Prüfchemikalie x

PK –Positivkontrolle (4-Hydroxytamoxifen)

NK –Negativkontrolle (Resveratrol)

C0 –Lösungsmittelkontrolle Referenzstandard

SC –Lösungsmittelkontrolle Prüfchemikalie

VK –Vehikelkontrolle (enthält keine bestimmte Konzentration des Agonisten-Referenzstandards 17 $\beta$ -Estradiol ( $3,0 \cdot 10^{-12}$  M))

gestrichen - siehe Teil 0

### Erfassung und Auswertung der Daten

56. Nach dem Vorversuch und dem Hauptversuch sollten  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ,  $PC_{10}$ ,  $PC_{50}$  und die maximale Induktion ( $TCx_{max}$ ) der Prüfchemikalien für Agonisten-Prüfungen ermittelt werden. Bei Antagonisten-Prüfungen sollten  $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$ ,  $PC_{80}$ ,  $PC_{50}$  und die niedrigste Induktion ( $TCx_{min}$ ) berechnet werden. In den Abbildungen 3 (Agonisten) und 4 (Antagonisten) werden diese Parameter grafisch dargestellt. Die benötigten Parameter werden ausgehend von der relativen Induktion der einzelnen Prüfchemikalien (bezogen auf die maximale Induktion des Referenzstandards (= 100 %) berechnet. Zur Auswertung der Daten wird eine nicht lineare Regression (variable Steigung, 4 Parameter) mit der folgenden Formel vorgenommen.

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{(1 + 10^{(lgEC_{50} - X) * Hill Slope})}$$

Dabei gilt:

X = Logarithmus der Dosis bzw. Konzentration

Y = Reaktion (relative Induktion (%))

Top = Maximale Induktion (%)

Bottom = Niedrigste Induktion (%)

$LogEC_{50}$  = Logarithmus der Konzentration, bei der 50 % der maximalen Reaktion beobachtet werden

HillSlope = Steigungsfaktor oder Hillslope

57. Die Rohdaten des Luminometers in RLU (relative Lichteinheiten) werden in die Tabelle zur Analyse der Daten der Vorversuche und der Hauptversuche übertragen. Die Rohdaten sollten die in den Tabellen 3A und 3B (Agonisten) und 4A und 4B (Antagonisten) genannten Akzeptanzkriterien erfüllen. Wenn die Rohdaten die Akzeptanzkriterien erfüllen, werden mit den folgenden Schritten die benötigten Parameter berechnet:

#### Agonisten

- Die durchschnittlichen RLU der Lösungsmittelkontrolle des Referenzstandards werden von den Rohdaten der Untersuchung der Referenzstandards abgezogen.
- Die durchschnittlichen RLU der Lösungsmittelkontrolle der Prüfchemikalie werden von den Rohdaten der Untersuchung der Prüfchemikalien abgezogen.

- Die relative Induktion der einzelnen Konzentrationen des Referenzstandards wird berechnet. Die Induktion der höchsten Konzentration des Referenzstandards wird als 100 % angenommen.
  
- Die relative Induktion der einzelnen Konzentrationen der Prüfchemikalie wird in Bezug zur höchsten Konzentration des als 100 % angenommenen Referenzstandards gesetzt.
  
- Die Untersuchungsergebnisse werden durch nicht lineare Regression (variable Steigung, 4 Parameter) berechnet.
  
- $EC_{50}$  und  $EC_{10}$  des Referenzstandards werden berechnet.
  
- $EC_{50}$  und  $EC_{10}$  der Prüfchemikalien werden berechnet.
  
- Die maximale relative Induktion der Prüfchemikalie ( $TC_{max}$ ) wird berechnet.
  
- $PC_{10}$  und  $PC_{50}$  der Prüfchemikalien werden berechnet.

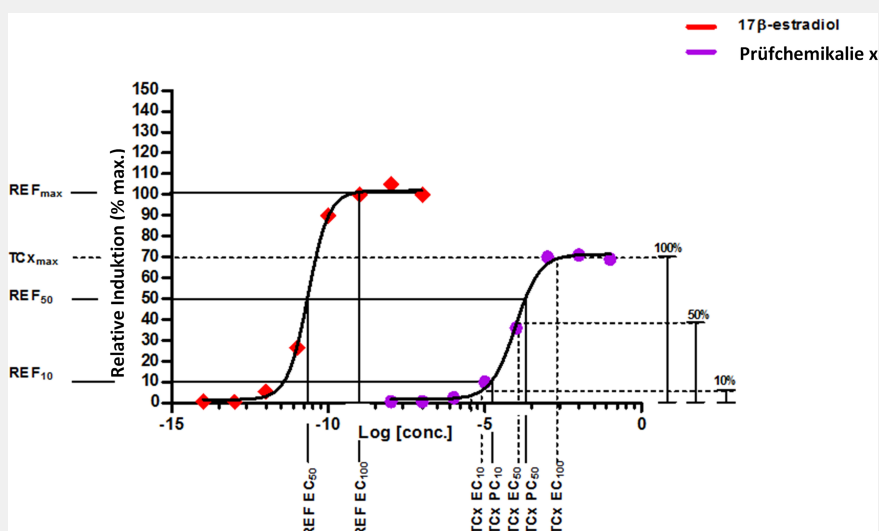
Bei Prüfchemikalien kann infolge einer bestehenden Zytotoxizität oder aufgrund von Löslichkeitsproblemen möglicherweise nicht immer eine vollständige Dosis-Reaktions-Kurve dargestellt werden. In diesen Fällen können  $EC_{50}$ ,  $EC_{10}$  und  $PC_{50}$  nicht bestimmt werden, und die Darstellung beschränkt sich auf  $PC_{10}$  und  $TC_{max}$ .

### **Antagonisten**

- Die durchschnittlichen RLU der höchsten Konzentration des Referenzstandards werden von den Rohdaten der Untersuchung der Referenzstandards abgezogen.
  
- Die durchschnittlichen RLU der höchsten Konzentration des Referenzstandards werden von den Rohdaten der Untersuchung der Prüfchemikalien abgezogen.
  
- Die relative Induktion der einzelnen Konzentrationen des Referenzstandards wird berechnet. Die Induktion der niedrigsten Konzentration des Referenzstandards wird als 100 % angenommen.
  
- Die relative Induktion der einzelnen Konzentrationen der Prüfchemikalie wird in Bezug zur niedrigsten Konzentration des als 100 % angenommenen Referenzstandards gesetzt.

- Die Untersuchungsergebnisse werden durch nicht lineare Regression (variable Steigung, 4 Parameter) berechnet.
- $IC_{50}$  und  $IC_{20}$  des Referenzstandards werden berechnet.
- $IC_{50}$  und  $IC_{20}$  der Prüfchemikalien werden berechnet.
- Die niedrigste relative Induktion der Prüfchemikalie ( $TC_{max}$ ) wird berechnet.
- $PC_{80}$  und  $PC_{50}$  der Prüfchemikalien werden berechnet.

Abbildung 3  
Im Agonisten-Assay bestimmte Parameter



$EC_{10}$  = Konzentration eines Stoffs, bei der 10 % seiner maximalen Reaktion beobachtet werden

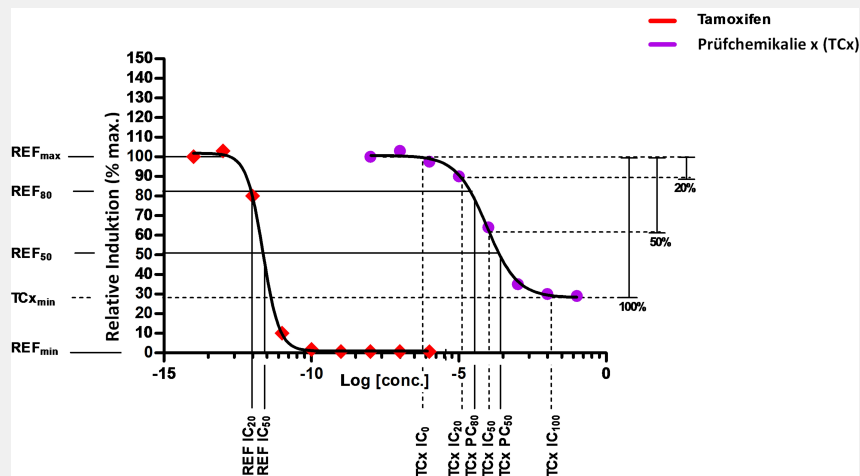
$EC_{50}$  = Konzentration eines Stoffs, bei der 50 % seiner maximalen Reaktion beobachtet werden

$PC_{10}$  = Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der deren Reaktion  $EC_{10}$  des Referenzstandards entspricht

$PC_{50}$  = Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der deren Reaktion  $EC_{50}$  des Referenzstandards entspricht

$TC_{max}$  = maximale relative Induktion der Prüfchemikalie

Abbildung 4  
Im Antagonisten-Assay bestimmte Parameter



$IC_{20}$  = Konzentration eines Stoffs, bei der 80 % seiner maximalen Reaktion (Hemmung 20 %) beobachtet werden

$IC_{50}$  = Konzentration eines Stoffs, bei der 50 % seiner maximalen Reaktion (Hemmung 50 %) beobachtet werden

$PC_{80}$  = Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der deren Reaktion  $IC_{20}$  des Referenzstandards entspricht

$PC_{50}$  = Konzentration einer Prüfchemikalie, bei der deren Reaktion  $IC_{50}$  des Referenzstandards entspricht

$TCx_{min}$  = niedrigste relative Induktion der Prüfchemikalie

Bei Prüfchemikalien kann infolge einer bestehenden Zytotoxizität oder aufgrund von Löslichkeitsproblemen möglicherweise nicht immer eine vollständige Dosis-Reaktions-Kurve dargestellt werden. In diesen Fällen können  $IC_{50}$ ,  $IC_{20}$  und  $PC_{50}$  nicht bestimmt werden, und die Darstellung beschränkt sich auf  $PC_{20}$  und  $TCx_{min}$ .

58. Die Ergebnisse sollten auf zwei (oder drei) unabhängigen Prüfläufen beruhen. Wenn bei zwei Prüfläufen vergleichbare und daher auch reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden, ist ein dritter Prüflauf nicht erforderlich. Ergebnisse können dann akzeptiert werden, wenn die folgenden Anforderungen erfüllt sind:

— Die Ergebnisse erfüllen die Akzeptanzkriterien (Nummern 14-22)

— und sind reproduzierbar.



### Kriterien für die Auswertung von Daten

59. Bei der Auswertung der Daten und der Einstufung einer Prüfchemikalie als positiv oder negativ sind die folgenden Kriterien zu berücksichtigen:

#### Agonisten

Bei jedem Hauptversuch wird eine Prüfchemikalie als **positiv** betrachtet, wenn die folgenden Bedingungen erfüllt sind:

- 1  $TC_{max}$  ist größer oder gleich 10 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards ( $REF_{10}$ ).
- 2 Mindestens 2 aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie sind größer oder gleich  $REF_{10}$ .

Bei jedem Hauptversuch wird eine Prüfchemikalie als **negativ** betrachtet, wenn die folgenden Bedingungen erfüllt sind:

- 1  $TC_{max}$  beträgt nicht mehr als 10 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards ( $REF_{10}$ ).
- 2 Weniger als 2 aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie sind größer oder gleich  $REF_{10}$ .

#### Antagonisten

Bei jedem Hauptversuch wird eine Prüfchemikalie als **positiv** betrachtet, wenn die folgenden Bedingungen erfüllt sind:

- 1  $TC_{min}$  ist kleiner oder gleich 80 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards ( $REF_{80}$  = Hemmung 20 %).
- 2 Mindestens 2 aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie sind kleiner oder gleich  $REF_{80}$ .

Bei jedem Hauptversuch wird eine Prüfchemikalie als **negativ** betrachtet, wenn die folgenden Bedingungen erfüllt sind:

- 1  $TC_{min}$  ist größer als 80 % der maximalen Reaktion des Referenzstandards ( $REF_{80}$  = Hemmung 20 %).
- 2 Weniger als 2 aufeinander folgende Konzentrationen der Prüfchemikalie sind kleiner oder gleich  $REF_{80}$ .

60. Zur Beschreibung der Wirkung der positiven Reaktion einer Prüfchemikalie sollten die Wirkstärke (Agonisten:  $TC_{max}$ ; Antagonisten:  $TC_{min}$ ) und die Konzentration angegeben werden, bei der die Wirkung eintritt (Agonisten:  $EC_{10}$ ,  $EC_{50}$ ,  $PC_{10}$ ,  $PC_{50}$ ; Antagonisten:  $IC_{20}$ ,  $IC_{50}$ ,  $PC_{80}$ ,  $PC_{50}$ ).

#### PRÜFBERICHT

61. Siehe Nummer 20 im Abschnitt „ELEMENTE DES ER-TA-ASSAYS“.

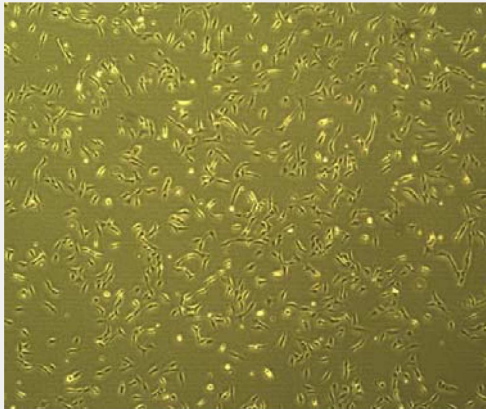
#### LITERATUR

- (1) OECD (2016). Draft Validation report of the (anti-) ER $\alpha$  CALUX bioassay – transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (2) Sonneveld, E., Jansen, H.J., Riteco, J.A., Brouwer, A., van der Burg, B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.
- (3) Quaedackers, M.E., van den Brink, C.E., Wissink, S., Schreurs, R.H.M.M., Gustafsson, J.A., van der Saag, P.T. und van der Burg, B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER) $\alpha$  and not through ER $\beta$ . *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.
- (4) Thorne, N, Inglese, J. und Auld, D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, *Chemistry and Biology* 17(6):646-657.
- (5) Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J.P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J.C., Cavailès, V. und Balaguer, P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.*, 71, 1459-1469.
- (6) Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B. und Gustafsson, J.A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.*, 139, 4252-4263.
- (7) Sotoca, A.M., Bovee, T.F.H., Brand, W., Velikova, N., Boeren, S., Murk, A.J., Vervoort, J., Rietjens, I.M.C.M. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 122, 204-211.

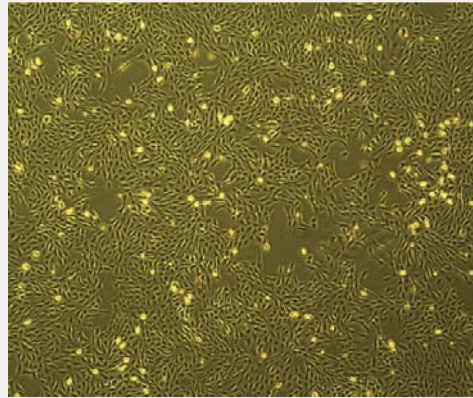
- (8) Sonneveld, E., Riteco, J.A.C., Jansen, H.J., Pieterse, B., Brouwer, A., Schoonen, W.G. und van der Burg, B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.*, 89(1), 173-187.
- (9) Kobayashi, H., Yamamoto, K., Eguchi, M., Kubo, M., Nakagami, S., Wakisaka, S., Kaizuka, M. und Ishii, H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.*, 57(4), 769-771.
- (10) Zhang, J.-H., Chung, T.D.Y. und Oldenburg, K.R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Sci.*, 4, 67-73.
- (11) Besselink, H., Middelhof, I. und Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ER $\alpha$  CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Niederlande.

Anlage 4.1

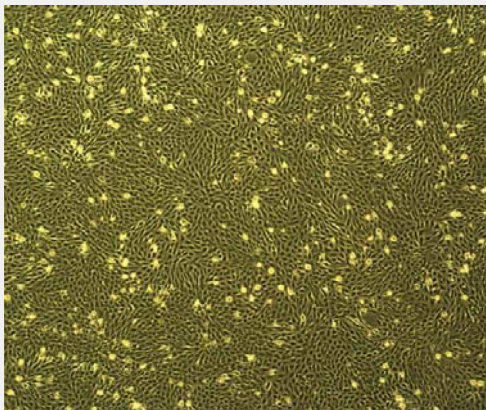
VISUELLE PRÜFUNG DER ZELLVIABILITÄT



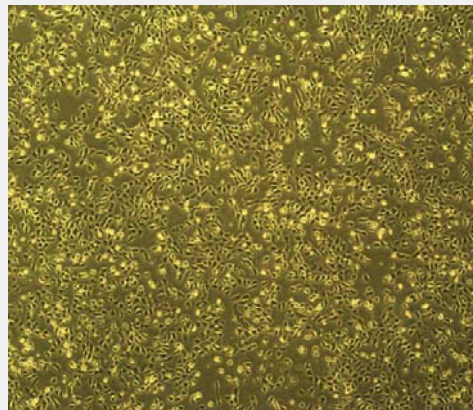
<5 % Konfluenz Die Zellen wurden gerade geimpft. Zellviabilität 100 % Einstufung: „Keine Zytotoxizität“



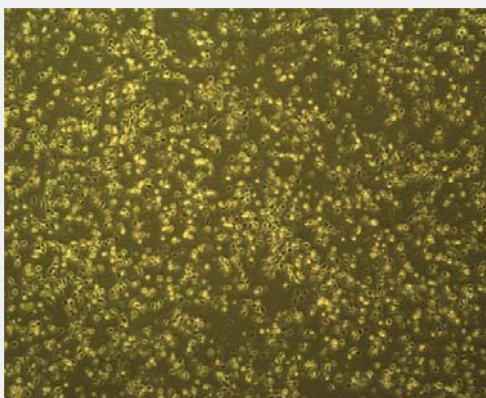
Konfluenz > 85 % In diesem Stadium erfolgt die Exposition der Zellen gegenüber der Prüfchemikalie. Zellviabilität > 95 % Einstufung: „Keine Zytotoxizität“



Konfluenz > 95 % Die Zellen sind dicht gepackt und beginnen zu überwachsen. Zellviabilität > 95 % Einstufung: „Keine Zytotoxizität“



Zellviabilität < 25 % Die Zellen lösen sich, und der Kontakt zwischen den Zellen wird geringer. Die Zellen runden sich ab. Einstufung: „Zytotoxizität“



Zellviabilität < 5 %. Die Zellen sind vollständig abgelöst, und der Kontakt zwischen den Zellen ist unterbrochen. Die Zellen runden sich ab. Einstufung: „Zytotoxizität“

gestrichen - siehe Teil 0