

B.70 IN-VITRO-ASSAYS MIT EINEM HUMANEN REKOMBINANTEN ÖSTROGENREZEPTOR (hrER) ZUR ERMITTLUNG VON CHEMIKALIEN MIT ER-BINDUNGS-AFFINITÄT

ALLGEMEINE EINLEITUNG

Leistungsbezogene OECD-Prüfrichtlinie

1. Diese Prüfmethode entspricht der OECD-Prüfrichtlinie (TG) 493 (2015). TG 493 ist eine leistungsbezogene Prüfrichtlinie (PBTG), die die Methode für *In-vitro*-Assays unter Verwendung eines humanen rekombinanten Östrogenrezeptors zur Ermittlung von Stoffen mit Bindungsaffinität für Östrogenrezeptoren (hrER-Bindungsassays) beschreibt. Sie umfasst zwei mechanistisch und funktionell ähnliche Assays zum Nachweis von Östrogenrezeptor-Bindern (d. h. ER α -Bindern) und sollte die Entwicklung neuer ähnlicher oder modifizierter Prüfmethode 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 Freyberger-Wilson-(FW-)*In-vitro*-Östrogenrezeptor-(ER-)Bindungsassay mit dem in voller Länge rekombinanten humanen ER α (2) und
- der vom Chemical Evaluation and Research Institute (CERI) beschriebene *In-vitro*-Östrogenrezeptor-Bindungsassay mit einem Ligandenbindungs-Domänen-Protein des humanen rekombinanten ER α (2).

Leistungsstandards (PS) (3) sollen die Entwicklung und die Validierung ähnlicher Prüfmethode für denselben Gefahren-Endpunkt erleichtern und eine rechtzeitige Änderung der PBTG 493 ermöglichen, damit ähnliche Assays in einer aktualisierten PBTG berücksichtigt werden können. Ähnliche Assays werden jedoch erst dann berücksichtigt, wenn die OECD die Assays geprüft und die Erfüllung der Leistungsstandards bestätigt hat. Die in TG 493 aufgenommenen Assays erfüllen die Anforderungen der OECD-Mitgliedstaaten an Prüfergebnisse bei Östrogenrezeptor-Bindungen 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 Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (4) als Anhänge beigelegt. Der CF umfasst fünf Ebenen mit jeweils eigener biologischer Komplexität. Die in dieser Prüfmethode beschriebenen ER-Bindungsassays sind Ebene 2 (*In-vitro*-Assays zur Ermittlung von Daten über ausgewählte endokrine Mechanismen/Wirkungspfade) zuzuordnen. Diese Prüfmethode betrifft *In-vitro*-Rezeptor-Bindungsassays zur Ermittlung von Liganden für den humanen Östrogenrezeptor alpha (ER α).
3. Die Relevanz des *In-vitro*-ER-Bindungsassays für biologische Funktionen wurde eindeutig nachgewiesen. ER-Bindungsassays sind zur Ermittlung von Chemikalien vorgesehen, die den Östrogen-Hormonweg unterbrechen können. Sie wurden in den letzten beiden Jahrzehnten in großem Umfang zur Charakterisierung der Verteilung von ER in Geweben und zur Identifizierung von ER-Agonisten/-Antagonisten durchgeführt. Diese Assays spiegeln das Zusammenwirken zwischen Liganden und Rezeptoren als ersten Schritt des Östrogen-Signalwegs wider und sind bei allen Wirbeltieren wesentlich für die Reproduktionsfunktion.

4. Das Zusammenwirken von Östrogenen mit ER kann die Transkription von Genen beeinträchtigen, die durch Östrogene gesteuert werden, und nicht genomische Wirkungen induzieren. Dadurch können Zellprozesse ausgelöst oder gehemmt werden (u. a. für die Zellproliferation, für die normale fetale Entwicklung und für die Reproduktion erforderliche Prozesse) (5) (6) (7). Störungen normaler östrogenen Systeme können Beeinträchtigungen der normalen Entwicklung (Ontogenese), der reproduktiven Gesundheit und des Reproduktionssystems auslösen. Eine unangemessene Übertragung von ER-Signalen kann beispielsweise das Risiko einer hormonbedingten Krebserkrankung erhöhen, die Fruchtbarkeit beeinträchtigen und das Wachstum und die Entwicklung von Föten beeinflussen (8).
5. *In-vitro*-Bindungsassays beruhen auf einer unmittelbaren Wechselwirkung eines Stoffs mit einer spezifischen Rezeptor-liganden-Bindungsstelle, die die Transkription eines Reporter-Genprodukts steuert. Wesentliches Element des hrER α -Bindungsassays (hrER α = humaner rekombinanter Östrogenrezeptor alpha) ist die Fähigkeit eines radioaktiv markierten Liganden ($[^3\text{H}]$ -17 β -Estradiol), bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie (z. B. eines Bindungskonkurrenten) eine Bindung mit dem ER einzugehen. Prüfchemikalien mit einer starken ER-Affinität konkurrieren mit dem radioaktiv markierten Liganden bei einer niedrigeren Konzentration als Chemikalien mit einer geringeren Affinität für diesen Rezeptor. Dieser Assay beinhaltet zwei wesentliche Elemente: einen Versuch zur Ermittlung von Sättigungsbindungen zur Charakterisierung der Parameter der Wechselwirkung zwischen Rezeptoren und Liganden und zur Dokumentation der ER-Spezifität und einen anschließenden Versuch zur Ermittlung konkurrierender Bindungen, mit dem die Konkurrenz zwischen einer Prüfchemikalie und einem radioaktiv markierten Liganden im Hinblick auf die Bindung an den ER beschrieben wird.
6. In Studien zur Validierung der CER1- und der FW-Bindungsassays wurden die Relevanz und die Zuverlässigkeit im Hinblick auf die vorgesehene Verwendung nachgewiesen (2).
7. Die in der vorliegenden Prüfmethode verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

Anwendungsbereich und Einschränkungen der Rezeptor-Bindungsassays

8. Diese Assays werden für Screening- und Priorisierungszwecke vorgeschlagen, können aber auch Aufschluss über molekulare Auslösungsereignisse (MIE = Molecular Initiation Events) geben. Die betreffenden Informationen können im Rahmen von Beweiskraftermittlungen verwendet werden. Die Assays beruhen auf der chemischen Bindung an die Ligandenbindungs-Domäne des ER α in einem *In-vitro*-System. Daher sollten Ergebnisse nicht unmittelbar für die komplexen Signal- und Steuerungswirkungen des intakten endokrinen *In-vivo*-Systems extrapoliert werden.
9. Die Bindung des natürlichen Liganden 17 β -Estradiol ist das erste einer Reihe molekularer Ereignisse, die die Transkription von Zielgenen aktivieren und schließlich zu einer physiologischen Veränderung führen (9). Die Bindung an die Ligandenbindungs-Domäne des ER α ist also als einer der Schlüsselmechanismen einer durch ER vermittelten endokrinen Störung (ED = Endocrine Disruption) zu betrachten; allerdings können ED auch infolge anderer Mechanismen auftreten, darunter (i) Wechselwirkungen mit anderen ER-Bindungsstellen als die Liganden-Bindungstasche, (ii) Wechselwirkungen mit anderen für die Übertragung von Östrogensignalen relevanten Rezeptoren, ER- β und G-Protein-gekoppelten Östrogenrezeptoren, sonstigen Rezeptoren und Enzymsystem innerhalb des Hormonsystems, (iii) die Hormonsynthese, (iv) die metabolische Aktivierung/Deaktivierung von Hormonen, (v) die Verteilung von Hormonen an Zielgewebe und (vi) die Beseitigung von Hormonen im Körper. Keiner der Assays im Rahmen dieser Prüfmethode hat diese Wirkungsweisen zum Gegenstand.

10. Gegenstand dieser Prüfmethode ist die Fähigkeit von Stoffen, Bindungen mit dem humanen ER α einzugehen. Dabei wird nicht zwischen ER α -Agonisten und ER α -Antagonisten unterschieden. Nachgelagerte Ereignisse wie Gentranskriptionen oder physiologische Veränderungen werden bei diesen Assays nicht berücksichtigt. Da bei der Validierung nur einzelne einkomponentige Stoffe verwendet wurden, wurde die Eignung für Prüfgemische nicht untersucht. Dennoch sind die Assays theoretisch auch für die Prüfung von mehrkomponentigen Stoffen und Gemischen geeignet. Bevor die Prüfmethode für die Generierung von Daten für einen bestimmten rechtlichen Zweck verwendet wird, ist zu prüfen, ob sie für den beabsichtigten Zweck angemessene Ergebnisse liefern kann und, wenn dem so ist, warum. Solche Erwägungen entfallen, wenn die Prüfung des Gemischs von Rechts wegen vorgeschrieben ist.
11. Die zellfreien Rezeptorsysteme können an sich keine Stoffwechselaktivität entwickeln und wurden in Verbindung mit metabolischen Enzymsystemen nicht validiert. Eine Stoffwechselaktivität könnte bei der Auslegung einer Studie berücksichtigt werden. Dazu wären jedoch weitere Validierungsarbeiten erforderlich.
12. Chemikalien, die in der Lage sind, das Protein (d. h. das Rezeptor-Protein) zu denaturieren (beispielsweise ein Tensid oder Chemikalien, die den pH-Wert des Assay-Puffers verändern können), können nicht bzw. nur in Konzentrationen geprüft werden, bei denen diese Wechselwirkungen nicht auftreten. Ansonsten beschränkt sich der Konzentrationsbereich, der mit diesen Assays geprüft werden kann, auf die Löslichkeit der betreffenden Prüfchemikalie im Assay-Puffer.
13. Tabelle 1 enthält eine Übersicht über die Ergebnisse der 24 Stoffe, die mit den beiden in dieser Prüfmethode beschriebenen vollständig validierten Assays untersucht wurden. Von diesen Stoffen wurden nach veröffentlichten Berichten (u. a. aufgrund von *In-vitro*-Assays zur Prüfung auf transkriptionelle ER-Aktivierung und/oder aufgrund des Uterotrophen Bioassays) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) 17 Stoffe als ER-Binder eingestuft; 6 Stoffe wurden als Nicht-Binder eingestuft. Nach den in Tabelle 1 zusammengefassten Daten ergab sich hinsichtlich der Einstufungen aller Stoffe bis zu 10^{-4} M beim Antagonisten-Assay eine nahezu 100 %ige Übereinstimmung zwischen den beiden Assays, und alle Stoffe wurden zutreffend als ER-Binder bzw. als Nicht-Binder eingestuft. Ergänzende Informationen über diese Gruppe von Stoffen sowie über weitere Stoffe, die im Rahmen der Validierungsstudien mit den ER-Bindungsassays untersucht wurden, sind den Leistungsstandards für den hrER-Bindungsassay (3), Anlage 2 (Tabellen 1, 2 und 3), zu entnehmen.

Tabelle 1

Einstufung von Stoffen als ER-Binder oder -Nicht-Binder nach der erwarteten Reaktion bei Prüfung mit dem FW- und dem CERi-hrER-Bindungsassay

	Bezeichnung des Stoffs	CAS-Nr.	Erwartete Reaktion	FW-Assay		CERi-Assay		MeSH-Chemikalie Klasse	Produktklasse
				Konzentrationsbereich (M)	Einstufung	Konzentrationsbereich (M)	Einstufung		
1	17 β -Estradiol	50-28-2	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Binder	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
2	Norethynodrel	68-23-5	<i>Binder</i>	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Binder	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Binder	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
3	Norethindron	68-22-4	<i>Binder</i>	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Binder	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-4}$	Binder	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
4	Di- <i>n</i> -butylphthalat	84-74-2	<i>Nicht-Binder (*)</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nicht-Binder (**) (†)	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nicht-Binder (**) (†)	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Ester	Weichmacher, chemisches Zwischenprodukt
5	DES	56-53-1	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
6	17 α -Ethinylestradiol	57-63-6	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
7	meso-Hexestrol	84-16-2	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
8	Genistein	446-72-0	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Kohlenwasserstoff (heterocyclisch), Flavonoid	Naturprodukt
9	Equol	531-95-3	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Phytoestrogen-Metabolit	Naturprodukt
10	Butylparaben (<i>n</i> -Butyl-4-hydroxybenzoat)	94-26-8	<i>Binder</i>	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Paraben	Konservierungsmittel

	Bezeichnung des Stoffs	CAS-Nr.	Erwartete Reaktion	FW-Assay		CERI-Assay		MeSH-Chemikalie Klasse	Produktklasse
				Konzentrationsbereich (M)	Einstufung	Konzentrationsbereich (M)	Einstufung		
11	Nonylphenol (Gemisch)	84852-15-3	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Alkylphenol	Zwischenproduktverbindung
12	<i>o,p'</i> -DDT	789-02-6	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	chlororganisches	Insektizid
13	Corticosteron	50-22-6	Nicht-Binder (*)	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nicht-Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nicht-Binder	Steroid	Naturprodukt
14	Zearalenon	17924-92-4	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Kohlenwasserstoff (heterocyclisch), Lacton	Naturprodukt
15	Tamoxifen	10540-29-1	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
16	5 α -Dihydrotestosteron	521-18-6	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Steroid, nicht phenolisch	Naturprodukt
17	Bisphenol A	80-05-7	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Phenol	Chemisches Zwischenprodukt
18	4- <i>n</i> -Heptylphenol	1987-50-4	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Nicht eindeutig (a)	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Alkylphenol	Zwischendrehzahl
19	Kepon (Chlordecon)	143-50-0	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Kohlenwasserstoff (halogeniert)	Pestizid
20	Benz(a)anthracen	56-55-3	Nicht-Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Nicht-Binder (b)	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Nicht-Binder (b)	Aromatischer Kohlenwasserstoff	Zwischenprodukt
21	Enterolacton	78473-71-9	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Binder	Phytoestrogen	Naturprodukt
22	Progesteron	57-83-0	Nicht-Binder (*)	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nicht-Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nicht-Binder	Steroid	Naturprodukt

	Bezeichnung des Stoffs	CAS-Nr.	Erwartete Reaktion	FW-Assay		CERI-Assay		MeSH-Chemikalie Klasse	Produktklasse
				Konzentrationsbereich (M)	Einstufung	Konzentrationsbereich (M)	Einstufung		
23	Octyltriethoxysilan	2943-75-1	Nicht-Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Nicht-Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Nicht-Binder	Silan	Oberflächen-Modifiziermittel
24	Atrazin	1912-24-9	Nicht-Binder (*)	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nicht-Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Nicht-Binder	Heterocyclische Verbindung	Herbizid

(*) Löslichkeitsgrenze $< 1 \times 10^{-4}$ M.

(**) Die Verwendung und die Einstufung von Di-n-butylphthalat (DBP) als Nicht-Binder beruht auf der Prüfung von bis zu 10^{-4} M, da einige Labors bei den Prävalidierungsstudien bei 10^{-3} M keine Löslichkeit von DBP (z. B. eine Trübung) festgestellt hatten.

(¹) In der Validierungsstudie wurde Di-n-butylphthalat (DBP) als kodierter Prüfstoff bei Konzentrationen von bis zu 10^{-3} M untersucht. Unter diesen Bedingungen stellten einige Labors einen Rückgang der Radioliganden-Bindung bei der höchsten Konzentration (10^{-3} M) und/oder eine nicht eindeutige Kurvenanpassung fest. Bei diesen Prüfläufen wurde DBP in drei von fünf Labors mit dem CERI-Assay und von fünf von sechs Labors mit dem FW-Assay (siehe (2)), Abschnitte IV.B.3a,b und VI.A) als „nicht eindeutig“ oder als „Binder“ eingestuft.

(^a) Die Einstufung deckte sich nicht mit der erwarteten Einstufung. Die Einstufung von 4-n-Heptylphenol als „nicht eindeutig“ oder als „Nicht-Binder“ durch drei von fünf Labors führte zu einer durchschnittlichen Einstufung als nicht eindeutig. Eine nähere Untersuchung ergab, dass dies auf eine begrenzte chemische Löslichkeit zurückzuführen war, die die Ausprägung einer vollständigen Bindungskurve verhinderte.

(^b) In der Validierungsstudie wurde Benz(a)anthracen aufgrund der veröffentlichten Literatur, nach der die für diesen Stoff berichtete *In-vitro*-Östrogenaktivität(16) primär von seiner metabolischen Aktivierung abhängt, neu eingestuft (17) (18). Die enzymatische metabolische Aktivierung des Stoffs wurde mit den in dieser vergleichenden Validierungsstudie durchgeführten zellfreien hrER-Bindungsassays nicht vorhergesagt. Unter den Versuchsbedingungen des FW- und des CERI-Assays ist der Stoff also tatsächlich als Nicht-Binder einzustufen.

ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS

Wesentliche Elemente des Assays

14. Diese Prüfmethode gilt für Assays mit einem ER-Rezeptor und einem ausreichend starken Liganden für diesen Rezeptor, der als Marker/Tracer für den Assay verwendet und durch zunehmende Konzentrationen einer Prüfchemikalie verdrängt werden kann. Die Bindungsassays beinhalten die beiden folgenden wesentlichen Elemente: 1) einen Versuch zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und 2) einen Versuch zur Ermittlung konkurrierender Bindungen. Mit dem Assay zur Ermittlung von Sättigungsbindungen werden die Spezifität und die Aktivität der Rezeptorzubereitungen bestätigt. Mit der Untersuchung zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird die Fähigkeit einer Prüfchemikalie zur Bindung an den hrER beurteilt.

Kontrollen

15. Die Grundlage der vorgeschlagenen gleichzeitig geprüften Referenzöstrogens und der Kontrollen sollte erläutert werden. Gegebenenfalls dienen gleichzeitige Kontrollen (Lösungsmittel- (Vehikel-), Positiv- (ER-Binder; starke und geringe Affinität) und Negativkontrollen (Nicht-Binder)) als Nachweis 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). Bei jedem Prüflauf sollten auf jeweils einer Platte vollständige Konzentrationskurven des Referenzöstrogens und der Kontrollen (d. h. schwache Binder und Nicht-Binder) verwendet werden. Alle anderen Platten sollten Folgendes enthalten: 1) eine hohe (etwa vollständige Verdrängung des radioaktiv markierten Liganden) und eine mittlere Konzentration (etwa IC_{50}) sowohl von E2 als auch des schwachen Binders, jeweils dreifach, und 2) eine Lösungsmittelkontrolle und einen nicht spezifischen Binder, ebenfalls jeweils dreifach.

Standard-Qualitätskontrollverfahren

16. Standard-Qualitätskontrollverfahren sollten wie für den jeweiligen Assay beschrieben durchgeführt werden, um gewährleisten zu können, dass aktive Rezeptoren, die korrekten Chemikalienkonzentrationen und auch über mehrere Wiederholungen stabile Toleranzgrenzen verwendet werden und sichergestellt ist, dass die erwarteten ER-Bindungsreaktionen im Zeitverlauf festgestellt werden können.

Nachweis der Eignung des Labors

17. 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. Dazu sind Sättigungsprüfungen zur Bestätigung der Spezifität und der Aktivität der ER-Zubereitung sowie Assays zur Ermittlung konkurrierender Bindungen mit dem Referenzörogen und den Kontrollen (schwacher Binder und Nicht-Binder) durchzuführen. Das Labor sollte eine historische Datenbank mit Ergebnissen des Referenzöstrogens und der Kontrollen aufgrund von 3-5 unabhängigen Versuchen an unterschiedlichen Tagen erstellen. Die betreffenden Versuche bilden die Grundlage für das Referenzörogen und die historischen Kontrollen des Labors und werden zur partiellen Beurteilung der Akzeptierbarkeit des Assays bei künftigen Prüfläufen berücksichtigt.
18. Die Reaktionsfähigkeit des Prüfsystems wird auch durch eine Prüfung der in Tabelle 2 genannten Leistungsstoffe bestätigt. Die Liste der Leistungsstoffe ist eine Untergruppe der Referenzstoffe der Leistungsstandards für die ER-Bindungsassays (3). Diese Stoffe sind im Handel erhältlich und entsprechen den Chemikalienklassen, bei denen gewöhnlich eine ER-Bindungsaktivität zu verzeichnen ist. Außerdem zeigen sie ein geeignetes Wirkungsspektrum (d. h. stark bis schwach) für ER-Binder und für Nicht-Binder (d. h. Negativstoffe). Bei allen Leistungsstoffen sollten die zu geprüften Konzentrationen den gesamten in Tabelle 2 genannten Bereich abdecken. Für jeden Stoff sollten mindestens drei Versuche durchgeführt werden, und die Ergebnisse sollten mit der erwarteten chemischen Aktivität in Einklang stehen. Jeder Versuch sollte unabhängig (d. h. mit frischen Verdünnungen des Rezeptors, der Chemikalien und des Reagens) und mit drei Wiederholungen pro Konzentration durchgeführt 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 durchgeführt werden.

Tabelle 2

Liste der Kontroll- und der Leistungsstoffe für die Assays zur Prüfung auf konkurrierende hrER-Bindungen ⁽¹⁾

Nr.	Bezeichnung des Stoffs	CAS-Nr. ⁽²⁾	Erwartete Reaktion ⁽³⁾ ⁽⁴⁾	Prüfkonzentrationsbereich (M)	MeSH-Chemikalienklasse ⁽⁵⁾	Produktklasse ⁽⁶⁾
Kontrollen (Referenzöstrogen, schwacher Binder, Nicht-Binder)						
1	17-Εστραδιολ	50-28-2	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
2	Norethynodrel (oder) Norethindron	68-23-5 (oder) 68-22-4	Binder	$3 \times 10^{-9} - 30 \times 10^{-6}$	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
3	Octyltriethoxysilan	2943-75-1	Nicht-Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Silan	Oberflächen-Modifiziermittel
Leistungsstoffe ⁽⁶⁾						
4	Diethylstilbestrol	56-53-1	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
5	17α-Ethinylestradiol	57-63-6	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Steroid	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
6	meso-Hexestrol	84-16-2	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Phenol	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
7	Tamoxifen	10540-29-1	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Kohlenwasserstoff (cyclisch)	Pharmazeutisches Erzeugnis, veterinärmedizinisches Agens
8	Genistein	446-72-0	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Heterocyclische Verbindung, Flavonoid	Naturprodukt

Nr.	Bezeichnung des Stoffs	CAS-Nr. (2)	Erwartete Reaktion (3) (4)	Prüfkonzentrationsbereich (M)	MeSH-Chemikalienklasse (5)	Produktklasse (6)
9	Bisphenol A	80-05-7	Binder	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$	Phenol	Chemisches Zwischenprodukt
10	Zearalenon	17924-92-4	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Heterocyclische Verbindung, Lacton	Naturprodukt
11	Butylparaben	94-26-8	Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$	Carboxylsäure, Phenol	Konservierungsmittel
12	Atrazin	1912-24-9	Nicht-Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$	Heterocyclische Verbindung	Herbizid
13	Di-n-butylphthalat (DBP) (7)	84-74-2	Nicht-Binder (8)	$1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$	Kohlenwasserstoff (cyclisch), Ester	Weichmacher, chemisches Zwischenprodukt
14	Corticosteron	50-22-6	Nicht-Binder	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$	Steroid	Naturprodukt

(1) Wenn ein Leistungsstoff nicht mehr im Handel erhältlich ist, kann ein Stoff derselben ER-Bindungsklassifikation und mit vergleichbarer Wirksamkeit und Klassifizierung verwendet werden.

(2) Abkürzungen: CAS-Nr. = Registernummer des Chemical Abstracts Service.

(3) Einstufung als ER α -Binder bzw. -Nicht-Binder in der Validierungsstudie des CER1- und des FW-hrER-Bindungsassays (2).

(4) Die Einstufung der ER-Bindungsaktivität beruhte auf den ICCVAM Background Review Documents (BRD) zu Assays zur Prüfung der ER-Bindung und zu TA-Assays (9) sowie auf empirischen Daten und anderen Informationen aus veröffentlichten und geprüften Untersuchungen (10) (11) (12) (13) (14) (15).

(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) DBP kann als alternative Nicht-Binder-Kontrolle mit einer Konzentration von maximal 10^{-4} M geprüft werden.

(8) Die Löslichkeitsgrenze liegt bei diesem Stoff bei 10^{-4} M. Die Verwendung und die Einstufung von Di-n-butylphthalat (DBP) als Nicht-Binder beruht auf der Prüfung von bis zu 10^{-4} M, da einige Labors bei den Prävalidierungsstudien bei 10^{-3} M keine Löslichkeit von DBP (z. B. eine Trübung) festgestellt hatten.

Löslichkeitsprüfungen und Dosisfindungsversuche für die Prüfchemikalien

19. In einem Vorversuch sollten die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien ermittelt und der jeweils geeignete Konzentrationsbereich für die Prüfung bestimmt werden. Die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien wird zunächst im Lösungsmittel bestimmt und anschließend unter den Bedingungen des Assays bestätigt. Die im Assay geprüfte Endkonzentration sollte höchstens bei 1 mM liegen. Für die Dosisfindungsprüfung werden eine Lösungsmittelkontrolle sowie acht logarithmische serielle Verdünnungen ausgehend von der maximal akzeptierbaren Konzentration (z. B. 1 mM oder weniger, je nach Löslichkeitsgrenze) verwendet. Das Auftreten einer Trübung oder die Bildung eines Niederschlags werden protokolliert. Die Konzentrationen beim zweiten und beim dritten Versuch sollten ggf. angepasst werden, um die Konzentrations-Reaktionskurve besser zu beschreiben.

Akzeptanzkriterien für Prüfläufe

20. Ob ein Prüflauf akzeptiert wird, hängt von der Bewertung der Ergebnisse mit dem jeweils verwendeten Referenzöstrogen und den Kontrollen ab. Zunächst sollten für Platte 1 die vollständigen Konzentrationskurven der Referenzkontrollen jedes einzelnen Versuchs mit den Werten der Leistungsmessungen bei den Parametern für die Kurvenanpassung (z. B. IC_{50} und Hillslope) übereinstimmen; der Vergleich erfolgt anhand der für die Protokolle des CERI- und des FW-Assays angegebenen Werte (Anlagen 2 und 3) und der historischen Kontrolldaten des Labors, das die Prüfungen durchführt. Bei allen Versuchen sollten alle Kontrollen (Referenzöstrogen, schwacher Binder und Nicht-Binder) korrekt eingestuft werden. Anschließend sind die Kontrollen auf allen folgenden Platten auf Übereinstimmung mit Platte 1 zu prüfen. Um den Höchstwert der Kurve der konkurrierenden Bindungen eindeutig zu ermitteln, sollte ein ausreichendes Spektrum an Konzentrationen der Prüfchemikalie berücksichtigt werden. Die Variabilität zwischen Wiederholungen bei den einzelnen Konzentrationen der Prüfchemikalie sowie zwischen den drei unabhängigen Prüfläufen sollte angemessen und wissenschaftlich vertretbar sein. Die Fähigkeit zur konsistenten Durchführung der Assays sollte durch den Aufbau und die Pflege einer historischen Datenbank für das Referenzöstrogen und die Kontrollen nachgewiesen werden. Standardabweichungen (SD) oder Variationskoeffizienten (VK) der Mittelwerte von Parametern zur Anpassung der Kurven für das Referenzöstrogen und die Kontrolle mit dem schwachen Binder aus mehreren Versuchen können als Maßstab für die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Labors herangezogen werden. Die Ergebnisse der Kontrollen auf den Platten der einzelnen Prüfläufe sowie die Ergebnisse für die einzelnen Prüfchemikalien sind einer qualifizierten fachlichen Beurteilung zu unterziehen.

Darüber hinaus sollten für Akzeptanzkriterien die folgenden Grundsätze gelten:

- Die Daten sollten für eine quantitative Bewertung der ER-Bindung ausreichen.
- Die geprüften Konzentrationen sollten im Löslichkeitsbereich der Prüfchemikalien bleiben.

Analyse der Daten

21. Das beschriebene Verfahren zur Analyse der Daten zur Sättigung und zu konkurrierenden Bindungen sollte unter Berücksichtigung der wesentlichen Grundsätze der Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren und Liganden durchgeführt werden. In der Regel werden Daten zur Sättigungsbindung mit einem nicht linearen Regressionsmodell analysiert, das die Bindungswirkung insgesamt ebenso wie nicht spezifische Bindungen berücksichtigt. Bei der Bestimmung von B_{max} und K_d ist möglicherweise eine Korrektur für den Abbau von Liganden (z. B. Swillens, 1995 (19)) vorzunehmen. Daten aus Untersuchungen zur Ermittlung konkurrierender Bindungen werden gewöhnlich umgewandelt (z. B. spezifische Bindung in Prozent und Konzentration der Prüfchemikalie ($\log M$)). Mit einer geeigneten Software zur nicht linearen Kurvenanpassung sollten die Schätzwerte für $\log(IC_{50})$ für die einzelnen Prüfchemikalien zur Verwendung in einer Hill-Gleichung mit vier Parametern ermittelt werden. Nach einer ersten Analyse sollten die Parameter zur Kurvenanpassung geprüft werden; außerdem sollte geprüft werden, in welchem Umfang die Bindungsdaten mit der erzeugten Kurve der konkurrierenden Bindungen übereinstimmen. Manchmal müssen weitere Analysen vorgenommen werden, um die optimale Kurvenanpassung zu ermitteln (z. B. indem Höchst- und/oder Mindestwerte für die Kurve festgelegt werden oder die 10%-Regel angewendet wird (siehe Anlage 4 und (2) (Abschnitt III.A.2)).
22. Die Erfüllung der Akzeptanzkriterien (Nummer 20) deutet darauf hin, dass ein Assaysystem ordnungsgemäß funktioniert. Dies gewährleistet jedoch nicht, dass eine bestimmte Prüfung tatsächlich exakte Daten ergibt. Die Wiederholung der korrekten Ergebnisse der ersten Prüfung ist die beste Bestätigung dafür, dass exakte Daten ermittelt wurden.

Allgemeine Kriterien für die Auswertung von Daten

23. Zurzeit besteht keine allgemein anerkannte Methode zur Auswertung der Daten aus ER-Bindungsassays. Allerdings sollten qualitative (z. B. Binder/Nicht-Binder) und/oder quantitative (IC_{50} , relative Bindungsaffinität (RBA) usw.) Bewertungen einer durch hrER vermittelten Aktivität auf empirischen Daten und fundierten wissenschaftlichen Beurteilungen beruhen.

Prüfbericht

24. Der Prüfbericht sollte folgende Angaben enthalten:

Assay

- durchgeführter Assay.

Kontrolle/Referenz/Prüfchemikalie

- Herkunft, Partienummer, ggf. begrenztes Verwendungsdatum;
- Stabilität der Prüfchemikalie, falls bekannt;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfchemikalie in Lösungsmittel, falls bekannt;
- Messung des pH-Werts, der Osmolalität und ggf. des Niederschlags 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 Charakterisierung durch die chemische Zusammensetzung (siehe oben), das quantitative Vorkommen und die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Elemente.

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.

Rezeptoren

- Herkunft der Rezeptoren (Hersteller, Bestellnummer, Charge, Art des Rezeptors, vom Hersteller gelieferte aktive Rezeptorkonzentration, Zertifizierung des Herstellers);

- Beschreibung der Rezeptoren (einschl. ermittelte Sättigungsbindungen): K_d , B_{max} ;
- Lagerung der Rezeptoren;
- radioaktiv markierter Ligand;
- Hersteller, Bestellnummer, Charge, spezifische Aktivität.

Prüfbedingungen

- Einschränkungen hinsichtlich der Löslichkeit unter Assay-Bedingungen;
- Zusammensetzung des Bindungspuffers;
- Konzentration des Rezeptors;
- Konzentration des Tracers (d. h. des radioaktiv markierten Liganden);
- Konzentrationen der Prüfchemikalie;
- Prozentanteil des Vehikels im endgültigen Assay;
- Inkubationstemperatur und -dauer;
- Methode zur Trennung von gebundenen/nicht gebundenen Chemikalien;
- positive und negative Kontrollen/Referenzstandards;
- Kriterien zur Einstufung der Prüfungen als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Akzeptanzprüfung

- tatsächliche IC_{50} - und Hillslope-Werte für gleichzeitige Positivkontrollen/Referenzstoffe.

Ergebnisse

- Rohdaten und Daten zu gebundenen/nicht gebundenen Chemikalien;
- ggf. Bestätigung durch Prüfung der Denaturierung;
- wenn vorhanden, niedrigste Wirkungskonzentration (LEC);
- RBA- und/oder IC_{50} -Werte;
- nach Möglichkeit Dosis-Reaktions-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

— Anwendung der 10%-Regel.

*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). Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (3) OECD (2015). Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrER α), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organisation für Wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (4) 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.
- (5) Cavailles, V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, *Climacteric*, 5 Suppl 2: S. 20-26.
- (6) 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.
- (7) Younes, M., und Honma, N. (2011). Estrogen Receptor Beta, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 135(1): S. 63-66.
- (8) Diamanti-Kandarakis u. a. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, *Endo Rev* 30(4):293-342.
- (9) ICCVAM (2002). Background Review Document: Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- (10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.
- (12) Akahori, Y., u. a. (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225-231.

- (13) OECD (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (14) Takeyoshi, M. (2006). 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, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. S. 1-188.
- (15) Yamasaki, K.; Noda, S.; Imatanaka, N.; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, *Toxicol. Letters*, 146: 111-120.
- (16) Kummer, V.; Maskova, J.; Zraly, Z.; Neca, J.; Simeckova, P.; Vondracek, J.; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol. Letters*, 180: 213-221.
- (17) Gozgit, J.M.; Nestor, K.M.; Fasco, M.J.; Pentecost, B.T.; Arcaro, K.F. Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 196: 58-67.
- (18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. *Chemosphere*, 34: 835-848.
- (19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, *Mol Pharmacol* 47(6):1197-1203.

Anlage 1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN UND ABKÜRZUNGEN

10%-Regel: Bei den Analysen Möglichkeit des Ausschlusses von Datenpunkten, wenn bei Wiederholungen der Mittelwert der prozentualen spezifischen [³H]-17β-Estradiol-Bindung mindestens 10 % über dem beobachteten Mittelwert bei einer geringeren Konzentration liegt (siehe Anlage 4).

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

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

Chemikalie: Ein Stoff oder ein Gemisch.

E2: 17β-Estradiol

ED: Endokrine Störung.

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

ER: Östrogenrezeptor.

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).

hERα: Humaner Östrogenrezeptor α.

IC50: 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 Labors, 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 Labors 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 einer validierten Prüfmethode 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).

Leistungstoffe: Eine Untergruppe der in die Leistungsstandards einbezogenen Referenzstoffe, die von Labors bei standardisierten Assays 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.

Östrogenaktivität: Die Fähigkeit einer Chemikalie, die Bindung von Östrogenrezeptoren durch 17 β -Estradiol nachzubilden. Mit dieser Prüfmethode kann die Bindung an den hER α festgestellt werden.

PBTG: Leistungsbezogene Prüfrichtlinie.

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

RBA: Relative Bindungsaffinität. Die RBA eines Stoffs wird als Prozentanteil von log (IC₅₀) des Stoffs im Vergleich zu log (IC₅₀) bei 17 β -Estradiol berechnet.

Referenzöstrogen: 17 β -Estradiol (E2, CAS 50-28-2).

Referenzprüfmethode: Die Assays, auf denen die PBTG 493 beruht.

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).

SD: Standardabweichung,

Validierte Prüfmethode: Eine Prüfmethode, für die zwecks Bestimmung ihrer Relevanz (einschließlich Genauigkeit) und Zuverlässigkeit für einen bestimmten Zweck Validierungsstudien abgeschlossen wurden. Es wird darauf hingewiesen, dass eine validierte Prüfmethode möglicherweise nicht genau und zuverlässig genug ist, um für den vorgeschlagenen Zweck akzeptiert zu werden (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: Variationskoeffizient.

Zuverlässigkeit: Maß der Reproduzierbarkeit einer Prüfmethode innerhalb von und zwischen Laboratorien über einen längeren Zeitraum und bei einheitlichem Protokoll. Sie wird durch Berechnung der Intra- und Inter-Labor-Reproduzierbarkeit bewertet (13).

Anlage 2

DER FREYBERGER-WILSON-IN-VITRO-ÖSTROGENREZEPTOR-(ERA-)BINDUNGSASSAY MIT IN VOLLER LÄNGE REKOMBINANTEM ERA ZUR ERMITTLUNG VON SÄTTIGUNGSBINDUNGEN UND KONKURRIERENDEN BINDUNGEN

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

1. Bei diesem *In-vitro*-Östrogenrezeptor-(ERa)-Bindungsassay zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen wird der in voller Länge rekombinante humane ERa(hrERa) verwendet. Dieser Östrogenrezeptor wird in mit einem Baculovirus infizierten Insektenzellen erzeugt und aus diesen Zellen isoliert. Das von Freyberger und Wilson entwickelte Protokoll wurde einer internationalen Validierungsstudie durch mehrere Labors unterzogen (2). Dabei wurden die Relevanz und die Zuverlässigkeit des Protokolls für den vorgesehenen Zweck des Assays nachgewiesen.
2. Der Assay besteht in einem Prüfverfahren zur Ermittlung von Stoffen, die eine Bindung mit dem hrERa über die volle Länge eingehen können. Mit dem Assay kann untersucht werden, ob eine Prüfchemikalie mit 17 β -Estradiol um Bindungen an den hrERa konkurrieren kann. Als quantitative Ergebnisse können mit dem Assay u. a. die Werte für IC₅₀ (als Maßstab für die zur Verdrängung der Hälfte des [³H]-17 β -Estradiols vom hrERa durch eine Prüfchemikalie erforderliche Konzentration) und die relative Affinität von Prüfchemikalien für Bindungen an den hrERa im Vergleich zu 17 β -Estradiol ermittelt werden. Mit Blick auf die Verwendung zur Prüfung von Chemikalien kann ein akzeptables qualitatives Ergebnis des Assays auch darin bestehen, dass Prüfchemikalien nach ihrer Bindung an den hrERa und nach den genannten Kriterien für die Bindungskurven als Binder, Nicht-Binder oder nicht eindeutig eingestuft werden.
3. Da bei diesem Assay ein radioaktiver Ligand verwendet wird, benötigen die Labors eine Genehmigung für die Verwendung von radioaktivem Material. Bei allen Verfahren unter Verwendung von Radioisotopen und von gefährlichen Chemikalien sind die nach den nationalen Rechtsvorschriften geltenden Bestimmungen und die dort vorgesehenen Verfahren einzuhalten.
4. Vor der Verwendung dieses Assays für rechtliche Zwecke sollten die Abschnitte „**ALLGEMEINE EINLEITUNG**“ und „**ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS**“ gelesen werden. Die in dieser Prüfrichtlinie verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

PRINZIPIEN DES ASSAYS (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

5. Mit dem hrERa-Bindungsassay wird die Fähigkeit eines radioaktiv markierten Liganden ([³H]-17 β -Estradiol) gemessen, bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie (z. B. eines Bindungskonkurrenten) eine Bindung mit dem ER einzugehen. Prüfchemikalien mit einer starken ER-Affinität konkurrieren mit dem radioaktiv markierten Liganden bei einer niedrigen Konzentration als Chemikalien mit einer geringeren Affinität für diesen Rezeptor.
6. Dieser Assay beinhaltet zwei wesentliche Elemente: einen Versuch zur Ermittlung von Sättigungsbindungen zur Charakterisierung der Parameter der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand und einen anschließenden Versuch zur Ermittlung konkurrierender Bindungen, mit dem die Konkurrenz zwischen einer Prüfchemikalie und einem radioaktiv markierten Liganden im Hinblick auf die Bindung an den ER beschrieben wird.
7. Zur Vorbereitung der Prüfung konkurrierender Bindungen soll anhand einer Ermittlung der Sättigungsbindung eine bestimmte Rezeptorcharge hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität geprüft und quantitativ bewertet werden. Mit der Prüfung konkurrierender Bindungen werden unter Gleichgewichtsbedingungen die Affinität einer bestimmten Konzentration des Östrogenrezeptors für seinen natürlichen Liganden (ausgedrückt durch die Dissoziationskonstante K_d) und die Konzentration der aktiven Rezeptor-Bindungsstellen (B_{max}) gemessen.
8. Mit der Prüfung konkurrierender Bindungen wird die Affinität eines Stoffs für Bindungen an den ER im Hinblick auf die Konkurrenz mit [³H]-17 β -Estradiol bewertet. Die Affinität wird anhand der Konzentration der Prüfchemikalie quantifiziert, die unter Gleichgewichtsbedingungen 50 % der spezifischen Bindung von [³H]-17 β -Estradiol hemmt („Hemmkonzentration 50 %“ oder IC₅₀). Diese Affinität kann auch anhand der relativen Bindungsaffinität (RBA, bezogen auf IC₅₀ Estradiol, im selben Prüflauf getrennt gemessen) beurteilt werden. Bei der Prüfung konkurrierender Bindungen wird die Bindung von [³H]-17 β -Estradiol in einer bestimmten Konzentration an zahlreiche (acht Größenordnungen) Konzentrationen einer Prüfchemikalie gemessen. Die ermittelten Daten werden dann möglichst entsprechend der Hill-Gleichung (Hill, 1910) angepasst, die die Verdrängung des Radioliganden durch einen für eine bestimmte Bindungsstelle spezifischen konkurrierenden Binder beschreibt. Anhand des Umfangs der Verdrängung des radioaktiv markierten Estradiols bei Gleichgewichtsbedingungen wird die Prüfchemikalie als Binder, Nicht-Binder oder nicht eindeutig eingestuft.

PRÜFVERFAHREN

Nachweis einer akzeptablen Leistungsfähigkeit bei Untersuchungen des hrER α -Proteins

9. Vor der regelmäßigen Durchführung der Assays zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen ist jeweils mit einer neuen Charge des hrER α nachzuweisen, dass in dem Labor, in dem der Rezeptor verwendet wird, korrekte Ergebnisse ermittelt werden. Die Leistungsfähigkeit sollte in zwei Schritten nachgewiesen werden:
- Durchführung des [3 H]-17 β -Estradiol-Bindungsassays zum Nachweis der Spezifität und der Sättigung für den hrER α ; anhand einer nicht linearen Regressionsanalyse der ermittelten Daten (z. B. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) und des anschließenden Scatchard-Diagramms sollten die Bindungsaffinität des [3 H]-17 β -Estradiols (K_d) für den hrER α und die Anzahl der Rezeptoren (B_{max}) der einzelnen hrER α -Chargen dokumentiert werden;
 - Durchführung eines Assays zur Prüfung konkurrierender Bindungen mit Kontrollstoffen (Referenzörogen (17 β -Estradiol)), einem schwachen Binder (z. B. Norethynodrel oder Norethindron) und einem Nicht-Binder (Octyltriethoxysilan, OTES). Jedes Labor sollte eine historische Datenbank zum Nachweis der Konsistenz der IC $_{50}$ -Werte und sonstiger relevanter Werte zwischen den einzelnen Versuchen sowie zwischen den einzelnen hrER α -Chargen bei Versuchen mit dem Referenzörogen und einem schwachen Binder aufbauen. Die Parameter der Kurven der konkurrierenden Bindungen bei den Kontrollstoffen sollten innerhalb des 95%-Konfidenzintervalls liegen (siehe Tabelle 1), das anhand von Daten von an der Validierungsstudie zu diesem Assay beteiligten Labors festgelegt wurde (2).

Tabelle 1

Leistungskriterien für das Referenzörogen und den schwachen Binder, FW-hrER-Bindungsassay

Stoff	Parameter	Mittelwert ^(a)	Standardabweichung (n)	95%-Konfidenzintervalle ^(b)	
				Untere Grenze	Obere Grenze
17 β -Estradiol	Höchstwert (%)	100,44	10,84 (67)	97,8	103,1
	Mindestwert (%)	0,29	1,25 (67)	-0,01	0,60
	Hillslope	-1,06	0,20 (67)	-1,11	-1,02
	Log IC $_{50}$ (M)	-8,92 ^(b)	0,18 (67)	-8,97	-8,88
Norethynodrel	Höchstwert (%)	99,42	8,90 (68)	97,27	101,60
	Mindestwert (%)	2,02	3,42 (68)	1,19	2,84
	Hillslope	-1,01	0,38 (68)	-1,10	-0,92
	IC $_{50}$ (M)	-6,39	0,27 (68)	-6,46	-6,33
Norethindron ^(b)	Höchstwert (%)	96,14	8,44 (27)	92,80	99,48
	Mindestwert (%)	2,38	5,02 (27)	0,40	4,37
	Hillslope	-1,41	0,32 (27)	-1,53	-1,28
	Log IC $_{50}$ (M)	-5,73	0,27 (27)	-5,84	-5,62

^(a) Der Mittelwert (n) \pm Standardabweichung (SD) wurde anhand der Parameterschätzungen für die Kurvenanpassung (Hill-Gleichung mit 4 Parametern) für Prüfläufe in vier Labors im Rahmen der Validierungsstudie berechnet (siehe (2), Anlage N).

^(b) Die 95%-Konfidenzintervalle dienen zur Orientierung für die Akzeptanzkriterien.

^(b) In der Validierung war die Prüfung von Norethindron optional für Unteraufgabe 4 vorgesehen (siehe (2), siehe Unteraufgabe 4). Die Mittelwerte \pm SD (n) wurden also anhand der Schätzungen für die Kurvenanpassung (Hill-Gleichung mit 4 Parametern) für in zwei Labors durchgeführte Kontrollprüfungen berechnet.

Der Bereich für IC $_{50}$ hängt von der K_d der Rezeptorzubereitung und von der Konzentration des radioaktiv markierten Liganden in den einzelnen Labors ab. Eine geeignete Anpassung des Bereichs für IC $_{50}$ je nach den Bedingungen bei der Durchführung des Assays ist akzeptabel.

Nachweis der Eignung des Labors

10. Siehe Nummern 17 und 18 sowie Tabelle 2 im Abschnitt „ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS“ für diese Prüfmethode. Die Assays (zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen) sollten jeweils drei unabhängige Prüfläufe (d. h. mit frischen Rezeptor-, Chemikalien- und Reagenzienverdünnungen) an unterschiedlichen Tagen jeweils mit drei Wiederholungen umfassen.

Ermittlung der Rezeptorkonzentration (hrER₀)

11. Die Konzentration des aktiven Rezeptors ist je nach Charge und Lagerungsbedingungen leicht unterschiedlich. Daher sollte die Konzentration des vom Hersteller gelieferten aktiven Rezeptors bestimmt werden. Daraus ergibt sich die geeignete Konzentration des aktiven Rezeptors beim Prüflauf.
12. Unter den Bedingungen bei der konkurrierenden Bindung (d. h. 1 nM [³H]-Estradiol) werden Nennkonzentrationen von 0,25, 0,5, 0,75 und 1 nM Rezeptor einmal ohne (Gesamtbindung) und einmal mit (nicht spezifische Bindung) 1 µM nicht markiertem Estradiol inkubiert. Die spezifische Bindung wird berechnet als Differenz zwischen der Gesamtbindung und der nicht spezifischen Bindung bezogen auf die Rezeptor-Nennkonzentration in einem Diagramm dargestellt. Die Rezeptorkonzentration, bei der sich spezifische Bindungswerte entsprechend einem Anteil von 20 % des zugesetzten radioaktiven Liganden ergeben, wird auf die entsprechende Rezeptor-Nennkonzentration bezogen; diese Rezeptorkonzentration ist bei den Versuchen zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen zu verwenden. Diese Anforderung wird häufig mit einer endgültigen hrER-Konzentration von 0,5 nM erfüllt.
13. Wenn das 20-%-Kriterium mehrfach nicht erfüllt werden kann, sollte der Versuchsaufbau auf mögliche Fehlerquellen geprüft werden. Dass das 20-%-Kriterium nicht erfüllt werden kann, deutet möglicherweise auch darauf hin, dass die rekombinante Charge den aktiven Rezeptor nur in einem sehr geringen Anteil enthält. In diesem Fall sollte die Verwendung einer anderen Rezeptor-Charge in Betracht gezogen werden.

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

14. Acht zunehmende [³H]-17β-Estradiol-Konzentrationen sollten jeweils dreifach unter den drei folgenden Bedingungen geprüft werden (siehe Tabelle 2):
 - ohne nicht markiertes 17β-Estradiol und mit dem ER, um anhand einer Messung der Radioaktivität der Wells, die ausschließlich [³H]-17β-Estradiol enthalten, die Gesamtbindung zu ermitteln;
 - bei einer 1 000-mal höheren Konzentration des nicht markierten 17β-Estradiols im Vergleich zum markierten 17β-Estradiol und zu Prüfungen mit dem ER; dadurch sollen die aktiven Bindungsstellen mit nicht markiertem 17β-Estradiol gesättigt werden, um anhand einer Messung der Radioaktivität in den Wells die nicht spezifische Bindung zu bestimmen. Verbleibendes warmes Estradiol, das Bindungen mit dem Rezeptor eingehen kann, wird als Bindung an eine nicht spezifischen Bindungsstelle betrachtet, da das kalte Estradiol in einer derart hohen Konzentration vorliegen sollte, dass es an allen verfügbaren spezifischen Bindungsstellen des Rezeptors gebunden ist;
 - ohne nicht markiertes 17β-Estradiol und ohne den ER (Ermittlung der Gesamt-Radioaktivität).

Zubereitung der Lösungen mit [³H]-17β-Estradiol und mit nicht markiertem 17β-Estradiol

15. Unter Zugabe eines Assay-Puffers zu einer 12-nM-Vorratslösung [³H]-17β-Estradiol wird [³H]-17β-Estradiol auf Konzentrationen von anfänglich 0,12 nM bis 12 nM verdünnt. Durch Zugabe von 40 µl dieser Lösungen in die jeweiligen Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte (mit einem Endvolumen von 160 µl) werden die endgültigen Assay-Konzentrationen von 0,03-3,0 nM hergestellt. Die Zubereitung des Assay-Puffers, der [³H]-17β-Estradiol-Vorratslösung und der Verdünnungen sowie die Bestimmung der Konzentrationen werden im FW-Protokoll eingehend beschrieben (2).
16. Die Ethanol-17β-Estradiol-Lösungen sind unter Zugabe des Assay-Puffers so zu verdünnen, dass sich acht zunehmende Ausgangskonzentrationen von 0,06-6 µM ergeben. Durch Zugabe von 80 µl dieser Lösungen in die jeweiligen Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte (mit einem Endvolumen von 160 µl) werden die endgültigen Assay-Konzentrationen von 0,03-3,0 µM hergestellt. Die Endkonzentrationen des nicht markierten 17β-Estradiols in den einzelnen Assays zur Ermittlung der nicht spezifischen Bindung sollten das 1 000-Fache der markierten [³H]-17β-Estradiol-Konzentration betragen. Die Zubereitung der nicht markierten 17β-Estradiol-Lösungen wird eingehend im FW-Protokoll beschrieben (2).

17. Für die Versuche ist die Nennkonzentration des Rezeptors zu verwenden, bei der sich eine spezifische Bindung von $20 \pm 5 \%$ ergibt (Nummern 12 und 13). Die hrERa-Lösung ist unmittelbar vor Gebrauch zuzubereiten.
18. Die 96-Well-Mikrotiterplatten werden mit 3 Wiederholungen pro Konzentration vorbereitet, wie in Tabelle 2 dargestellt. Anlage 2.2 enthält ein Beispiel für die Anordnung der Konzentrationen und der Volumina von [^3H]-17 β -Estradiol, nicht markiertem 17 β -Estradiol, des Puffers und des Rezeptors.

Tabelle 2

Anordnung auf der Mikrotiterplatte beim Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [^3H] E2 + ER			0,06 nM [^3H] E2 + ER			0,08 nM [^3H] E2 + ER			0,10 nM [^3H] E2 + ER			Gesamtbindung (Lösungsmittel)
B	0,30 nM [^3H] E2 + ER			0,60 nM [^3H] E2 + ER			1,0 nM [^3H] E2 + ER			3,0 nM [^3H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [^3H] E2 + ER + 0,03 μM E2			0,06 nM [^3H] E2 + ER + 0,06 μM E2			0,08 nM [^3H] E2 + ER + 0,08 μM E2			0,10 nM [^3H] E2 + ER + 0,10 μM E2			Nicht spezifische Bindung
E	0,30 nM [^3H] E2 + ER + 0,30 μM E2			0,60 nM [^3H] E2 + ER + 0,60 μM E2			1,0 nM [^3H] E2 + ER + 1,0 μM E2			3,0 nM [^3H] E2 + ER + 3,0 μM E2			
F													
G													
H													

[^3H] E2: [^3H]-17 β -Estradiol

ER: = Östrogenrezeptor.

E2: nicht markiertes 17 β -Estradiol

19. Die für den Assay verwendeten Mikrotiterplatten werden 16-20 Stunden bei 2-8 °C auf einem Karussell inkubiert.

Messung des an den hrERa gebundenen [^3H]-17 β -Estradiols

20. Das an den hrERa gebundene [^3H]-17 β -Estradiol ist von dem nicht gebundenen [^3H]-17 β -Estradiol zu trennen. Dazu werden in jedes Well 80 μl kalte DCC-Suspension gegeben; anschließend werden die Mikrotiterplatten 10 Minuten geschüttelt und danach 10 Minuten mit etwa 2 500 rpm zentrifugiert. Um bei diesem Prozess eine Dissoziation des gebundenen [^3H]-17 β -Estradiols vom hrERa zu minimieren, ist von entscheidender Bedeutung, dass bei den Puffer- und den Assay-Wells eine Temperatur von 2-8 °C aufrechterhalten wird und dass alle Schritte rasch durchgeführt werden. Für eine effiziente und rasche Behandlung der Platten wird eine Schüttelvorrichtung für Mikrotiterplatten benötigt.
21. 50 μl des Überstands des an den hrERa gebundenen [^3H]-17 β -Estradiols sind anschließend mit äußerster Sorgfalt zu entnehmen, damit Verunreinigungen der Wells durch Berührung mit der DCC-Lösung verhindert werden. Der Überstand wird auf eine zweite Mikrotiterplatte gegeben.
22. Danach werden in jedes Well (A1-B12 und D1-E12) 200 μl einer Szintillationsflüssigkeit gegeben, die die kinetische Energie radioaktiver Emissionen in Lichtenergie umwandeln kann. Die Wells G1-H12 (= DPM gesamt) enthalten serielle Verdünnungen des [^3H]-17 β -Estradiols (40 μl), die unmittelbar in die Szintillationsflüssigkeit in den Wells der Messplatte zu geben sind, wie in Tabelle 3 angegeben (d. h. die Wells enthalten jeweils nur 200 μl Szintillationsflüssigkeit und [^3H]-17 β -Estradiol in der jeweiligen Verdünnung). Anhand der Zerfallereignisse pro Minute (DPM) wird so nachgewiesen, wie viel [^3H]-17 β -Estradiol jeweils in die Wells zur Ermittlung der Gesamtbindung und der nicht spezifischen Bindung gegeben wurde.

Tabelle 3

Anordnung auf der Mikrotiterplatte beim Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung, Messung der Radioaktivität

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,03 nM [³ H] E2 + ER			0,06 nM [³ H] E2 + ER			0,08 nM [³ H] E2 + ER			0,10 nM [³ H] E2 + ER			Gesamtbindung (Lösungsmittel)
B	0,30 nM [³ H] E2 + ER			0,60 nM [³ H] E2 + ER			1,0 nM [³ H] E2 + ER			3,0 nM [³ H] E2 + ER			
C													
D	0,03 nM [³ H] E2 + ER + 0,03 µM E2			0,06 nM [³ H] E2 + ER + 0,06 µM E2			0,08 nM [³ H] E2 + ER + 0,08 µM E2			0,10 nM [³ H] E2 + ER + 0,10 µM E2			Nicht spezifische Bindung
E	0,30 nM [³ H] E2 + ER + 0,30 µM E2			0,60 nM [³ H] E2 + ER + 0,60 µM E2			1,0 nM [³ H] E2 + ER + 1,0 µM E2			3,0 nM [³ H] E2 + ER + 3,0 µM E2			
F													
G	0,03 nM [³ H] E2 (DPM gesamt)			0,06 nM [³ H] E2			0,08 nM [³ H] E2			0,10 nM [³ H] E2			DPM gesamt (-*)
H	0,30 nM [³ H] E2			0,60 nM [³ H] E2			1,0 nM [³ H] E2			3,0 nM [³ H] E2			

[³H] E2: [³H]-17β-Estradiol

ER: Östrogenrezeptor.

E2: nicht markiertes 17β-Estradiol

DPM: Zerfallsereignisse pro Minute

(*) Die warmen seriellen Verdünnungen des markierten [³H]-Estradiols werden unmittelbar in die 200 µl Szintillationsflüssigkeit in den Wells G1-H12 gegeben.

23. Die Messungen werden mit einer Verzögerung von mindestens zwei Stunden durchgeführt; die Zählung sollte 40 Minuten pro Well andauern. Zur Bestimmung der DPM-Werte pro Well ist ein Mikrotiterplatten-Szintillationszähler mit Quersensitivitätskorrektur zu verwenden. Wenn kein Szintillationszähler für Mikrotiterplatten verfügbar ist, können die Proben auch mit einem sonstigen Zähler gemessen werden. In diesem Fall kann die Dauer der Zählung reduziert werden.

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

24. Mit dem Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird die Bindung von [³H]-17β-Estradiol einer einzelnen Konzentration bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie gemessen. Bei jedem Prüflauf sind für jede Konzentration drei gleichzeitige Replikate zu verwenden. Außerdem werden für jede zu prüfende Chemikalie drei nicht gleichzeitige Prüfläufe durchgeführt. Der Assay ist auf zwei oder mehr 96-Well-Mikrotiterplatten durchzuführen.

Kontrollen

25. Bei der Durchführung des Assays sind die Lösungsmittelkontrolle und die sonstigen Kontrollen (d. h. die Kontrollen mit dem Referenzöstrogen, dem schwachen Binder und dem Nicht-Binder) gleichzeitig zu prüfen. Bei jedem Prüflauf sollten auf jeweils einer Platte vollständige Konzentrationskurven des Referenzöstrogens und der Kontrollen (d. h. schwache Binder und Nicht-Binder) verwendet werden. Alle anderen Platten sollten Folgendes enthalten: (i) eine hohe Konzentration (maximale Verdrängung) und eine mittlere Konzentration (etwa IC₅₀) sowohl von E2 als auch des schwachen Binders jeweils dreifach, (ii) eine Lösungsmittelkontrolle und einen nicht spezifischen Binder, ebenfalls jeweils mindestens dreifach. Die Verfahren für die Zubereitung des Assay-Puffers, der Kontrollen, des [³H]-17β-Estradiols, des hrERA und der Prüfchemikalienlösungen werden in (2) (Anlage K, siehe Protokoll zum FW-Assay) beschrieben.

Lösungsmittelkontrolle

26. Die Lösungsmittelkontrolle bestätigt, dass das Lösungsmittel nicht mit dem Prüfsystem reagiert und die Gesamtbindung (TB) misst. Bevorzugtes Lösungsmittel ist Ethanol. Wenn die höchste Konzentration der Prüfchemikalie in Ethanol nicht löslich ist, kann alternativ DMSO verwendet werden. Die Ethanol- bzw. ggf. die DMSO-Konzentration in den endgültigen Assay-Wells sollte bei 1,5 % liegen und darf höchstens 2 % betragen.

Pufferkontrolle

27. Die Pufferkontrolle (PK) darf weder Lösungsmittel noch die Prüfchemikalie, jedoch alle sonstigen im Assay verwendeten Elemente enthalten. Die Ergebnisse der Pufferkontrolle werden mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen, um sicherzustellen, dass das verwendete Lösungsmittel das Assay-System nicht beeinträchtigt.

Starker Binder (Referenzöstrogen)

28. 17 β -Estradiol (CAS 50-28-2) bindet sich als endogener Ligand mit hoher Affinität an den ER Untertyp alpha. Für jeden hrER α -Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird eine Standardkurve mit nicht markiertem 17 β -Estradiol erstellt, damit die Variabilität bei Durchführung des Assays in einem Labor im Zeitverlauf beurteilt werden kann. Aus nicht markiertem 17 β -Estradiol werden acht Lösungen in Ethanol hergestellt. Das Spektrum der Konzentrationen in den Assay-Wells reicht von 100 nM – 10 pM (-7[log M] bis -11[log M]) mit den folgenden Einzelkonzentrationen: (-7[log M], -8[log M], -8,5[log M], -9[log M], -9,5[log M], -10[log M], -11[log M]). Die höchste Konzentration des nicht markierten 17 β -Estradiols (1 μ M) dient auch als nicht spezifischer Bindungsindikator. In Tabelle 4 wird diese Konzentration als „NSB“ bezeichnet, obwohl sie Teil der Standardkurve ist.

Schwacher Binder

29. Um die Empfindlichkeit der einzelnen Versuche nachzuweisen und um die Variabilität bei der Durchführung des Assays im Laufe der Zeit beurteilen zu können, sollte ein schwacher Binder (Norethynodrel (CAS68-23-5) oder Norethindron (CAS 68-22-4)) einbezogen werden. Aus dem schwachen Binder werden acht Lösungen in Ethanol hergestellt. Das Spektrum der Konzentrationen in den Assay-Wells reicht von 3 nM – 30 pM (-8,5[log M] bis -4,5[log M]) mit den folgenden Einzelkonzentrationen: -4,5[log M], -5[log M], -5,5[log M], -6[log M], -6,5[log M], -7[log M], -7,5[log M], -8,5[log M].

Nicht-Binder

30. Als Negativkontrolle (Nicht-Binder) wird Octyltriethoxysilan (OTES, CAS 2 943-75-1) verwendet. Die Negativkontrolle gewährleistet, dass mit dem Assay unter den gegebenen Bedingungen erkannt wird, wenn Prüfchemikalien sich nicht an den hrER α binden. Aus dem Nicht-Binder werden acht Lösungen in Ethanol hergestellt. Das Spektrum der Konzentrationen in den Assay-Wells reicht von 0,1 nM – 1 000 pM (-10[log M] bis -3[log M]) in logarithmischen Schritten. Als Nicht-Binder kann zur Kontrolle alternativ auch Di-*n*-butylphthalat (DBP) verwendet werden. Die maximale Löslichkeit wurde für -4[log M] ermittelt.

hrER α -Konzentration

31. Für die Versuche ist die Menge des Rezeptors zu verwenden, bei der sich eine spezifische Bindung von 20 ± 5 % bezogen auf 1 nM des Radioliganden ergibt (Nummern 12 und 13 in Anlage 2). Die hrER α -Lösung ist unmittelbar vor Gebrauch zuzubereiten.

[³H]-17 β -Estradiol

32. In den Assay-Wells ist [³H]-17 β -Estradiol in einer Konzentration von 1,0 nM zu verwenden.

Prüfchemikalien

33. Zunächst muss anhand einer Löslichkeitsprüfung die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien ermittelt und ein geeigneter Konzentrationsbereich für die Durchführung des Prüfprotokolls bestimmt werden. Die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien wird zunächst im Lösungsmittel bestimmt und anschließend unter den Bedingungen des Assays bestätigt. Mit dem Assay sind Endkonzentrationen höchstens bis zu 1 mM zu prüfen. Der Vorversuch zur Dosisfindung wird mit einer Lösungsmittelkontrolle und 8 logarithmischen seriellen Verdünnungen beginnend mit der maximal akzeptierbaren Konzentration (z. B. 1 mM oder weniger, je nach Löslichkeitsgrenze) durchgeführt; dabei ist das Auftreten einer Trübung oder eines Niederschlags zu protokollieren (Nummer 35). Die Prüfchemikalie wird anhand der Kurven für 8 im Vorversuch ermittelte logarithmische Konzentrationskurven untersucht. Die Konzentrationen im zweiten und im dritten Versuch sind ggf. so anzupassen, dass die Konzentrations-Reaktionskurve besser charakterisiert wird.
34. Verdünnungen der Prüfchemikalien werden mit dem jeweils geeigneten Lösungsmittel hergestellt (Nummer 26 in Anlage 2). Wenn die höchste Konzentration der Prüfchemikalie weder in Ethanol noch in DMSO löslich ist und die Zugabe von weiterem Lösungsmittel dazu führen würde, dass die Lösungsmittelkonzentration im letzten Röhrchen die Akzeptanzgrenze überschreiten würde, kann die nächstgeringere Konzentration als höchste Konzentration angenommen werden. In diesem Fall kann am unteren Ende der Konzentrationsreihe eine weitere Konzentration eingefügt werden. Die übrigen Konzentrationen der Reihe bleiben unverändert.

35. Die Lösungen mit der Prüfchemikalie werden beim Einbringen in die Assay-Wells sorgfältig beobachtet, da die Prüfchemikalien nach dem Einbringen in die Assay-Wells einen Niederschlag bilden können. Die Daten aller Wells mit einem Niederschlag werden bei der Kurvenanpassung nicht berücksichtigt. Der Grund für den Ausschluss der betreffenden Wells ist zu vermerken.
36. Wenn bereits Informationen aus anderen Quellen mit einem log (IC₅₀) für eine Prüfchemikalie verfügbar sind, können geometrische Verdünnungsstufen (in 0,5-log-Einheiten um den erwarteten log (IC₅₀)) angemessen sein. Am Ende sollte ein ausreichender Abstand der Konzentrationen auf beiden Seiten von log (IC₅₀) einschließlich der höchsten und der niedrigsten Konzentration erreicht sein, damit die Bindungskurve angemessen beschrieben werden kann.

Vorbereitung der Assay-Platte

37. Mit Etiketten versehene Mikrotiterplatten werden für sechs Inkubationen mit Codes für die Lösungsmittelkontrolle, die höchste Konzentration des Referenzöstrogens (die auch als Indikator für die nicht spezifische Bindung (NSB) dient) und die Pufferkontrolle vorbereitet; außerdem werden für drei Inkubationen Etiketten mit Codes für jede einzelne der acht Konzentrationen der Nicht-Binder-Kontrolle (Octyltriethylxysilan) und für die 7 geringeren Konzentrationen des Referenzöstrogens, die 8 Konzentrationen des schwachen Binders und die 8 Konzentrationen der einzelnen Prüfchemikalien (TC) vorbereitet. Ein Beispiel für die Gestaltung des Plattendiagramms für die vollständigen Konzentrationskurven des Referenzöstrogens und der Kontrolle ist Tabelle 4 zu entnehmen. Für die Prüfchemikalien werden weitere Mikrotiterplatten verwendet; diese Platten sollten Plattenkontrollen, d. h. 1) eine hohe (maximale Verdrängung) und eine mittlere Konzentration (etwa die IC₅₀-Konzentration) von E2 sowie des schwachen Binders (dreifach) und 2) eine Lösungsmittelkontrolle und eine nicht spezifische Bindung (jeweils sechsfach) umfassen (Tabelle 5). Ein Beispiel für die Anordnung auf einer Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen mit drei unbekanntem Prüfchemikalien ist Anlage 2.3 zu entnehmen. Die in den Tabellen 4 und 5 genannten Konzentrationen sind die Endkonzentrationen des Assays. Die maximale E2-Konzentration beträgt 1×10^{-7} M. Für den schwachen Binder ist die höchste Konzentration zu verwenden, auch für den schwachen Binder auf Platte 1 verwendet wurde. Die IC₅₀-Konzentration wird vom Labor anhand der Datenbank mit historischen Kontrollen des Labors bestimmt. Dieser Wert sollte sich in etwa mit dem in der Validierungsstudie ermittelten Wert decken (siehe Tabelle 1).

Tabelle 4

Anordnung der Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen, vollständige Konzentrationskurven für das Referenzöstrogen und die Kontrollen (Platte 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (nur Lösungsmittel)			TB (nur Lösungsmittel)			NSB			NSB		
B	E2 (1×10^{-7})			E2 (1×10^{-8})			E2 ($1 \times 10^{-8,5}$)			E2 (1×10^{-9})		
C	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$)			E2 (1×10^{-10})			E2 (1×10^{-11})			Blindkontrolle (*)		
D	NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			NE (1×10^{-5})			NE ($1 \times 10^{-5,5}$)			NE (1×10^{-6})		
E	NE ($1 \times 10^{-6,5}$)			NE (1×10^{-7})			NE ($1 \times 10^{-7,5}$)			NE ($1 \times 10^{-8,5}$)		
F	OTES (1×10^{-3})			OTES (1×10^{-4})			OTES (1×10^{-5})			OTES (1×10^{-6})		
G	OTES (1×10^{-7})			OTES (1×10^{-8})			OTES (1×10^{-9})			OTES (1×10^{-10})		
H	Blindkontrolle (für warme Wells) (**)			Blindkontrolle (für warme Wells) (**)			Pufferkontrolle			Pufferkontrolle		

Bei diesem Beispiel wird Norethinodrel (NE) als schwacher Binder verwendet.

(*) Leer, Well nicht verwendet.

(**) Blindkontrolle bei der Inkubation nicht verwendet; Verwendung aber zur Bestätigung der insgesamt zugesetzten Radioaktivität.

Tabelle 5

Anordnung der Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen, vollständige Konzentrationskurven für die Prüfchemikalien und die Plattenkontrollen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB (nur Lösungsmittel)			TB (nur Lösungsmittel)			NSB			NSB		
B	TC1 (1×10^{-3})			TC1 (1×10^{-4})			TC1 (1×10^{-5})			TC1 (1×10^{-6})		
C	TC1 (1×10^{-7})			TC1 (1×10^{-8})			TC1 (1×10^{-9})			TC1 (1×10^{-10})		
D	TC2 (1×10^{-3})			TC2 (1×10^{-4})			TC2 (1×10^{-5})			TC2 (1×10^{-6})		
E	TC2 (1×10^{-7})			TC2 (1×10^{-8})			TC2 (1×10^{-9})			TC2 (1×10^{-10})		
F	TC3 (1×10^{-3})			TC3 (1×10^{-4})			TC3 (1×10^{-5})			TC3 (1×10^{-6})		
G	TC3 (1×10^{-7})			TC3 (1×10^{-8})			TC3 (1×10^{-9})			TC3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC_{50})			NE ($1 \times 10^{-4,5}$)			E2 (IC_{50})			E2 (1×10^{-7})		

Bei diesem Beispiel wird Norethinodrel (NE) als schwacher Binder verwendet.

Abschluss des Assays zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

38. Wie in Tabelle 6 dargestellt, werden 80 µl der Lösungsmittelkontrolle, der Pufferkontrolle, des Referenzöstrogens, des schwachen Binders, des Nicht-Binders und der im Assay-Puffer zubereiteten Prüfchemikalien in die Wells gegeben. Anschließend werden in jeden Well 40 µl einer Lösung mit 4 nM [3 H]-17β-Estradiol gegeben. Nach sanftem Drehen über einen Zeitraum von 10-15 Minuten bei Temperaturen zwischen 2 und 8 °C werden 40 µl der hrERα-Lösung hinzugegeben. Die für den Assay verwendeten Mikrotiterplatten werden 16-20 Stunden bei 2-8 °C auf einem Karussell inkubiert.

Tabelle 6

Volumina der Elemente des hrER-Assays zur Ermittlung konkurrierender Bindungen auf den Mikrotiterplatten

Volumen (µl)	Element
80	Nicht markiertes 17β-Estradiol, Norethynodrel, OTES, Prüfchemikalien, Lösungsmittel oder Puffer
40	4 nM [3 H]-17β-Estradiol-Lösung
40	hrERα-Lösung, Konzentration wie ermittelt
160	Gesamtvolumen in den einzelnen Assay-Wells

39. Nach der Trennung des an den hrERα gebundenen [3 H]-17β-Estradiols von dem freien [3 H]-17β-Estradiol durch Zugabe von 80 µl kalter DCC-Suspension zu jedem einzelnen Well (wie in den Nummern 20-23 für den Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung beschrieben) wird die Bindung von [3 H]-17β-Estradiol an den hrERα quantifiziert.
40. Die Wells H1-6 (in Tabelle 4 als Blindkontrollen (für warme Wells) gekennzeichnet) geben Aufschluss über die Zerfallereignisse pro Minute (DPM) des markierten [3 H]-Estradiols in einer Aliquote von 40 µl. Die Aliquote von 40 µl wird unmittelbar in die Szintillationsflüssigkeit in den Wells H1-H6 gegeben.

Akzeptanzkriterien

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

41. Die spezifische Bindungskurve sollte mit zunehmenden Konzentrationen des [³H]-17β-Estradiols (soweit verwendet) ein Plateau erreichen. Dieses Plateau zeigt, dass der hrERα mit dem Liganden gesättigt wurde.
42. Die spezifische Bindung bei 1 nM [³H]-17β-Estradiol sollte im akzeptablen Bereich von 15-25 % des Durchschnitts der insgesamt gemessenen Radioaktivität liegen, um die sich die Radioaktivität in allen Prüfläufen erhöht hat. Gelegentliche geringfügige Über- oder Unterschreitungen dieses Bereichs sind akzeptabel. Wenn Prüfläufe aber durchgängig außerhalb dieses Bereichs liegen bzw. ein bestimmter Prüflauf erheblich außerhalb dieses Bereichs liegt, sollte die Proteinkonzentration angepasst und der Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung wiederholt werden.
43. Aus den Daten sollte sich ein lineares Scatchard-Diagramm ergeben.
44. Die nicht spezifische Bindung sollte nicht überhöht sein. In der Regel sollte der Wert der nicht spezifischen Bindung weniger als 35 % der Gesamtbindung betragen. Diese Grenze kann jedoch in Einzelfällen überschritten werden, wenn bei der niedrigsten Konzentration des geprüften 17β-Estradiols sehr wenige Zerfallsereignisse pro Minute gemessen werden.

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

45. Zunehmende Konzentrationen nicht markierten 17β-Estradiols sollten [³H]-17β-Estradiol aus dem Rezeptor verdrängen; die Verdrängung sollte im Einklang mit einer konkurrierenden Bindung an einer einzigen Bindungsstelle stehen.
46. Der IC₅₀-Wert des Referenzöstrogens (17β-Estradiol) sollte in etwa mit der molaren Konzentration von [³H]-17β-Estradiol zuzüglich der im Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung berechneten Dissoziationskonstante (K_d) übereinstimmen.
47. Die spezifische Gesamtbindung sollte einheitlich im akzeptablen Bereich von 20 ± 5 % liegen, wenn die gemessene durchschnittliche Konzentration, um die sich die Radioaktivität in jedem einzelnen Well erhöht hat, im Verlauf der Prüfläufe bei 1 nM lag. Gelegentliche geringfügige Über- oder Unterschreitungen dieses Bereichs sind akzeptabel. Wenn Prüfläufe aber durchgängig außerhalb dieses Bereichs liegen bzw. ein bestimmter Prüflauf erheblich außerhalb dieses Bereichs liegt, sollte die Proteinkonzentration angepasst werden.
48. Das Lösungsmittel darf keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit oder die Reproduzierbarkeit des Assays haben. Die Ergebnisse der Lösungsmittelkontrolle werden mit der Pufferkontrolle verglichen, um sicherzustellen, dass das verwendete Lösungsmittel das Assay-System nicht beeinträchtigt. Die Ergebnisse für die Gesamtbindung (TB) und die Pufferkontrolle sollten vergleichbar sein, wenn das Lösungsmittel den Assay nicht beeinflusst.
49. Bei Prüfungen mit bis zu 10⁻³ M (OTES) bzw. 10⁻⁴ M (DBP) darf der Nicht-Binder nicht mehr als 25 % des [³H]-17β-Estradiols vom hrERα verdrängen.
50. Aufgrund von Daten der Studie zur Validierung des FW-Bindungsassays mit hrER wurden Leistungskriterien für das Referenzöstrogen und zwei schwache Binder (z. B. Norethynodrel und Norethindron) entwickelt (Anhang N in (2)). Für den Mittelwert (n) +/- SD aller Kontrolldurchläufe in den an der Validierungsstudie beteiligten Labors werden 95-%-Konfidenzintervalle angegeben. 95-%-Konfidenzintervalle wurden für die Parameter zur Kurvenanpassung (Höchstwert, Mindestwert, Hillslope und log IC₅₀) für das Referenzöstrogen und für schwache Binder sowie für log₁₀ RBA der schwachen Binder bezogen auf das Referenzöstrogen berechnet. Die Konfidenzintervalle werden als Leistungskriterien für die Positivkontrollen angegeben. Tabelle 1 enthält die erwarteten Spannen der Kurvenanpassungsparameter, die als Leistungskriterien verwendet werden können. In der Praxis kann die IC₅₀-Spanne je nach K_d der Rezeptorzubereitung und der Ligandenkonzentration leicht variieren.

51. In Anbetracht der großen Anzahl potenzieller Prüfchemikalien und der Unterschiede hinsichtlich der potenziellen Affinitäten und Ergebnisse (vollständige Kurve, Teilkurve, keine Kurvenanpassung usw.) wurden keine Leistungskriterien für die Kurvenanpassungsparameter der Prüfchemikalien entwickelt. Die Ergebnisse der einzelnen Prüfläufe sowie die Ergebnisse für die einzelnen Prüfchemikalien sind jedoch einer fachlich qualifizierten Beurteilung zu unterziehen. Um den Höchstwert der Kurve der konkurrierenden Bindungen (z. B. eine Bindungsquote von 90-100 %) eindeutig zu ermitteln, sollte ein ausreichendes Spektrum an Konzentrationen der Prüfchemikalie berücksichtigt werden. Die Variabilität zwischen Wiederholungen bei den einzelnen Konzentrationen der Prüfchemikalie sowie zwischen den drei nicht gleichzeitigen Prüfläufen sollte angemessen und wissenschaftlich vertretbar sein. Die Kontrollen der einzelnen Prüfläufe einer Prüfchemikalie sollten sich im Bereich der Messungen der für diesen FW-Assay angegebenen Leistungen bewegen und mit historischen Kontrolldaten der jeweiligen Labors übereinstimmen.

ANALYSE DER DATEN

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

52. Gemessen werden sowohl die Gesamtbindung als auch die nicht spezifische Bindung. Aufgrund dieser Werte wird die spezifische Bindung bei zunehmenden Konzentrationen von [³H]-17β-Estradiol unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelt, indem die nicht spezifische Bindung von der Gesamtbindung abgezogen wird. In der grafischen Darstellung der spezifischen Bindung im Vergleich zur Konzentration von [³H]-17β-Estradiol sollte sich bei der maximalen spezifischen Konzentration ein Plateau als Bestätigung für die erfolgte Sättigung des hrERα mit [³H]-17β-Estradiol ergeben. Außerdem sollte in der Analyse der Daten die Bindung des [³H]-17β-Estradiols an eine einzelne Bindungsstelle mit hoher Affinität dokumentiert werden. Die nicht spezifische Bindung, die Gesamtbindung und die spezifische Bindung sind auf einer Sättigungskurve darzustellen. Darüber hinaus sollte eine nicht lineare Regressionsanalyse (z. B. mit BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) vorgenommen werden. Die ermittelten Daten sind in einem endgültigen Scatchard-Diagramm darzustellen.
53. Bei der Analyse sind B_{\max} und K_d ausschließlich anhand der Daten zur Gesamtbindung zu ermitteln. Dabei ist von einem linearen Verlauf der nicht spezifischen Bindung auszugehen. Eine anderweitige Vorgehensweise ist zu begründen. Ferner sollte eine robuste Regression zur Ermittlung der Best-Fit-Werte vorgenommen werden, sofern nicht eine Begründung für ein anderweitiges Vorgehen angegeben wird. Die gewählte Methode für die Durchführung der robusten Regression ist anzugeben. Bei der Ermittlung von B_{\max} und K_d aufgrund von Daten zur Sättigungsbindung ist immer eine Korrektur aufgrund des Ligandenabbaus vorzunehmen (z. B. nach der Methode von Swillens 1995).

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

54. Die Kurve zur Darstellung konkurrierender Bindungen wird als spezifische Bindung von [³H]-17β-Estradiol im Vergleich zur Konzentration (\log_{10} -Stufen) des Bindungskonkurrenten dargestellt. Die Konzentration der Prüfchemikalie, die die maximale spezifische Bindung von [³H]-17β-Estradiol um 50 % hemmt, wird als IC_{50} -Wert bezeichnet.
55. Schätzungen der \log -(IC_{50})-Werte der positiven Kontrollen (z. B. Referenzöstrogen und ein schwacher Binder) sollten mit einer geeigneten Software zur nicht linearen Kurvenanpassung für eine Hill-Gleichung mit 4 Parametern (z. B. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) vorgenommen werden. Die Höchstwerte, die Mindestwerte, die Hillslope-Werte und die \log -(IC_{50})-Werte sollten bei der Anpassung dieser Kurven allgemein nicht beschränkt werden. Zur Ermittlung der Best-Fit-Werte sollte eine robuste Regression vorgenommen werden, sofern nicht eine Begründung für ein anderweitiges Vorgehen angegeben wird. Eine Korrektur aufgrund des Ligandenabbaus sollte nicht vorgenommen werden. Nach der Ausgangsanalyse sollte jede einzelne Bindungskurve nochmals geprüft werden, um eine angemessene Anpassung an das Modell sicherzustellen. Die relative Bindungsaffinität (RBA) des schwachen Binders sollte als Prozentanteil von \log (IC_{50}) für den schwachen Binder bezogen auf \log (IC_{50}) für 17β-Estradiol berechnet werden. Die Ergebnisse der Positivkontrollen und der Nicht-Binder-Kontrolle sind anhand der Kriterien für die Leistungsfähigkeit des Assays (Nummern 45-50 in Anlage 2) zu bewerten.
56. Die Daten aller Prüfchemikalien werden schrittweise analysiert, um eine angemessene Vorgehensweise und eine korrekte Einstufung der einzelnen Kurven zum konkurrierenden Bindungsverhalten sicherzustellen. Für jeden Prüflauf einer Prüfchemikalie sollte zunächst eine standardisierte Datenanalyse nach dem Verfahren vorgenommen werden, das auch zur Analyse der Kontrollen mit dem Referenzöstrogen und dem schwachen Binder durchgeführt wird (Nummer 55). Nach dieser Analyse sollten die Parameter zur Kurvenanpassung fachlich geprüft werden; außerdem sollte geprüft werden, in welchem Umfang die Daten mit der erzeugten Kurve der konkurrierenden Bindungen übereinstimmen. Bei dieser fachlichen Prüfung sind die Feststellung eines konzentrationsabhängigen Rückgangs der prozentualen spezifischen Bindung von [³H]-17β-Estradiol, eine geringe Variabilität der technischen Wiederholungen bei den einzelnen Chemikalienkonzentrationen und die Konsistenz der Anpassungsparameter bei den drei Prüfläufen gute Indikatoren für die ordnungsgemäße Durchführung des Assays und der Datenanalysen.

Datenauswertung

57. Sofern alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, wird eine Prüfchemikalie als Binder für den hrERa betrachtet, wenn eine Bindungskurve angepasst werden kann und der niedrigste Punkt auf der Reaktionskurve im Datenbereich weniger als 50 % beträgt (Abbildung 1).
58. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als Nicht-Binder für den hrERa, wenn die folgenden Bedingungen gegeben sind:
- Eine Bindungskurve kann angepasst werden, und der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve innerhalb des Datenbereichs liegt über 75 %, oder
 - es kann keine Anpassung der Bindungskurve vorgenommen werden, und der niedrigste nicht korrigierte Durchschnittswert der prozentualen Bindung der Konzentrationsgruppen im Datenbereich liegt über 75 %.
59. Prüfchemikalien werden als nicht eindeutig betrachtet, wenn keine der genannten Bedingungen erfüllt ist (z. B. wenn der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve zwischen 76 und 51 % liegt).

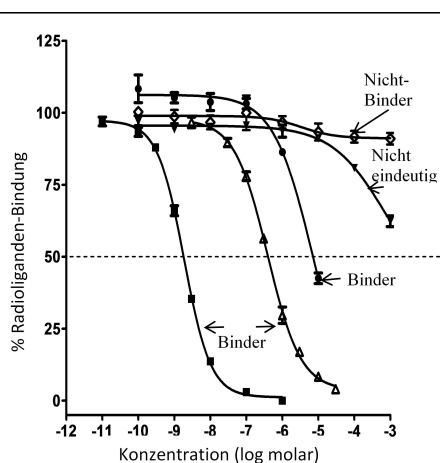
Tabelle 7

Kriterien für eine Einstufung nach der Kurve des konkurrierenden Bindungsverhaltens bei einer Prüfchemikalie

Einstufung	Kriterien
Binder ^a	Eine Bindungskurve kann angepasst werden. Der niedrigste Punkt auf der Reaktionskurve im Datenbereich liegt bei weniger als 50 %.
Nicht-Binder ^b	Wenn eine Bindungskurve angepasst werden kann: Der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve im Datenbereich liegt über 75 %. Wenn keine Bindungskurve angepasst werden kann: Der niedrigste nicht korrigierte Durchschnittswert der prozentualen Bindung der Konzentrationsgruppen im Datenbereich liegt über 75 %.
Nicht eindeutig ^c	Alle analysierbaren Prüfläufe, bei denen die Prüfchemikalie weder als Binder noch als Nicht-Binder eingestuft wird (beispielsweise wenn der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve zwischen 76 und 51 % liegt).

Abbildung 1

Beispiele für die Einstufung von Prüfchemikalien anhand der Kurve der konkurrierenden Bindungen



60. Mehrere in einem Labor mit einer Prüfchemikalie durchgeführte Prüfläufe werden unter Zuweisung von numerischen Werten zu den einzelnen Prüfläufen und unter Ermittlung des Durchschnitts der Prüfläufe durchgeführt (siehe Tabelle 8). Die Ergebnisse der kombinierten Prüfläufe in den einzelnen Labors werden mit der erwarteten Einstufung der einzelnen Prüfchemikalien verglichen.

Tabelle 8

Methode zur Einstufung von Prüfchemikalien aufgrund mehrerer Prüfläufe in einem Labor

Zuweisung eines Wertes zu den einzelnen Prüfläufen:	
Einstufung	Numerischer Wert
Binder	2
Nicht eindeutig	1
Nicht-Binder	0

Einstufung des durchschnittlichen numerischen Werts für mehrere Prüfläufe:	
Einstufung	Numerischer Wert
Binder	Durchschnitt $\geq 1,5$
Nicht eindeutig	$0,5 \leq$ Durchschnitt $< 1,5$
Nicht-Binder	Durchschnitt $\geq 0,5$

PRÜFBERICHT

61. Siehe Nummer 24 im Abschnitt „ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS“ für diese Prüfmethode.

Anlage 2.1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

[³H]E2: 17 β -Estradiol mit Tritium radioaktiv markiert.

Assay-Puffer: 10 mM Tris, 10 mg Rinderserumalbumin/ml, 2 mM DTT, 10 % Glycerin, 0,2 mM Leupeptin, pH 7,5.

DCC: Dextranbeschichtete Aktivkohle.

E2: Nicht markiertes 17 β -Estradiol (inert).

hrER α : Humaner rekombinanter Östrogenrezeptor alpha.

Prüflauf: Eine vollständige Reihe gleichzeitig zu prüfender Mikrotiterplatten-Wells, denen alle Informationen zu entnehmen sind, die zur Charakterisierung der Bindung einer Prüfchemikalie an den hrER α benötigt werden (d. h. insgesamt zum Well hinzugegebenes [³H]-17 β -Estradiol, maximale Bindung von [³H]-17 β -Estradiol an den hrER α , nicht spezifische Bindung und Gesamtbindung bei verschiedenen Konzentrationen der Prüfchemikalie). Ein Prüflauf kann bereits aus einem einzigen Well (d. h. einer einzigen Wiederholung) pro Konzentration bestehen. Da nach diesem Protokoll jedoch eine dreifache Untersuchung vorzunehmen ist, umfasst ein Prüflauf drei Wells pro Konzentration. Außerdem sind nach diesem Protokoll drei unabhängige (d. h. nicht gleichzeitige) Prüfläufe pro Chemikalie vorzunehmen.

Wiederholung (Replikat): Eines von mehreren Wells mit denselben Inhalten in denselben Konzentrationen, die in einem einzelnen Prüflauf gleichzeitig untersucht werden. Bei diesem Protokoll wird jede Konzentration der Prüfchemikalie dreimal geprüft, d. h. je Konzentration der Prüfchemikalie werden drei Wiederholungen gleichzeitig untersucht.

Anlage 2.2

TYPISCHER ASSAY ZUR ERMITTLUNG DER SÄTTIGUNGSBINDUNG MIT [³H]-17 β -ESTRADIOL MIT DREI REPLIKAT-WELLS

Typischer Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung mit [³ H]-17 β -Estradiol mit drei Replikat-Wells											
Position	Replikat	Well-Typ-Code	Ausgangskonzentration warmes E2 (nM)	Volumen warmes E2 (μ l)	Endkonzentration warmes E2 (nM)	Ausgangskonzentration kaltes E2 (μ M)	Volumen kaltes E2 (μ l)	Ausgangskonzentration kaltes E2 (μ M)	Puffer-Volumen (μ l)	Rezeptor-Volumen (μ l)	Ausgangsvolumen in Wells
A1	1	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A2	2	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A3	3	H	0,12	40	0,03	—	—	—	80	40	160
A4	1	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A5	2	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A6	3	H	0,24	40	0,06	—	—	—	80	40	160
A7	1	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A8	2	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A9	3	H	0,32	40	0,08	—	—	—	80	40	160
A10	1	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A11	2	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
A12	3	H	0,40	40	0,10	—	—	—	80	40	160
B1	1	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B2	2	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B3	3	H	1,20	40	0,30	—	—	—	80	40	160
B4	1	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B5	2	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B6	3	H	2,40	40	0,60	—	—	—	80	40	160
B7	1	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B8	2	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160

Typischer Assay zur Ermittlung der Sättigungsbinding mit [³H]-17β-Estradiol mit drei Replikat-Wells

Position	Replikat	Well-Typ-Code	Ausgangskonzentration warmes E2 (nM)	Volumen warmes E2 (µl)	Endkonzentration warmes E2 (nM)	Ausgangskonzentration kaltes E2 (µM)	Volumen kaltes E2 (µl)	Ausgangskonzentration kaltes E2 (µM)	Puffer-Volumen (µl)	Rezeptor-Volumen (µl)	Ausgangsvolumen in Wells
B9	3	H	4,00	40	1,00	—	—	—	80	40	160
B10	1	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B11	2	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
B12	3	H	12,00	40	3,00	—	—	—	80	40	160
D1	1	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D2	2	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D3	3	HC	0,12	40	0,03	0,06	80	0,03	—	40	160
D4	1	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D5	2	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D6	3	HC	0,24	40	0,06	0,12	80	0,06	—	40	160
D7	1	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D8	2	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D9	3	HC	0,32	40	0,08	0,16	80	0,08	—	40	160
D10	1	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D11	2	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
D12	3	HC	0,40	40	0,10	0,2	80	0,1	—	40	160
E1	1	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E2	2	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E3	3	HC	1,20	40	0,30	0,6	80	0,3	—	40	160
E4	1	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E5	2	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160

Typischer Assay zur Ermittlung der Sättigungsbinding mit [³H]-17β-Estradiol mit drei Replikat-Well

Position	Replikat	Well-Typ-Code	Ausgangskonzentration warmes E2 (nM)	Volumen warmes E2 (µl)	Endkonzentration warmes E2 (nM)	Ausgangskonzentration kaltes E2 (µM)	Volumen kaltes E2 (µl)	Ausgangskonzentration kaltes E2 (µM)	Puffer-Volumen (µl)	Rezeptor-Volumen (µl)	Ausgangsvolumen in Wells
E6	3	HC	2,40	40	0,60	1,2	80	0,6	—	40	160
E7	1	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E8	2	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E9	3	HC	4,00	40	1,00	2	80	1	—	40	160
E10	1	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E11	2	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
E12	3	HC	12,00	40	3,00	6	80	3	—	40	160
G1	1	Warm	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G2	2	Warm	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G3	3	Warm	0,12	40	0,03	—	—	—	—	—	40
G4	1	Warm	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G5	2	Warm	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G6	3	Warm	0,24	40	0,06	—	—	—	—	—	40
G7	1	Warm	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G8	2	Warm	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G9	3	Warm	0,32	40	0,08	—	—	—	—	—	40
G10	1	Warm	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G11	2	Warm	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
G12	3	Warm	0,40	40	0,10	—	—	—	—	—	40
H1	1	Warm	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H2	2	Warm	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H3	3	Warm	1,20	40	0,30	—	—	—	—	—	40
H4	1	Warm	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40

Typischer Assay zur Ermittlung der Sättigungsbinding mit [³H]-17β-Estradiol mit drei Replikat-Wells

Position	Replikat	Well-Typ-Code	Ausgangskonzentration warmes E2 (nM)	Volumen warmes E2 (µl)	Endkonzentration warmes E2 (nM)	Ausgangskonzentration kaltes E2 (µM)	Volumen kaltes E2 (µl)	Ausgangskonzentration kaltes E2 (µM)	Puffer-Volumen (µl)	Rezeptor-Volumen (µl)	Ausgangsvolumen in Wells
H5	2	Warm	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H6	3	Warm	2,40	40	0,60	—	—	—	—	—	40
H7	1	Warm	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H8	2	Warm	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H9	3	Warm	4,00	40	1,00	—	—	—	—	—	40
H10	1	Warm	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H11	2	Warm	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40
H12	3	Warm	12,00	40	3,00	—	—	—	—	—	40

Die „warmen“ Wells sind bei der Inkubation leer. Die 40 µl werden nur für die Szintillationszählung hinzugegeben.

Anlage 2.3

ANORDNUNG DER WELLS BEIM ASSAY ZUR ERMITTLUNG KONKURRIERENDER BINDUNGEN

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	IrrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Volumen (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	A1	1	Gesamtbindung	TB	TB1	—	40		40	80	160	—
S	A2	2	Gesamtbindung	TB	TB2	—	40		40	80	160	—
S	A3	3	Gesamtbindung	TB	TB3	—	40		40	80	160	—
S	A4	1	Gesamtbindung	TB	TB4	—	40		40	80	160	—
S	A5	2	Gesamtbindung	TB	TB5	—	40		40	80	160	—
S	A6	3	Gesamtbindung	TB	TB6	—	40		40	80	160	—
S	A7	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	A8	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	A9	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	A10	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	A11	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	A12	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	B1	1	kaltes E2	S	S1	2,0E ⁻⁷	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁷
S	B2	2	kaltes E2	S	S1	2,0E ⁻⁷	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁷
S	B3	3	kaltes E2	S	S1	2,0E ⁻⁷	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁷
S	B4	1	kaltes E2	S	S2	2,0E ⁻⁸	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁸
S	B5	2	kaltes E2	S	S2	2,0E ⁻⁸	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁸
S	B6	3	kaltes E2	S	S2	2,0E ⁻⁸	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁸
S	B7	1	kaltes E2	S	S3	6,0E ⁻⁹	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁹
S	B8	2	kaltes E2	S	S3	6,0E ⁻⁹	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁹
S	B9	3	kaltes E2	S	S3	6,0E ⁻⁹	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁹

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Volumen (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskurrenten (M)
S	B10	1	kaltes E2	S	S4	2,0E ⁻⁹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁹
S	B11	2	kaltes E2	S	S4	2,0E ⁻⁹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁹
S	B12	3	kaltes E2	S	S4	2,0E ⁻⁹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁹
S	C1	1	kaltes E2	S	S5	6,0E ⁻¹⁰	40	—	40	80	160	3,0E ⁻¹⁰
S	C2	2	kaltes E2	S	S5	6,0E ⁻¹⁰	40	—	40	80	160	3,0E ⁻¹⁰
S	C3	3	kaltes E2	S	S5	6,0E ⁻¹⁰	40	—	40	80	160	3,0E ⁻¹⁰
S	C4	1	kaltes E2	S	S6	2,0E ⁻¹⁰	40	—	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
S	C5	2	kaltes E2	S	S6	2,0E ⁻¹⁰	40	—	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
S	C6	3	kaltes E2	S	S6	2,0E ⁻¹⁰	40	—	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
S	C7	1	kaltes E2	S	S7	2,0E ⁻¹¹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻¹¹
S	C8	2	kaltes E2	S	S7	2,0E ⁻¹¹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻¹¹
S	C9	3	kaltes E2	S	S7	2,0E ⁻¹¹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻¹¹
S	C10	1	Blindkontrolle	Blindkontrolle	B1	—	—	160	—	—	160	—
S	C11	2	Blindkontrolle	Blindkontrolle	B2	—	—	160	—	—	160	—
S	C12	3	Blindkontrolle	Blindkontrolle	B3	—	—	160	—	—	160	—
S	D1	1	Norethynodrel	NE	WP1	6,0E ⁻⁵	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁵
S	D2	1	Norethynodrel	NE	WP1	6,0E ⁻⁵	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁵
S	D3	1	Norethynodrel	NE	WP1	6,0E ⁻⁵	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁵
S	D4	1	Norethynodrel	NE	WP2	2,0E ⁻⁵	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁵
S	D5	1	Norethynodrel	NE	WP2	2,0E ⁻⁵	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁵
S	D6	1	Norethynodrel	NE	WP2	2,0E ⁻⁵	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁵

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Volumen (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	D7	1	Norethynodrel	NE	WP3	6,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁶
S	D8	1	Norethynodrel	NE	WP3	6,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁶
S	D9	1	Norethynodrel	NE	WP3	6,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁶
S	D10	1	Norethynodrel	NE	WP4	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	D11	1	Norethynodrel	NE	WP4	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	D12	1	Norethynodrel	NE	WP4	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	E1	1	Norethynodrel	NE	WP	6,0E ⁻⁷	40		40	80	160	3,0E ⁻⁷
S	E2	2	Norethynodrel	NE	WP	6,0E ⁻⁷	40		40	80	160	3,0E ⁻⁷
S	E3	3	Norethynodrel	NE	WP	6,0E ⁻⁷	40		40	80	160	3,0E ⁻⁷
S	E4	1	Norethynodrel	NE	WP	2,0E ⁻⁷	40		40	80	160	1,0E ⁻⁷
S	E5	2	Norethynodrel	NE	WP	2,0E ⁻⁷	40		40	80	160	1,0E ⁻⁷
S	E6	3	Norethynodrel	NE	WP	2,0E ⁻⁷	40		40	80	160	1,0E ⁻⁷
S	E7	1	Norethynodrel	NE	WP	6,0E ⁻⁸	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁸
S	E8	2	Norethynodrel	NE	WP	6,0E ⁻⁸	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁸
S	E9	3	Norethynodrel	NE	WP	6,0E ⁻⁸	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁸
S	E10	1	Norethynodrel	NE	WP	6,0E ⁻⁹	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁹

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Volumen (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskurrenten (M)
S	E11	2	Norethynodrel	NE	WP	6,0E ⁻⁹	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁹
S	E12	3	Norethynodrel	NE	WP	6,0E ⁻⁹	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁹
S	F1	1	OTES	N	OTES	2,0E ⁻³	40	—	40	80	160	1,0E ⁻³
S	F2	2	OTES	N	OTES	2,0E ⁻³	40	—	40	80	160	1,0E ⁻³
S	F3	3	OTES	N	OTES	2,0E ⁻³	40	—	40	80	160	1,0E ⁻³
S	F4	1	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁴	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁴
S	F5	2	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁴	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁴
S	F6	3	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁴	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁴
S	F7	1	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁵	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁵
S	F8	2	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁵	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁵
S	F9	3	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁵	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁵
S	F10	1	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	F11	2	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	F12	3	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
S	G1	1	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁷	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁷
S	G2	2	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁷	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁷
S	G3	3	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁷	40	—	40	80	160	3,0E ⁻⁷
S	G4	1	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁸	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁸
S	G5	2	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁸	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁸
S	G6	3	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁸	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁸
S	G7	1	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁹

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Volumen (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	G8	2	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁹
S	G9	3	OTES	N	OTES	2,0E ⁻⁹	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁹
S	G10	1	OTES	N	OTES	2,0E ⁻¹⁰	40	—	40	—	160	1,0E ⁻¹⁰
S	G11	2	OTES	N	OTES	2,0E ⁻¹⁰	40	—	40	—	160	1,0E ⁻¹⁰
S	G12	3	OTES	N	OTES	2,0E ⁻¹⁰	40	—	40	—	160	1,0E ⁻¹⁰
S	H1	1	Warm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H2	1	Warm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H3	1	Warm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H4	1	Warm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H5	1	Warm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H6	1	Warm	H	H	—	—	—	40	—	40	—
S	H7	1	Pufferkontrolle	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H8	1	Pufferkontrolle	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H9	1	Pufferkontrolle	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H10	1	Pufferkontrolle	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H11	1	Pufferkontrolle	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—
S	H12	1	Pufferkontrolle	PK	PK	—	40	80	40	—	160	—

Die „warmen“ Wells sind bei der Inkubation leer. Die 40 µl werden nur für die Szintillationszählung hinzugegeben.

Anordnung der Wells beim Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

Platte	Position	Replik	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskurrenten (M)
P1	A1	1	Gesamtbindung	TB	TBB1B1	—	40	—	40	80	160	—
P1	A2	2	Gesamtbindung	TB	TB2	—	40	—	40	80	160	—
P1	A3	3	Gesamtbindung	TB	TB3	—	40	—	40	80	160	—
P1	A4	1	Gesamtbindung	TB	TB4	—	40	—	40	80	160	—
P1	A5	2	Gesamtbindung	TB	TB5	—	40	—	40	80	160	—
P1	A6	3	Gesamtbindung	TB	TB6	—	40	—	40	80	160	—
P1	A7	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	A8	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	A9	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	A10	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	A11	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	A12	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S0	2,0E ⁻⁶	40	—	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	B1	1	Prüfchemikalie 1	TC1	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	B2	2	Prüfchemikalie 1	TC1	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	B3	3	Prüfchemikalie 1	TC1	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	B4	1	Prüfchemikalie 1	TC1	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	B5	2	Prüfchemikalie 1	TC1	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	B6	3	Prüfchemikalie 1	TC1	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	B7	1	Prüfchemikalie 1	TC1	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	B8	2	Prüfchemikalie 1	TC1	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	B9	3	Prüfchemikalie 1	TC1	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	B10	1	Prüfchemikalie 1	TC1	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	B11	2	Prüfchemikalie 1	TC1	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	B12	3	Prüfchemikalie 1	TC1	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶

Anordnung der Wells beim Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	C1	1	Prüfchemikalie 1	TC1	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	C2	2	Prüfchemikalie 1	TC1	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	C3	3	Prüfchemikalie 1	TC1	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	C4	1	Prüfchemikalie 1	TC1	6	2,0E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	C5	2	Prüfchemikalie 1	TC1	6	2,0E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	C6	3	Prüfchemikalie 1	TC1	6	2,0E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	C7	1	Prüfchemikalie 1	TC1	7	2,0E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	C8	2	Prüfchemikalie 1	TC1	7	2,0E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	C9	3	Prüfchemikalie 1	TC1	7	2,0E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	C10	1	Prüfchemikalie 1	TC1	8	2,0E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	C11	2	Prüfchemikalie 1	TC1	8	2,0E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	C12	3	Prüfchemikalie 1	TC1	8	2,0E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	D1	1	Prüfchemikalie 2	TC2	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	D2	2	Prüfchemikalie 2	TC2	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	D3	3	Prüfchemikalie 2	TC2	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	D4	1	Prüfchemikalie 2	TC2	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	D5	2	Prüfchemikalie 2	TC2	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	D6	3	Prüfchemikalie 2	TC2	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	D7	1	Prüfchemikalie 2	TC2	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	D8	2	Prüfchemikalie 2	TC2	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	D9	3	Prüfchemikalie 2	TC2	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	D10	1	Prüfchemikalie 2	TC2	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	D11	2	Prüfchemikalie 2	TC2	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	D12	3	Prüfchemikalie 2	TC2	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶

Anordnung der Wells beim Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	E1	1	Prüfchemikalie 2	TC2	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	E2	2	Prüfchemikalie 2	TC2	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	E3	3	Prüfchemikalie 2	TC2	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	E4	1	Prüfchemikalie 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	E5	2	Prüfchemikalie 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	E6	3	Prüfchemikalie 2	TC2	6	—	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	E7	1	Prüfchemikalie 2	TC2	7	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	E8	2	Prüfchemikalie 2	TC2	7	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	E9	3	Prüfchemikalie 2	TC2	7	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	E10	1	Prüfchemikalie 2	TC2	8	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	E11	2	Prüfchemikalie 2	TC2	8	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	E12	3	Prüfchemikalie 2	TC2	8	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	F1	1	Prüfchemikalie 3	TC3	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	F2	2	Prüfchemikalie 3	TC3	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	F3	3	Prüfchemikalie 3	TC3	1	2,0E ⁻³	40	0	40	80	160	1,0E ⁻³
P1	F4	1	Prüfchemikalie 3	TC3	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	F5	2	Prüfchemikalie 3	TC3	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	F6	3	Prüfchemikalie 3	TC3	2	2,0E ⁻⁴	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁴
P1	F7	1	Prüfchemikalie 3	TC3	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	F8	2	Prüfchemikalie 3	TC3	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	F9	3	Prüfchemikalie 3	TC3	3	2,0E ⁻⁵	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁵
P1	F10	1	Prüfchemikalie 3	TC3	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	F11	2	Prüfchemikalie 3	TC3	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶
P1	F12	3	Prüfchemikalie 3	TC3	4	2,0E ⁻⁶	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁶

Anordnung der Wells beim Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	G1	1	Prüfchemikalie 3	TC3	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	G2	2	Prüfchemikalie 3	TC3	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	G3	3	Prüfchemikalie 3	TC3	5	2,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁷
P1	G4	1	Prüfchemikalie 3	TC3	6	2,0E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	G5	2	Prüfchemikalie 3	TC3	6	2,0E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	G6	3	Prüfchemikalie 3	TC3	6	2,0E ⁻⁸	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁸
P1	G7	1	Prüfchemikalie 3	TC3	7	2,0E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	G8	2	Prüfchemikalie 3	TC3	7	2,0E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	G9	3	Prüfchemikalie 3	TC3	7	2,0E ⁻⁹	40	0	40	80	160	1,0E ⁻⁹
P1	G10	1	Prüfchemikalie 3	TC3	8	2,0E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	G11	2	Prüfchemikalie 3	TC3	8	2,0E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	G12	3	Prüfchemikalie 3	TC3	8	2,0E ⁻¹⁰	40	0	40	80	160	1,0E ⁻¹⁰
P1	H1	1	Norethynodrel	NE		IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H2	2	Norethynodrel	NE		IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H3	3	Norethynodrel	NE		IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H4	1	Norethynodrel	NE		1,0E ^{-4,5}	40	0	40	80	160	
P1	H5	2	Norethynodrel	NE		1,0E ^{-4,5}	40	0	40	80	160	
P1	H6	3	Norethynodrel	NE		1,0E ^{-4,5}	40	0	40	80	160	
P1	H7	1	kaltes E2 S			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H8	2	kaltes E2 S			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H9	3	kaltes E2 S			IC ₅₀	40	0	40	80	160	
P1	H10	1	kaltes E2 S			1,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	
P1	H11	2	kaltes E2 S			1,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	
P1	H12	3	kaltes E2 S			1,0E ⁻⁷	40	0	40	80	160	

Anlage 3

DER IN-VITRO-ÖSTROGENREZEPTOR-BINDUNGSASSAY DES CHEMICAL EVALUATION AND RESEARCH INSTITUTE (CERI) MIT EINEM LIGANDENBINDUNGS-DOMÄNEN-PROTEIN DES HUMANEN REKOMBINANTEN ERA

AUSGANGSÜBERLEGUNGEN UND BEGRENZUNGEN (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

1. Bei diesem *In-vitro*-Assay zur Ermittlung der Sättigung mit dem Östrogenrezeptor ER α und zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird eine Ligandenbindungs-Domäne (LBD) des humanen ER α (hrER α) verwendet. Dieses Proteinmodell wurde vom Chemicals Evaluation Research Institute (CERI), Japan, hergestellt und wird als GST-Fusionsprotein (GST = Glutathion-S-transferase) in *E. coli* exprimiert. Das CERI-Protokoll wurde einer internationalen Validierungsstudie durch mehrere Labors unterzogen (2). Dabei wurden die Relevanz und die Zuverlässigkeit des Protokolls für den vorgesehenen Zweck des Assays nachgewiesen.
2. Der Assay besteht in einem Prüfverfahren zur Ermittlung von Stoffen, die eine Bindung mit dem hrER α eingehen können. Mit dem Assay kann untersucht werden, ob eine Prüfchemikalie mit 17 β -Estradiol um Bindungen an die hrER α -LBD konkurrieren kann. Als quantitative Ergebnisse können mit dem Assay u. a. die Werte für IC₅₀ (als Maßstab für die zur Verdrängung der Hälfte des [³H]-17 β -Estradiols vom hrER α durch eine Prüfchemikalie) und die relative Affinität von Prüfchemikalien für Bindungen an den hrER α im Vergleich zu 17 β -Estradiol ermittelt werden. Mit Blick auf die Verwendung zur Prüfung von Chemikalien kann ein akzeptables qualitatives Ergebnis des Assays auch darin bestehen, dass Prüfchemikalien nach ihrer Bindung an den hrER α und nach den genannten Kriterien für die Bindungskurven als Binder, Nicht-Binder oder nicht eindeutig eingestuft werden.
3. Da bei diesem Assay ein radioaktiver Ligand verwendet wird, benötigen die Labors eine Genehmigung für die Verwendung von radioaktivem Material. Bei allen Verfahren unter Verwendung von Radioisotopen und von gefährlichen Chemikalien sind die nach den nationalen Rechtsvorschriften geltenden Bestimmungen und die dort vorgesehenen Verfahren einzuhalten.
4. Vor der Verwendung dieses Assays für rechtliche Zwecke sollten die Abschnitte „**ALLGEMEINE EINLEITUNG**“ und „**ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS**“ gelesen werden. Die in dieser Prüfrichtlinie verwendeten Begriffe und Abkürzungen werden in Anlage 1 erläutert.

PRINZIPIEN DES ASSAYS (SIEHE AUCH ALLGEMEINE EINLEITUNG)

5. Mit dem hrER α -Bindungsassay wird die Fähigkeit eines radioaktiv markierten Liganden ([³H]-17 β -Estradiol) gemessen, bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie (z. B. eines Bindungskonkurrenten) eine Bindung mit dem ER einzugehen. Prüfchemikalien mit einer starken ER-Affinität konkurrieren mit dem radioaktiv markierten Liganden bei einer niedrigeren Konzentration als Chemikalien mit einer geringeren Affinität für diesen Rezeptor.
6. Dieser Assay beinhaltet zwei wesentliche Elemente: einen Versuch zur Ermittlung von Sättigungsbindungen zur Charakterisierung der Parameter der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand und einen anschließenden Versuch zur Ermittlung konkurrierender Bindungen, mit dem die Konkurrenz zwischen einer Prüfchemikalie und einem radioaktiv markierten Liganden im Hinblick auf die Bindung an den ER beschrieben wird.
7. Zur Vorbereitung der Prüfung konkurrierender Bindungen soll anhand einer Ermittlung der Sättigungsbindung eine bestimmte Rezeptorcharge hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität geprüft und quantitativ bewertet werden. Mit der Prüfung konkurrierender Bindungen werden unter Gleichgewichtsbedingungen die Affinität einer bestimmten Konzentration des Östrogenrezeptors für seinen natürlichen Liganden (ausgedrückt durch die Dissoziationskonstante K_d) und die Konzentration der aktiven Rezeptor-Bindungsstellen (B_{max}) gemessen.
8. Ferner wird mit der Prüfung konkurrierender Bindungen die Affinität eines Stoffs für Bindungen an den ER im Hinblick auf die Konkurrenz mit [³]17 β -Estradiol bewertet. Die Affinität wird anhand der Konzentration der Prüfchemikalie quantifiziert, die unter Gleichgewichtsbedingungen 50 % der spezifischen Bindung von [³]17 β -Estradiol („Hemmkonzentration 50 %“ oder IC₅₀) hemmt. Diese Affinität kann auch anhand der relativen Bindungsaffinität (RBA, bezogen auf IC₅₀ Estradiol, im selben Prüflauf getrennt gemessen) beurteilt werden. Bei der Prüfung konkurrierender Bindungen wird die Bindung von [³H]-17 β -Estradiol in einer bestimmten Konzentration an zahlreiche (acht Größenordnungen) Konzentrationen einer Prüfchemikalie gemessen. Die ermittelten Daten werden dann möglichst entsprechend der Hill-Gleichung (Hill, 1910) angepasst, die die Verdrängung des Radioliganden durch einen für eine bestimmte Bindungsstelle spezifischen konkurrierenden Binder beschreibt. Anhand des Umfangs der Verdrängung des radioaktiv markierten Estradiols bei Gleichgewichtsbedingungen wird die Prüfchemikalie als Binder, Nicht-Binder oder nicht eindeutig eingestuft.

PRÜFVERFAHREN

Nachweis einer akzeptablen Leistungsfähigkeit bei Untersuchungen des hrERα-Proteins

9. Vor der regelmäßigen Durchführung der Assays zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen ist jeweils mit einer neuen Charge des hrERα nachzuweisen, dass in dem Labor, in dem der Rezeptor verwendet wird, korrekte Ergebnisse ermittelt werden. Die Leistungsfähigkeit sollte in zwei Schritten nachgewiesen werden:
- Durchführung des [³H]-17β-Estradiol-Bindungsassays zum Nachweis der Spezifität und der Sättigung für den hrERα; anhand einer nicht linearen Regressionsanalyse der ermittelten Daten (z. B. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) und des anschließenden Scatchard-Diagramms sollten die Bindungsaffinität des [³H]-17β-Estradiols (K_d) für den hrERα und die Anzahl der Rezeptoren (B_{max}) einer bestimmten hrERα-Charge dokumentiert werden;
 - Durchführung eines Assays zur Prüfung konkurrierender Bindungen mit Kontrollstoffen (Referenzöstrogen (17β-Estradiol), einem schwachen Binder (z. B. Norethynodrel oder Norethindron) und einem Nicht-Binder (Octyltriethoxysilan, OTEs)). Jedes Labor sollte eine historische Datenbank zum Nachweis der versuchs- und hrERα-Chargen-übergreifenden Konsistenz der IC₅₀-Werte und der relevanten Werte aus den Versuchen mit dem Referenzöstrogen und einem schwachen Binder aufbauen. Außerdem sollten die Parameter der Kurven der konkurrierenden Bindungen bei den Kontrollstoffen innerhalb des 95%-Konfidenzintervalls liegen (siehe Tabelle 1), das anhand von Daten von an der Validierungsstudie zu diesem Assay beteiligten Labors festgelegt wurde (2).

Tabelle 1

Leistungskriterien für das Referenzöstrogen und den schwachen Binder beim hrER-Bindungsassay des CERI

Stoff	Parameter	Mittelwert ^(a)	Standardabweichung(en)	95%-Konfidenzintervalle ^(b)	
				Obere Grenze	Untere Grenze
17β-Estradiol	Höchstwert	104,74	13,12 (70)	101,6	107,9
	Mindestwert	0,85	2,41 (70)	0,28	1,43
	Hillslope	-1,22	0,20 (70)	-1,27	-1,17
	log IC ₅₀	-8,93	0,23 (70)	-8,98	-8,87
Norethynodrel	Höchstwert	101,31	10,55 (68)	98,76	103,90
	Mindestwert	2,39	5,01 (68)	1,18	3,60
	Hillslope	-1,04	0,21 (68)	-1,09	-0,99
	log IC ₅₀	-6,19	0,40 (68)	-6,29	-6,10
Norethindron ^(c)	Höchstwert	92,27	7,79 (23)	88,90	95,63
	Mindestwert	16,52	10,59 (23)	11,94	21,10
	Hillslope	-1,18	0,32 (23)	-1,31	-1,04
	log IC ₅₀	-6,01	0,54 (23)	-6,25	-5,78

^(a) Der Mittelwert ± Standardabweichung (SD) bei der Probengröße n wurde anhand der Parameterschätzungen für die Kurvenanpassung (Hill-Gleichung mit 4 Parametern) für Prüfläufe in vier Labors im Rahmen der Validierungsstudie berechnet (siehe (2) Anlage N).

^(b) Das 95%-Konfidenzintervall dient zur Orientierung für die Akzeptanzkriterien.

^(c) In der Validierung war die Prüfung von Norethindron optional für Unteraufgabe 4 vorgesehen (siehe (2), siehe Unteraufgabe 4). Die Mittelwerte ± SD (n) wurden also anhand der Schätzungen für die Kurvenanpassung (Hill-Gleichung mit 4 Parametern) für in zwei Labors durchgeführte Kontrollprüfungen berechnet.

Der Bereich für IC₅₀ hängt von der K_d der Rezeptorzubereitung und von der Konzentration des radioaktiv markierten Liganden in den einzelnen Labors ab. Eine geeignete Anpassung des Bereichs für IC₅₀ je nach den Bedingungen bei der Durchführung des Assays ist akzeptabel.

Nachweis der Eignung des Labors

10. Siehe Nummern 17 und 18 sowie Tabelle 2 im Abschnitt „ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS“ für diese Prüfmethode. Die Assays (zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen) sollten jeweils drei unabhängige Prüfläufe (d. h. mit frischen Rezeptor-, Chemikalien- und Reagenzienverdünnungen) an unterschiedlichen Tagen jeweils mit drei Wiederholungen umfassen.

Ermittlung der Rezeptorkonzentration (hrERa)

11. Die Konzentration des aktiven Rezeptors ist je nach Charge und Lagerungsbedingungen leicht unterschiedlich. Daher sollte die Konzentration des vom Hersteller gelieferten aktiven Rezeptors bestimmt werden. Daraus ergibt sich die geeignete Konzentration des aktiven Rezeptors beim Prüflauf.
12. Unter den Bedingungen bei der konkurrierenden Bindung (d. h. 0,5 nM [³H]-Estradiol) werden Nennkonzentrationen von 0,1, 0,2, 0,4 und 0,6 nM Rezeptor einmal ohne (Gesamtbindung) und einmal mit (nicht spezifische Bindung) 1 µM nicht markiertem Estradiol inkubiert. Die spezifische Bindung wird berechnet als Differenz zwischen der Gesamtbindung und der nicht spezifischen Bindung bezogen auf die Rezeptor-Nennkonzentration in einem Diagramm dargestellt. Die Konzentration des Rezeptors, bei der sich spezifische Bindungswerte entsprechend einem Anteil von 40 % des zugesetzten radioaktiven Liganden ergeben, wird auf die entsprechende Rezeptor-Konzentration bezogen; diese Rezeptorkonzentration ist bei den Versuchen zur Ermittlung von Sättigungsbindungen und konkurrierenden Bindungen zu verwenden. Diese Anforderung wird häufig mit einer hrER-Endkonzentration von 0,2 nM erfüllt.
13. Wenn das 40%-Kriterium mehrfach nicht erfüllt werden kann, sollte der Versuchsaufbau auf mögliche Fehlerquellen geprüft werden. Dass das 40%-Kriterium nicht erfüllt werden kann, deutet möglicherweise auch darauf hin, dass die rekombinante Charge den aktiven Rezeptor nur in einem sehr geringen Anteil enthält. In diesem Fall sollte die Verwendung einer anderen Rezeptor-Charge in Betracht gezogen werden.

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

14. Acht zunehmende [³H]-17β-Estradiol-Konzentrationen sollten jeweils dreifach unter den drei folgenden Bedingungen geprüft werden (siehe Tabelle 2):
 - a. ohne nicht markiertes 17β-Estradiol und mit dem ER, um anhand einer Messung der Radioaktivität der Wells, die ausschließlich [³H]-17β-Estradiol enthalten, die Gesamtbindung zu ermitteln;
 - b. bei einer 2000-mal höheren Konzentration des nicht markierten 17β-Estradiols im Vergleich zum markierten 17β-Estradiol und zu Prüfungen mit dem ER; dadurch sollen die aktiven Bindungsstellen mit nicht markiertem 17β-Estradiol gesättigt werden, um anhand einer Messung der Radioaktivität in den Wells die nicht spezifische Bindung zu bestimmen. Verbleibendes warmes Estradiol, das Bindungen mit dem Rezeptor eingehen kann, wird als Bindung an eine nicht spezifischen Bindungsstelle betrachtet, da das kalte Estradiol in einer derart hohen Konzentration vorliegen sollte, dass es an allen verfügbaren spezifischen Bindungsstellen des Rezeptors gebunden ist;
 - c. ohne nicht markiertes 17β-Estradiol und ohne den ER (Ermittlung der Gesamt-Radioaktivität).

Zubereitung der Lösungen mit [³H]-17β-Estradiol und mit nicht markiertem 17β-Estradiol und dem hrERa

15. Aus einer Vorratslösung mit 1 µM [³H]-17β-Estradiol in DMSO wird unter Zugabe von DMSO (zur Herstellung von 200 nM) und des Assay-Puffers (zur Herstellung von 40 nM) bei Raumtemperatur eine Lösung mit einer molaren Masse von 40 nM [³H]-17β-Estradiol hergestellt. Mit dieser Lösung mit einer Konzentration von 40 nM werden mit dem Assay-Puffer bei Raumtemperatur serielle Verdünnungen von [³H]-17β-Estradiol im Bereich von 0,313 nM bis 40 nM hergestellt (siehe Zeile 12 in Tabelle 2). Um die endgültigen Assay-Konzentrationen von 0,0313-4,0 nM herzustellen, werden 10 µl dieser Lösungen in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben (siehe Tabellen 2 und 3). Die Zubereitung des Assay-Puffers, die Berechnung der Ausgangskonzentration der [³H]-17β-Estradiol-Vorratslösung und der Verdünnungen sowie die Bestimmung der Konzentrationen werden im CERI-Protokoll eingehend beschrieben (2).

16. Die nicht markierten 17 β -Estradiol-Lösungen werden aus einer 1-nM-17 β -Estradiol-Vorratslösung unter Zugabe des Assay-Puffers so verdünnt, dass sich acht zunehmende Ausgangskonzentrationen von 0,625-80 μ M ergeben. Um die endgültigen Assay-Konzentrationen von 0,0625-8 μ M herzustellen, werden 10 μ l dieser Lösungen in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte zur Messung nicht spezifischer Bindungen gegeben (siehe Tabellen 2 und 3). Die Zubereitung der nicht markierten 17 β -Estradiol-Lösungen wird eingehend im CERI-Protokoll beschrieben (2).
17. Für die Versuche ist die Rezeptorkonzentration zu verwenden, bei der sich eine spezifische Bindung von $40 \pm 10 \%$ ergibt (Nummern 12 und 13). Die hrER α -Lösung wird mit eiskaltem Assay-Puffer unmittelbar vor der Verwendung hergestellt, d. h. nachdem alle Wells zur Ermittlung der Gesamtbindung, der nicht spezifischen Bindung und der warmen Liganden vorbereitet wurden.
18. Die 96-Well-Mikrotiterplatten werden mit 2-3 Wiederholungen pro Konzentration des [3 H]-17 β -Estradiols vorbereitet, wie in Tabelle 2 dargestellt. Die Anordnung der Volumina von [3 H]-17 β -Estradiol, nicht markiertem 17 β -Estradiol, des Puffers und des Rezeptors ist Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 2

Anordnung auf der Mikrotiterplatte beim Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

	1 (*)	2 (*)	3 (*)	4 (*)	5 (*)	6 (*)	7 (*)	8 (*)	9 (*)	10	11 (**)	12 (**)
	Zur Messung der TB			Zur Messung der NSB			Zur Ermittlung nur des warmen Liganden			/	Nicht markierte E2-Verdünnungen für die Plattenreihen 4-6.	[3 H]E2-Verdünnungen für die Plattenreihen 1-9
A	0,0313 nM [3 H] E2+ ER			0,0313 nM [3 H] E2+ 0,0625 μ M E2+ ER			0,0313 nM			/	0,625 μ M	0,313 nM
B	0,0625 nM [3 H] E2+ ER			0,0625 nM [3 H] E2+ 0,125 μ M E2+ ER			0,0625 nM			/	1,25 μ M	0,625 nM
C	0,125 nM [3 H] E2+ ER			0,125 nM [3 H] E2+ 0,25 μ M E2+ ER			0,125 nM			/	2,5 μ M	1,25 nM
D	0,250 nM [3 H] E2+ ER			0,250 nM [3 H] E2+ 0,5 μ M E2+ ER			0,250 nM			/	5 μ M	2,5 nM
E	0,50 nM [3 H] E2+ ER			0,50 nM [3 H] E2+ 1 μ M E2+ ER			0,50 nM			/	10 μ M	5 nM
F	1,00 nM [3 H] E2+ ER			1,00 nM [3 H] E2+ 2 μ M E2+ ER			1,00 nM			/	20 μ M	10 nM
G	2,00 nM [3 H] E2+ ER			2,00 nM [3 H] E2+ 4 μ M E2+ ER			2,00 nM			/	40 μ M	20 nM
H	4,00 nM [3 H] E2+ ER			4,00 nM [3 H] E2+ 8 μ M E2+ ER			4,00 nM			/	80 μ M	40 nM

TB- Gesamtbindung

NSB- Nicht spezifische Bindung

[3 H] E2- [3 H]-17 β -EstradiolE2- nicht markiertes 17 β -Estradiol

(*) Die hier angegebenen Konzentrationen sind die Endkonzentrationen in den einzelnen Wells.

(**) Die Verdünnungen von nicht markiertem E2 und [3 H]E2 können auf einer anderen Platte hergestellt werden.

Tabelle 3

Volumina der Reagenzien auf der Mikrotiterplatte zur Ermittlung der Sättigungsbindung

Plattenreihe		1	2	3	4	5	6	7 (*)	8 (*)	9 (*)
Vorbereitungsschritte		TB-Wells			NSB-Wells			Nur warme Liganden		
Volumen der Bestandteile für die genannten Reaktions-Wells und Reihenfolge der Zugabe des Puffers	60 µl			50 µl			90 µl		
	... nicht markierten E2 aus Reihe 11 in Tabelle 2	-			10 µl			-		
	... [³ H]E2 aus Reihe 12 in Tabelle 2	10 µl			10 µl			10 µl		
	... hrERα	30 µl			30 µl			-		
Gesamtreaktionsvolumen		100 µl			100 µl			100 µl		
Inkubation		REAKTION NACH 2-STÜNDIGER INKUBATION						Quantifizierung der Radioaktivität unmittelbar nach der Vorbereitung Keine Inkubation		
Behandlung mit 0,4 % DCC		Ja			Ja			Nein		
Volumen 0,4 % DCC		100 µl			100 µl			-		
Filtration		Ja			Ja			Nein		
MESSUNG DER DPM										
Quantifizierung des dem Szintillationscocktail zuzusetzenden Volumens		100 µl (**)			100 µl (**)			50 µl		

(*) Wenn zur Messung der DPM ein Flüssigszintillationszähler für Mikroplatten verwendet wird, ist eine Vorbereitung nur des warmen Liganden auf der Assay-Platte, auf der sich auch die Wells zur Bestimmung von TB und NSB befinden, nicht angemessen. Die Wells, die ausschließlich den warmen Liganden enthalten, sind auf einer anderen Platte vorzubereiten.

(**) Wenn die Trennung von der DCC durch Zentrifugieren erfolgt, sind die 50 µl Überstand durch Flüssigszintillationszählung zu messen, um Verunreinigungen der DCC zu vermeiden.

19. Assay-Mikrotiterplatten zur Ermittlung der Gesamtbindung und der nicht spezifischen Bindung werden zwei Stunden bei Raumtemperatur (22-28 °C) inkubiert.

Messung des an den hrERα gebundenen [³H]-17β-Estradiols

20. Nach der 2-stündigen Inkubationszeit wird das an den hrERα gebundene [³H]-17β-Estradiol unter Zugabe von 100 µl einer eiskalten Suspension mit 0,4 % DCC zu den Wells vom freien [³H]-17β-Estradiol getrennt. Danach werden die Platten 10 Minuten auf Eis gelegt. Um das DCC zu entfernen, werden das Reaktionsgemisch und die DCC-Suspension durch Übertragung auf einen Mikrotiterplatten-Filter gefiltert. 100 µl des Filtrats werden zur Szintillationsflüssigkeit in Flüssigszintillationsfläschchen hinzugegeben, um anhand von Flüssigszintillationszählungen den Abbau pro Minute (DPM) pro Fläschchen zu ermitteln.
21. Wenn kein Mikrotiterplatten-Filter verfügbar ist, kann das DCC auch durch Zentrifugieren entfernt werden. 50 µl des Überstands des an den hrERα gebundenen [³H]-17β-Estradiols sind anschließend mit äußerster Sorgfalt zu entnehmen, damit Verunreinigungen der Wells durch Berührung mit der DCC-Lösung vermieden werden. Der Überstand wird zur Szintillationszählung verwendet.

22. Anhand der Wells, die ausschließlich den warmen Liganden enthalten, wird der Zerfall des zu den Assay-Wells hinzugegebenen [³H]-17β-Estradiols (DPM = Zerfallereignisse pro Minute) bestimmt. Die Radioaktivität wird erst nach der Zubereitung ermittelt. Die betreffenden Wells werden nicht inkubiert und nicht mit der DCC-Suspension behandelt; ihr Inhalt wird direkt in die Szintillationsflüssigkeit gegeben. Anhand der Zerfallereignisse pro Minute (DPM) wird so nachgewiesen, wieviel [³H]-17β-Estradiol jeweils in die Wells zur Ermittlung der Gesamtbindung und der nicht spezifischen Bindung gegeben wurde.

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

23. Mit dem Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird die Bindung von [³H]-17β-Estradiol einer einzelnen Konzentration bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie gemessen. Bei jedem Prüflauf sind für jede Konzentration drei gleichzeitige Replikate zu verwenden. Außerdem werden für jede zu prüfende Chemikalie drei nicht gleichzeitige Prüfläufe durchgeführt. Der Assay ist auf zwei oder mehr 96-Well-Mikrotiterplatten durchzuführen.

Kontrollen

24. Bei der Durchführung des Assays sind die Lösungsmittelkontrolle und die sonstigen Kontrollen (d. h. die Kontrollen mit dem Referenzöstrogen, dem schwachen Binder und dem Nicht-Binder) gleichzeitig zu prüfen. Bei jedem Prüflauf sollten auf jeweils einer Platte vollständige Konzentrationskurven des Referenzöstrogens und der Kontrollen (d. h. schwache Binder und Nicht-Binder) verwendet werden. Alle anderen Platten sollten Folgendes enthalten: (i) eine hohe Konzentration (maximale Verdrängung, d. h. etwa die Konzentration, bei der der radioaktiv markierte Ligand vollständig verdrängt wird) und eine mittlere Konzentration (etwa IC₅₀) sowohl von E2 als auch des schwachen Binders jeweils dreifach, (ii) eine Lösungsmittelkontrolle und einen nicht spezifischen Binder, ebenfalls jeweils dreifach. Die Verfahren für die Zubereitung des Assay-Puffers, des [³H]-17β-Estradiols, des hrERα und der Prüfchemikalienlösungen werden im CERi-Protokoll eingehend beschrieben (2).

Lösungsmittelkontrolle

25. Die Lösungsmittelkontrolle bestätigt, dass das Lösungsmittel nicht mit dem Prüfsystem reagiert und die Gesamtbindung (TB) misst. Bevorzugtes Lösungsmittel ist DMSO. Wenn die höchste Konzentration der Prüfchemikalie in DMSO nicht löslich ist, kann alternativ Ethanol verwendet werden. Die DMSO-Konzentration in den endgültigen Assay-Wells sollte 2,05 % betragen und kann auf bis zu 2,5 % erhöht werden, wenn sich die Prüfchemikalie nicht löst. DMSO-Konzentrationen über 2,5 % sollten nicht verwendet werden, da der Assay durch höhere Lösungsmittelkonzentrationen beeinträchtigt werden kann. Bei Prüfchemikalien, die in DMSO nicht löslich sind, sich aber in Ethanol lösen, kann der Assay ohne Beeinträchtigungen mit Höchstkonzentrationen von bis zu 2 % Ethanol durchgeführt werden.

Pufferkontrolle

26. Die Pufferkontrolle (PK) darf weder Lösungsmittel noch die Prüfchemikalie, jedoch alle sonstigen im Assay verwendeten Elemente enthalten. Die Ergebnisse der Pufferkontrolle werden mit der Lösungsmittelkontrolle verglichen, um sicherzustellen, dass das verwendete Lösungsmittel das Assay-System nicht beeinträchtigt.

Starker Binder (Referenzöstrogen)

27. 17β-Estradiol (CAS 50-28-2) bindet sich als endogener Ligand mit hoher Affinität an den ER Untertyp alpha. Für jeden hrERα-Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird eine Standardkurve mit nicht markiertem 17β-Estradiol erstellt, damit die Variabilität bei Durchführung des Assays in einem Labor im Laufe der Zeit beurteilt werden kann. In DMSO und im Assay-Puffer werden acht Lösungen mit nicht markiertem 17β-Estradiol mit den folgenden Endkonzentrationen in den Assay-Wells für die Erstellung der Standardkurve hergestellt: 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10^{-8,5}, 10⁻⁹, 10^{-9,5}, 10⁻¹⁰ und 10⁻¹¹ M. Die höchste Konzentration mit nicht markiertem 17β-Estradiol (1 μM) sollte als Indikator für nicht spezifische Bindungen verwendet werden. In Tabelle 4 wird diese Konzentration als „NSB“ bezeichnet, obwohl sie Teil der Standardkurve ist.

Schwacher Binder

28. Um die Empfindlichkeit der einzelnen Versuche nachzuweisen und um die Variabilität bei der Durchführung des Assays im Laufe der Zeit beurteilen zu können, sollte ein schwacher Binder (Norethynodrel (CAS 68-23-5) oder Norethindron (CAS 68-22-4)) einbezogen werden. In DMSO und im Assay-Puffer werden acht Lösungen des schwachen Binders mit den folgenden Endkonzentrationen hergestellt: 10^{-4,5}, 10^{-5,5}, 10⁻⁶, 10^{-6,5}, 10⁻⁷, 10^{-7,5}, 10⁻⁸ und 10⁻⁹ M.

Nicht-Binder

29. Als Negativkontrolle (Nicht-Binder) wird Octyltriethoxysilan (OTES, CAS 2943-75-1) verwendet. Die Negativkontrolle gewährleistet, dass mit dem Assay unter den gegebenen Bedingungen erkannt wird, wenn Prüfchemikalien sich nicht an den hrERa binden. In DMSO und im Assay-Puffer werden acht Lösungen des Nicht-Binders mit den folgenden Endkonzentrationen hergestellt: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} und 10^{-10} M. Als alternativer Nicht-Binder kann Di-n-butylphthalat (DBP, CAS 84-72-2) verwendet werden, das allerdings nur bei Konzentrationen bis zu höchstens 10^{-4} M zu prüfen ist. Die maximale Löslichkeit von DBP wurde im Assay bei einer Konzentration von 10^{-4} M festgestellt.

hrERa-Konzentration

30. Für die Versuche ist die Menge des Rezeptors zu verwenden, bei der sich eine spezifische Bindung von $40 \pm 10\%$ ergibt (Nummern 12 und 13 in Anlage 3). Die hrERa-Lösung ist unmittelbar vor der Verwendung durch Verdünnung des funktionalen hrERa in eiskaltem Assay-Puffer herzustellen.

[³H]-17β-Estradiol

31. In den Assay-Wells ist [³H]-17β-Estradiol in einer Endkonzentration von 0,5 nM zu verwenden.

Prüfchemikalien

32. Zunächst muss anhand einer Löslichkeitsprüfung die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien ermittelt und ein geeigneter Konzentrationsbereich für die Durchführung des Prüfprotokolls bestimmt werden. Die Löslichkeitsgrenze der einzelnen Prüfchemikalien wird zunächst im Lösungsmittel bestimmt und anschließend unter den Bedingungen des Assays bestätigt. Mit dem Assay sind Endkonzentrationen höchstens bis zu 1 mM zu prüfen. Der Vorversuch zur Dosisfindung wird mit einer Lösungsmittelkontrolle und mindestens 8 logarithmischen seriellen Verdünnungen beginnend mit der maximal akzeptierbaren Konzentration (z. B. 1 mM oder weniger, je nach Löslichkeitsgrenze) durchgeführt; dabei ist das Auftreten einer Trübung oder eines Niederschlags zu protokollieren (Nummer 35 in Anlage 3). Nachdem der Konzentrationsbereich für die Prüfungen ermittelt wurde, sollte eine Prüfchemikalie mit 8 im Vorversuch ermittelten logarithmischen Konzentrationen geprüft werden. Die im zweiten und im dritten Versuch geprüften Konzentrationen sind ggf. so anzupassen, dass die Konzentrations-Reaktionskurve ggf. besser charakterisiert wird.
33. Verdünnungen der Prüfchemikalien werden mit dem jeweils geeigneten Lösungsmittel hergestellt (Nummer 25 in Anlage 3). Wenn die höchste Konzentration der Prüfchemikalie weder in DMSO noch in Ethanol löslich ist und die Zugabe von weiterem Lösungsmittel dazu führen würde, dass die Lösungsmittelkonzentration im letzten Röhrchen die Akzeptanzgrenze überschreiten würde, kann die nächstgeringere Konzentration als höchste Konzentration angenommen werden. In diesem Fall kann am unteren Ende der Konzentrationsreihe eine weitere Konzentration eingefügt werden. Die übrigen Konzentrationen der Reihe bleiben unverändert.
34. Die Lösungen mit der Prüfchemikalie werden beim Einbringen in die Assay-Wells sorgfältig beobachtet, da die Prüfchemikalien nach dem Einbringen in die Assay-Wells einen Niederschlag bilden können. Die Daten aller Wells mit einem Niederschlag werden bei der Kurvenanpassung nicht berücksichtigt. Der Grund für den Ausschluss der betreffenden Wells ist zu vermerken.
35. Wenn bereits Informationen aus anderen Quellen mit einem $\log(IC_{50})$ für eine Prüfchemikalie verfügbar sind, können geometrische Verdünnungsstufen enger um den erwarteten $\log(IC_{50})$ (in 0,5 log-Einheiten) angemessen sein. Am Ende sollte ein ausreichender Abstand der Konzentrationen auf beiden Seiten von $\log(IC_{50})$ einschließlich der höchsten und der niedrigsten Konzentration erreicht sein, damit die Bindungskurve angemessen beschrieben werden kann.

Vorbereitung der Assay-Platte

36. Mit Etiketten versehene Mikrotiterplatten werden für sechs Inkubationen für die Lösungsmittelkontrolle, die höchste Konzentration des Referenzöstrogens (E2) (die auch als Indikator für die nicht spezifische Bindung (NSB) dient), die Pufferkontrolle, drei Inkubationen für jede der acht Konzentrationen der Nicht-Binder-Kontrolle (Octyltriethoxysilan), die 7 geringeren Konzentrationen des Referenzöstrogens (E2), die 8 Konzentrationen des schwachen Binders und die 8 Konzentrationen der einzelnen Prüfchemikalien (TC) vorbereitet. Ein Beispiel für die Gestaltung des Plattendiagramms für die vollständigen Konzentrationskurven des Referenzöstrogens und die Kontrollen ist Tabelle 4 zu entnehmen. Für die Prüfchemikalie werden weitere Mikrotiterplatten verwendet; diese Platten sollten Plattenkontrollen, d. h. (i) eine hohe (maximale Verdrängung) und eine mittlere Konzentration (etwa die IC_{50} -Konzentration) von E2 sowie des schwachen Binders (dreifach) und (ii) eine Lösungsmittelkontrolle (als Gesamtbindung) und eine nicht spezifische Bindung (jeweils sechsfach), umfassen (Tabelle 5). Ein Beispiel für die Anordnung auf einer Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen mit drei unbekanntem Prüfchemikalien ist Anlage 3.3 zu entnehmen. Die auf dem Arbeitsblatt und in den Tabellen 4 und 5 genannten Konzentrationen sind die Endkonzentrationen in den jeweiligen Assay-Wells. Die maximale E2-Konzentration beträgt 1×10^{-7} M. Für den schwachen Binder ist die höchste Konzentration zu verwenden, die auch für den schwachen Binder auf Platte 1 verwendet wurde. Die IC_{50} -Konzentration wird vom Labor anhand der Datenbank mit historischen Kontrollen des Labors bestimmt. Dieser Wert sollte sich in etwa mit dem in der Validierungsstudie ermittelten Wert decken (siehe Tabelle 1).

Tabelle 4

Anordnung der Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen ⁽¹⁾ ⁽²⁾, vollständige Konzentrationskurven für das Referenzöstrogen und die Kontrollen (Platte 1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Pufferkontrolle und Positivkontrolle (E2)			Schwach positiv (Norethynodrel)			Negativkontrolle (OTES)			TB und NSB		
A	Blindkontrolle (*)			1×10^{-9} M			1×10^{-10} M			TB (Lösungsmittelkontrolle) (2,05 % DMSO)		
B	E2 (1×10^{-11} M)			1×10^{-8} M			1×10^{-9} M					
C	E2 (1×10^{-10} M)			$1 \times 10^{-7,5}$ M			1×10^{-8} M			NSB (10^{-6} M E2)		
D	E2 ($1 \times 10^{-9,5}$ M)			1×10^{-7} M			1×10^{-7} M					
E	E2 (1×10^{-9} M)			$1 \times 10^{-6,5}$ M			1×10^{-6} M			Pufferkontrolle		
F	E2 ($1 \times 10^{-8,5}$ M)			1×10^{-6} M			1×10^{-5} M					
G	E2 (1×10^{-8} M)			$1 \times 10^{-5,5}$ M			1×10^{-4} M			Blindkontrolle (für warme Wells) (**)		
H	E2 (1×10^{-7} M)			$1 \times 10^{-4,5}$ M			1×10^{-3} M					

⁽¹⁾ Probe für die bei jedem Versuch mitzuführende Standard-Mikrotiterplatte.

⁽²⁾ Diese Mikrotiterplatte wird mit den für die Standards in den vorstehenden Abschnitten beschriebenen Verdünnungen auf der Verdünnungsplatte vorbereitet.

Bei diesem Beispiel wird Norethinodrel (NE) als schwacher Binder verwendet.

(*) Leer, Well nicht verwendet.

(**) Blindkontrolle bei der Inkubation nicht verwendet; Verwendung aber zur Bestätigung der insgesamt zugesetzten Radioaktivität.

Tabelle 5

Anordnung der Mikrotiterplatte für einen Assay zur Untersuchung konkurrierender Bindungen, weite Platten für Prüfchemikalien (TC) und Plattenkontrollen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Prüfchemikalie 1 (TC-1)			Prüfchemikalie 2 (TC-2)			Prüfchemikalie 3 (TC-3)			Kontrollen		
A	TC-1 (1×10^{-10} M)			TC-2 (1×10^{-10} M)			TC-3 (1×10^{-10} M)			E2 (1×10^{-7} M)		
B	TC-1 (1×10^{-9} M)			TC-2 (1×10^{-9} M)			TC-3 (1×10^{-9} M)			E2 (IC_{50})		
C	TC-1 (1×10^{-8} M)			TC-2 (1×10^{-8} M)			TC-3 (1×10^{-8} M)			NE ($1 \times 10^{-4,5}$)		
D	TC-1 (1×10^{-7} M)			TC-2 (1×10^{-7} M)			TC-3 (1×10^{-7} M)			NE (IC_{50})		
E	TC-1 (1×10^{-6} M)			TC-2 (1×10^{-6} M)			TC-3 (1×10^{-6} M)			NSB (10^{-6} M E2)		
F	TC-1 (1×10^{-5} M)			TC-2 (1×10^{-5} M)			TC-3 (1×10^{-5} M)					
G	TC-1 (1×10^{-4} M)			TC-2 (1×10^{-4} M)			TC-3 (1×10^{-4} M)			TB (Lösungsmittelkontrolle)		
H	TC-1 (1×10^{-3} M)			TC-2 (1×10^{-3} M)			TC-3 (1×10^{-3} M)					

Bei diesem Beispiel wird Norethinodrel (NE) als schwacher Binder verwendet.

Abschluss des Assays zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

37. Mit Ausnahme der Wells zur Ermittlung der Gesamtbindung und zur Prüfung der Blindkontrollen (für warme Wells) (siehe Tabelle 6) sollten in jedes Well 50 µl des Assay-Puffer:s gegeben und mit 10 µl der Lösungsmittelkontrolle, des Referenzöstrogens (E2), des schwachen Binders, des Nicht-Binders und der Prüfchemikalien bzw. mit 10 µl einer 5-nM-[³H]-17β-Estradiollösung gemischt werden. Anschließend werden 30 µl der eiskalten Rezeptorlösung zu den Platten gegeben und vorsichtig gemischt. Als letztes Reagens ist die hrERα-Lösung hinzuzugeben. Die Assay-Mikrotiterplatten sollten 2 Stunden bei Raumtemperatur (22-28 °C) inkubiert werden.

Tabelle 6

Volumina der Elemente des hrER-Assays zur Ermittlung konkurrierender Bindungen auf den Mikrotiterplatten

Vorbereitungsschritte		Wells mit Ausnahme der TB-Wells	TB-Wells	Blindkontrolle (für warme Wells)
Volumen der Bestandteile für die genannten Reaktions-Wells und Reihenfolge der Zugabe des ...	Assay-Puffers bei Raumtemperatur	50 µl	60 µl	90 µl
	nicht markierten E2, des schwachen Binders, des Nicht-Binders, des Lösungsmittels und der Prüfchemikalien (*)	10 µl	–	–
	[3H]-17β-Estradiols zur Herstellung einer Endkonzentration von 0,5 nM (d. h. 5 nM)	10 µl	10 µl	10 µl
	der ermittelten hrERα-Konzentration (Nummern 12 und 13)	30 µl	30 µl	–
Gesamtvolumen in den einzelnen Assay-Wells		100 µl	100 µl	100 µl

(*) Ordnungsgemäß so zubereitet, dass sich eine Endkonzentration im Bereich der akzeptablen Lösungsmittelkonzentration ergibt.

38. Nach der Trennung des an den hrERa gebundenen [³H]-17β-Estradiols von dem freien [³H]-17β-Estradiol durch Zugabe von 100 µl kalter DCC-Suspension zu jedem einzelnen Well wie in den Nummern 21-23 in Anlage 3 für den Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung beschrieben, wird anschließend die Bindung von [³H]-17β-Estradiol an den hrERa quantifiziert.
39. Die Wells G10-12 und H10-12 (in Tabelle 4 als Blindkontrollen (für warme Wells) gekennzeichnet) geben Aufschluss über die Zerfallsereignisse pro Minute (DPM) des markierten [³H]-Estradiols in einer Aliquote von 10 µl. Die Aliquote von 10 µl wird unmittelbar in die Szintillationsflüssigkeit gegeben.

Akzeptanzkriterien

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

40. Die spezifische Bindungskurve sollte mit zunehmenden Konzentrationen des [³H]-17β-Estradiols (soweit verwendet) ein Plateau erreichen. Dieses Plateau zeigt, dass der hrERa mit dem Liganden gesättigt wurde.
41. Die spezifische Bindung bei 0,5 nM [H]-17β-Estradiol sollte im akzeptablen Bereich von 30-50 % des Durchschnitts der insgesamt gemessenen Radioaktivität liegen, um die sich die Radioaktivität in allen Prüfläufen erhöht hat. Gelegentliche geringfügige Über- oder Unterschreitungen dieses Bereichs sind akzeptabel. Wenn Prüfläufe aber durchgängig außerhalb dieses Bereichs liegen bzw. wenn ein bestimmter Prüflauf erheblich außerhalb dieses Bereichs liegt, sollte die Proteinkonzentration angepasst und der Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung wiederholt werden.
42. Aus den Daten sollte sich ein lineares Scatchard-Diagramm ergeben.
43. Die nicht spezifische Bindung sollte nicht überhöht sein. In der Regel sollte der Wert der nicht spezifischen Bindung weniger als 35 % der Gesamtbindung betragen. Diese Grenze kann jedoch in Einzelfällen überschritten werden, wenn bei der niedrigsten Konzentration des geprüften 17β-Estradiols sehr wenige Zerfallsereignisse pro Minute gemessen werden.

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

44. Zunehmende Konzentrationen nicht markierten 17β-Estradiols sollten [³H]-17β-Estradiol aus dem Rezeptor verdrängen; die Verdrängung sollte im Einklang mit einer konkurrierenden Bindung an einer einzigen Bindungsstelle stehen.
45. Der IC₅₀-Wert des Referenzöstrogens (17β-Estradiol) sollte in etwa mit der molaren Konzentration von [³H]-17β-Estradiol zuzüglich der im Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung berechneten Dissoziationskonstante (K_d) übereinstimmen.
46. Die spezifische Gesamtbindung sollte einheitlich im akzeptablen Bereich von 40 ± 10 % liegen, wenn die gemessene durchschnittliche Konzentration, um die sich die Radioaktivität in jedem einzelnen Well erhöht hat, im Verlauf der Prüfläufe bei 0,5 nM lag. Gelegentliche geringfügige Über- oder Unterschreitungen dieses Bereichs sind akzeptabel. Wenn Prüfläufe aber durchgängig außerhalb dieses Bereichs liegen bzw. wenn ein bestimmter Prüflauf erheblich außerhalb dieses Bereichs liegt, sollte die Proteinkonzentration angepasst werden.
47. Das Lösungsmittel darf keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit oder die Reproduzierbarkeit des Assays haben. Die Ergebnisse der Lösungsmittelkontrolle werden mit der Pufferkontrolle verglichen, um sicherzustellen, dass das verwendete Lösungsmittel das Assay-System nicht beeinträchtigt. Die Ergebnisse für die Gesamtbindung (TB) und die Pufferkontrolle sollten vergleichbar sein, wenn das Lösungsmittel den Assay nicht beeinflusst.
48. Bei Prüfungen mit bis zu 10⁻³ M (OTES) bzw. 10⁻⁴ M (DBP) darf der Nicht-Binder nicht mehr als 25 % des [³H]-17β-Estradiols vom hrERa verdrängen.

49. Aufgrund von Daten der Studie zur Validierung des CERI-Bindungsassays mit hrER wurden Leistungskriterien für das Referenzöstrogen und zwei schwache Binder (z. B. Norethynodrel und Norethindron) entwickelt (Anhang N in (2)). Für den Mittelwert \pm SD (n) aller Kontrolldurchläufe in den vier an der Validierungsstudie beteiligten Labors werden 95-%-Konfidenzintervalle angegeben. 95-%-Konfidenzintervalle wurden für die Parameter zur Kurvenanpassung (Höchstwert, Mindestwert, Hillslope und $\log IC_{50}$) für das Referenzöstrogen und für schwache Binder sowie für \log_{10} RBA der schwachen Binder bezogen auf das Referenzöstrogen berechnet. Tabelle 1 enthält die erwarteten Spannen der Kurvenanpassungsparameter, die als Leistungskriterien verwendet werden können. In der Praxis kann die IC_{50} -Spanne je nach der im Versuch ermittelten K_d der Rezeptorzubereitung und der Ligandenkonzentration für den Assay leicht variieren.
50. In Anbetracht der großen Anzahl potenzieller Prüfchemikalien und der Unterschiede hinsichtlich der potenziellen Affinitäten und Ergebnisse (vollständige Kurve, Teilkurve, keine Kurvenanpassung usw.) wurden keine Leistungskriterien für die Kurvenanpassungsparameter der Prüfchemikalien entwickelt. Die Ergebnisse der einzelnen Prüfläufe sowie die Ergebnisse für die einzelnen Prüfchemikalien sind jedoch einer fachlich qualifizierten Beurteilung zu unterziehen. Um den Höchstwert der Kurve der konkurrierenden Bindungen (z. B. eine Bindungsquote von 90-100 %) eindeutig zu ermitteln, sollte ein ausreichendes Spektrum an Konzentrationen der Prüfchemikalie berücksichtigt werden. Die Variabilität zwischen Wiederholungen bei den einzelnen Konzentrationen der Prüfchemikalie sowie zwischen den drei nicht gleichzeitigen Prüfläufen sollte angemessen und wissenschaftlich vertretbar sein. Die Kontrollen der einzelnen Prüfläufe einer Prüfchemikalie sollten sich im Bereich der Messungen der für diesen CERI-Assay angegebenen Leistungen bewegen und mit historischen Kontrolldaten der jeweiligen Labors übereinstimmen.

ANALYSE DER DATEN

Assay zur Ermittlung der Sättigungsbindung

51. Gemessen werden sowohl die Gesamtbindung als auch die nicht spezifische Bindung. Aufgrund dieser Werte wird die spezifische Bindung bei zunehmenden Konzentrationen von [3H]-17 β -Estradiol unter Gleichgewichtsbedingungen ermittelt, indem die nicht spezifische Bindung von der Gesamtbindung abgezogen wird. In der grafischen Darstellung der spezifischen Bindung im Vergleich zur Konzentration von [3H]-17 β -Estradiol sollte sich bei der maximalen spezifischen Konzentration ein Plateau als Bestätigung für die erfolgte Sättigung des hrERa mit [3H]-17 β -Estradiol ergeben. Außerdem sollte in der Analyse der Daten die Bindung des [3H]-17 β -Estradiols an eine einzelne Bindungsstelle mit hoher Affinität dokumentiert werden. Die nicht spezifische Bindung, die Gesamtbindung und die spezifische Bindung sind auf einer Sättigungskurve darzustellen. Darüber hinaus sollte eine nicht lineare Regressionsanalyse (z. B. mit BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) vorgenommen werden. Die ermittelten Daten sind in einem endgültigen Scatchard-Diagramm darzustellen.
52. Bei der Analyse sind B_{max} und K_d ausschließlich anhand der Daten zur Gesamtbindung zu ermitteln. Dabei ist von einem linearen Verlauf der nicht spezifischen Bindung auszugehen. Ansonsten ist eine Begründung für eine anderweitige Vorgehensweise anzugeben. Ferner sollte eine robuste Regression zur Ermittlung der Best-Fit-Werte vorgenommen werden, sofern nicht eine Begründung für ein anderweitiges Vorgehen angegeben wird. Die gewählte Methode für die Durchführung der robusten Regression ist anzugeben. Bei der Ermittlung von B_{max} und K_d aufgrund von Daten zur Sättigungsbindung ist immer eine Korrektur aufgrund des Ligandenabbaus vorzunehmen (z. B. nach der Methode von Swillens 1995).

Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen

53. Die Kurve zur Darstellung konkurrierender Bindungen wird als spezifische Bindung von [3H]-17 β -Estradiol im Vergleich zur Konzentration (\log_{10} -Stufen) des Bindungskonkurrenten dargestellt. Die Konzentration der Prüfchemikalie, die die maximale spezifische Bindung von [3H]-17 β -Estradiol um 50 % hemmt, wird als IC_{50} -Wert bezeichnet.
54. Schätzungen der $\log(IC_{50})$ -Werte der positiven Kontrollen (z. B. Referenzöstrogen und ein schwacher Binder) sollten mit einer geeigneten Software zur nicht linearen Kurvenanpassung für eine Hill-Gleichung mit 4 Parametern (z. B. BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) vorgenommen werden. Die Höchstwerte, die Mindestwerte, die Hillslope-Werte und die $\log(IC_{50})$ -Werte sollten bei der Anpassung dieser Kurven allgemein nicht beschränkt werden. Zur Ermittlung der Best-Fit-Werte sollte eine robuste Regression vorgenommen werden, sofern nicht eine Begründung für ein anderweitiges Vorgehen angegeben wird. Eine Korrektur aufgrund des Ligandenabbaus sollte nicht vorgenommen werden. Nach der Ausgangsanalyse sollte jede einzelne Bindungskurve nochmals geprüft werden, um eine angemessene Anpassung an das Modell sicherzustellen. Die relative Bindungsaffinität (RBA) des schwachen Binders sollte als Prozentanteil von $\log(IC_{50})$ für den schwachen Binder bezogen auf $\log(IC_{50})$ für 17 β -Estradiol berechnet werden. Die Ergebnisse der Positivkontrollen und der Nicht-Binder-Kontrolle sind anhand der Kriterien für die Leistungsfähigkeit des Assays (Nummern 44-49 in Anlage 3) zu bewerten.

55. Die Daten aller Prüfchemikalien werden schrittweise analysiert, um eine angemessene Vorgehensweise und eine korrekte Einstufung der einzelnen Kurven zum konkurrierenden Bindungsverhalten sicherzustellen. Für jeden Prüflauf einer Prüfchemikalie sollte zunächst eine standardisierte Datenanalyse nach dem Verfahren vorgenommen werden, das auch zur Analyse der Kontrollen mit dem Referenzöstragen und dem schwachen Binder durchgeführt wird (Nummer 54 in Anlage 3). Nach dieser Analyse sollten die Parameter zur Kurvenanpassung fachlich geprüft werden; außerdem sollte geprüft werden, in welchem Umfang die Daten mit der erzeugten Kurve der konkurrierenden Bindungen übereinstimmen. Bei dieser fachlichen Prüfung sind die Feststellung eines konzentrationsabhängigen Rückgangs der prozentualen spezifischen Bindung von [³H]-17β-Estradiol, eine geringe Variabilität der technischen Wiederholungen bei den einzelnen Prüfchemikalienkonzentrationen und die Konsistenz der Anpassungsparameter bei den drei Prüfläufen gute Indikatoren für die ordnungsgemäße Durchführung des Assays und der Datenanalysen.

Datenauswertung

56. Sofern alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, wird eine Prüfchemikalie als Binder für den hrERα betrachtet, wenn eine Bindungskurve angepasst werden kann und der niedrigste Punkt auf der Reaktionskurve im Datenbereich bei weniger als 50 % liegt (Abbildung 1).
57. Unter der Voraussetzung, dass alle Akzeptanzkriterien erfüllt sind, gilt eine Prüfchemikalie als Nicht-Binder für den hrERα, wenn die folgenden Bedingungen gegeben sind:
- Eine Bindungskurve kann angepasst werden, und der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve innerhalb des Datenbereichs liegt über 75 %, oder
 - es kann keine Anpassung der Bindungskurve vorgenommen werden, und der niedrigste nicht korrigierte Durchschnittswert der prozentualen Bindung der Konzentrationsgruppen im Datenbereich liegt über 75 %.
58. Prüfchemikalien werden als nicht eindeutig betrachtet, wenn keine der genannten Bedingungen erfüllt ist (z. B. wenn der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve zwischen 76 und 51 % liegt).

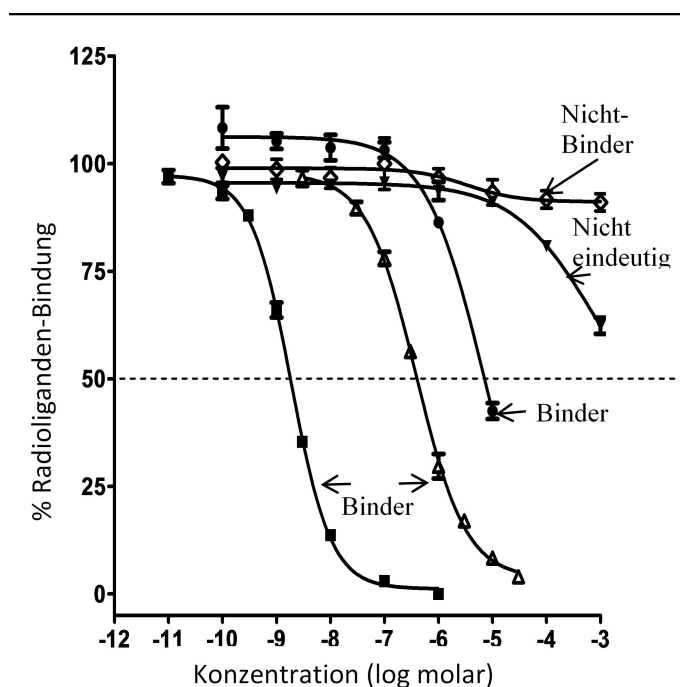
Tabelle 7

Kriterien für eine Einstufung nach der Kurve des konkurrierenden Bindungsverhaltens bei einer Prüfchemikalie

Einstufung	Kriterien
Binder ^a	Eine Bindungskurve kann angepasst werden. Der niedrigste Punkt auf der Reaktionskurve im Datenbereich liegt bei weniger als 50 %.
Nicht-Binder ^b	Wenn eine Bindungskurve angepasst werden kann: Der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve im Datenbereich liegt über 75 %. Wenn keine Bindungskurve angepasst werden kann: Der niedrigste nicht korrigierte Durchschnittswert der prozentualen Bindung der Konzentrationsgruppen im Datenbereich liegt über 75 %.
Nicht eindeutig ^c	Alle analysierbaren Prüfläufe, bei denen die Prüfchemikalie weder als Binder noch als Nicht-Binder eingestuft wird (beispielsweise wenn der niedrigste Punkt auf der angepassten Reaktionskurve zwischen 76 und 51 % liegt).

Abbildung 1

Beispiele für die Einstufung von Prüfchemikalien anhand der Kurve der konkurrierenden Bindungen



59. Mehrere in einem Labor mit einer Prüfchemikalie durchgeführte Prüfläufe werden unter Zuweisung von numerischen Werten zu den einzelnen Prüfläufen und unter Ermittlung des Durchschnitts der Prüfläufe durchgeführt (siehe Tabelle 8). Die Ergebnisse der kombinierten Prüfläufe in den einzelnen Labors werden mit der erwarteten Einstufung der einzelnen Prüfchemikalien verglichen.

Tabelle 8

Methode zur Einstufung von Prüfchemikalien aufgrund mehrerer Prüfläufe in einem Labor

Zuweisung eines Wertes zu einem Prüflauf:	
Einstufung	Numerischer Wert
Binder	2
Nicht eindeutig	1
Nicht-Binder	0
Einstufung des durchschnittlichen numerischen Werts für mehrere Prüfläufe:	
Einstufung	Numerischer Wert
Binder	Durchschnitt $\geq 1,5$
Nicht eindeutig	$0,5 \leq \text{Durchschnitt} < 1,5$
Nicht-Binder	Durchschnitt $\geq 0,5$

PRÜFBERICHT

60. Siehe Nummer 24 im Abschnitt „ELEMENTE DES hrER-BINDUNGSASSAYS“ für diese Prüfmethode.

Anlage 3.1

BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

[³H]E2: 17 β -Estradiol mit Tritium radioaktiv markiert.

Assay-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, mit 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM NaVO₃, 10 % Glycerin, 0,2 mM Leupeptin, 1 mM Dithiothreitol und 10 mg/ml Rinderseriumalbumin.

DCC: Dextranbeschichtete Aktivkohle.

E2: Nicht markiertes 17 β -Estradiol (inert).

hrER α : Humaner rekombinanter Östrogenrezeptor alpha (Ligandenbindungs-Domäne).

Prüflauf: Eine vollständige Reihe gleichzeitig zu prüfender Mikrotiterplatten-Wells, denen alle Informationen zu entnehmen sind, die zur Charakterisierung der Bindung einer Prüfchemikalie an den hrER α benötigt werden (d. h. insgesamt zum Well hinzugegebenes [³H]-17 β -Estradiol, maximale Bindung von [³H]-17 β -Estradiol an den hrER α , nicht spezifische Bindung und Gesamtbindung bei verschiedenen Konzentrationen der Prüfchemikalie). Ein Prüflauf kann bereits aus einem einzigen Well (d. h. einer einzigen Wiederholung) pro Konzentration bestehen. Da nach diesem Protokoll jedoch eine dreifache Untersuchung vorzunehmen ist, umfasst ein Prüflauf drei Wells pro Konzentration. Außerdem sind nach diesem Protokoll drei unabhängige (d. h. nicht gleichzeitige) Prüfläufe pro Chemikalie vorzunehmen.

Wiederholung (Replikat): Eines von mehreren Wells mit denselben Inhalten in denselben Konzentrationen, die in einem einzelnen Prüflauf gleichzeitig untersucht werden. Bei diesem Protokoll wird jede Konzentration der Prüfchemikalie dreimal geprüft, d. h. je Konzentration der Prüfchemikalie werden drei Wiederholungen gleichzeitig untersucht.

Anlage 3.2

ANORDNUNG DER WELLS BEIM ASSAY ZUR ERMITTLUNG KONKURRIERENDER BINDUNGEN

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	A1	1	Blindkontrolle	BK	BK1	—	—	—	—	—	—	—
S	A2	2	Blindkontrolle	BK	BK2	—	—	—	—	—	—	—
S	A3	3	Blindkontrolle	BK	BK3	—	—	—	—	—	—	—
S	B1	1	kaltes E2	S	S1	1,0E ⁻¹⁰	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹¹
S	B2	2	kaltes E2	S	S1	1,0E ⁻¹⁰	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹¹
S	B3	3	kaltes E2	S	S1	1,0E ⁻¹⁰	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹¹
S	C1	1	kaltes E2	S	S2	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
S	C2	2	kaltes E2	S	S2	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
S	C3	3	kaltes E2	S	S2	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
S	D1	1	kaltes E2	S	S3	3,16E ⁻⁹	30	50	10	10	100	3,2E ⁻¹⁰
S	D2	2	kaltes E2	S	S3	3,16E ⁻⁹	30	50	10	10	100	3,2E ⁻¹⁰

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	D3	3	kaltes E2	S	S3	3,16E ⁻⁹	30	50	10	10	100	3,2E ⁻¹⁰
S	E1	1	kaltes E2	S	S4	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
S	E2	2	kaltes E2	S	S4	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
S	E3	3	kaltes E2	S	S4	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
S	F1	1	kaltes E2	S	S5	3,16E ⁻⁸	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁹
S	F2	2	kaltes E2	S	S5	3,16E ⁻⁸	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁹
S	F3	3	kaltes E2	S	S5	3,16E ⁻⁸	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁹
S	G1	1	kaltes E2	S	S6	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
S	G2	2	kaltes E2	S	S6	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
S	G3	3	kaltes E2	S	S6	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
S	H1	1	kaltes E2	S	S7	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
S	H2	2	kaltes E2	S	S7	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
S	H3	3	kaltes E2	S	S7	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	A4	1	Norethynodrel	NE	WP1	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
S	A5	2	Norethynodrel	NE	WP1	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
S	A6	3	Norethynodrel	NE	WP1	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
S	B4	1	Norethynodrel	NE	WP2	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
S	B5	2	Norethynodrel	NE	WP2	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
S	B6	3	Norethynodrel	NE	WP2	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
S	C4	1	Norethynodrel	NE	WP3	3,16E ⁻⁷	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁸
S	C5	2	Norethynodrel	NE	WP3	3,16E ⁻⁷	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁸
S	C6	3	Norethynodrel	NE	WP3	3,16E ⁻⁷	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁸
S	D4	1	Norethynodrel	NE	WP4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
S	D5	2	Norethynodrel	NE	WP4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
S	D6	3	Norethynodrel	NE	WP4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
S	E4	1	Norethynodrel	NE	WP5	3,16E ⁻⁶	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁷

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	E5	2	Norethynodrel	NE	WP5	3,16E ⁻⁶	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁷
S	E6	3	Norethynodrel	NE	WP5	3,16E ⁻⁶	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁷
S	F4	1	Norethynodrel	NE	WP6	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
S	F5	2	Norethynodrel	NE	WP6	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
S	F6	3	Norethynodrel	NE	WP6	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
S	G4	1	Norethynodrel	NE	WP7	3,16E ⁻⁵	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁶
S	G5	2	Norethynodrel	NE	WP7	3,16E ⁻⁵	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁶
S	G6	3	Norethynodrel	NE	WP7	3,16E ⁻⁵	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁶
S	H4	1	Norethynodrel	NE	WP8	3,16E ⁻⁴	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁵
S	H5	2	Norethynodrel	NE	WP8	3,16E ⁻⁴	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁵
S	H6	3	Norethynodrel	NE	WP8	3,16E ⁻⁴	30	50	10	10	100	3,2E ⁻⁵
S	A7	1	OTES	N	OTES1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	A8	2	OTES	N	OTES1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
S	A9	3	OTES	N	OTES1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
S	B7	1	OTES	N	OTES2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
S	B8	2	OTES	N	OTES2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
S	B9	3	OTES	N	OTES2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
S	C7	1	OTES	N	OTES3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
S	C8	2	OTES	N	OTES3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
S	C9	3	OTES	N	OTES3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
S	D7	1	OTES	N	OTES4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
S	D8	2	OTES	N	OTES4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
S	D9	3	OTES	N	OTES4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
S	E7	1	OTES	N	OTES5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
S	E8	2	OTES	N	OTES5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	E9	3	OTES	N	OTES5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
S	F7	1	OTES	N	OTES6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
S	F8	2	OTES	N	OTES6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
S	F9	3	OTES	N	OTES6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
S	G7	1	OTES	N	OTES7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
S	G8	2	OTES	N	OTES7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
S	G9	3	OTES	N	OTES7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
S	H7	1	OTES	N	OTES8-DBP7	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
S	H8	2	OTES	N	OTES8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
S	H9	3	OTES	N	OTES8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
S	A10	1	Gesamtbindung	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
S	A11	2	Gesamtbindung	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
S	A12	3	Gesamtbindung	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
S	B10	4	Gesamtbindung	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	B11	5	Gesamtbindung	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
S	B12	6	Gesamtbindung	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—
S	C10	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S1	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
S	C11	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S2	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
S	C12	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S3	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
S	D10	4	kaltes E2 (hoch)	NSB	S4	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
S	D11	5	kaltes E2 (hoch)	NSB	S5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
S	D12	6	kaltes E2 (hoch)	NSB	S6	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
S	E10	1	Pufferkontrolle	PK	PK1	—	—	100	—	—	100	—
S	E11	2	Pufferkontrolle	PK	PK2	—	—	100	—	—	100	—
S	E12	3	Pufferkontrolle	PK	PK3	—	—	100	—	—	100	—
S	F10	4	Pufferkontrolle	PK	PK4	—	—	100	—	—	100	—
S	F11	5	Pufferkontrolle	PK	PK5	—	—	100	—	—	100	—
S	F12	6	Pufferkontrolle	PK	PK6	—	—	100	—	—	100	—
S	G10 (*)	1	Blindkontrolle (für warme Wells)	Warm	H1	—	90	—	10	—	100	—

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
S	G11 (*)	2	Blindkontrolle (für warme Wells)	Warm	H2	—	90	—	10	—	100	—
S	G12 (*)	3	Blindkontrolle (für warme Wells)	Warm	H3	—	90	—	10	—	100	—
S	H10 (*)	4	Blindkontrolle (für warme Wells)	Warm	H4	—	90	—	10	—	100	—
S	H11 (*)	5	Blindkontrolle (für warme Wells)	Warm	H5	—	90	—	10	—	100	—
S	H12	6	Blindkontrolle (für warme Wells)	Warm	H6	—	90	—	10	—	100	—
P1	A1	1	Unbekannt 1	U1	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A2	2	Unbekannt 1	U1	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A3	3	Unbekannt 1	U1	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	B1	1	Unbekannt 1	U1	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B2	2	Unbekannt 1	U1	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B3	3	Unbekannt 1	U1	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	C1	1	Unbekannt 1	U1	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C2	2	Unbekannt 1	U1	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C3	3	Unbekannt 1	U1	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	
P1	D1	1	Unbekannt	1	U1	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D2	2	Unbekannt	1	U1	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D3	3	Unbekannt	1	U1	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	E1	1	Unbekannt	1	U1	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E2	2	Unbekannt	1	U1	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E3	3	Unbekannt	1	U1	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F1	1	Unbekannt	1	U1	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	F2	2	Unbekannt	1	U1	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	F3	3	Unbekannt	1	U1	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	G1	1	Unbekannt	1	U1	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G2	2	Unbekannt	1	U1	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G3	3	Unbekannt	1	U1	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	H1	1	Unbekannt	1	U1	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	H2	2	Unbekannt	1	U1	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	H3	3	Unbekannt 1	U1	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	A4	1	Unbekannt 2	U2	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A5	2	Unbekannt 2	U2	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A6	3	Unbekannt 2	U2	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	B4	1	Unbekannt 2	U2	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B5	2	Unbekannt 2	U2	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B6	3	Unbekannt 2	U2	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	C4	1	Unbekannt 2	U2	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C5	2	Unbekannt 2	U2	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C6	3	Unbekannt 2	U2	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	D4	1	Unbekannt 2	U2	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D5	2	Unbekannt 2	U2	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D6	3	Unbekannt 2	U2	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	E4	1	Unbekannt 2	U2	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	E5	2	Unbekannt 2	U2	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E6	3	Unbekannt 2	U2	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F4	1	Unbekannt 2	U2	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	F5	2	Unbekannt 2	U2	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	F6	3	Unbekannt 2	U2	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	G4	1	Unbekannt 2	U2	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G5	2	Unbekannt 2	U2	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G6	3	Unbekannt 2	U2	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	H4	1	Unbekannt 2	U2	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	H5	2	Unbekannt 2	U2	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	H6	3	Unbekannt 2	U2	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	A7	1	Unbekannt 3	U3	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A8	2	Unbekannt 3	U3	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰
P1	A9	3	Unbekannt 3	U3	1	1,0E ⁻⁹	30	50	10	10	100	1,0E ⁻¹⁰

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	
P1	B7	1	Unbekannt	3	U3	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B8	2	Unbekannt	3	U3	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	B9	3	Unbekannt	3	U3	2	1,0E ⁻⁸	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁹
P1	C7	1	Unbekannt	3	U3	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C8	2	Unbekannt	3	U3	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	C9	3	Unbekannt	3	U3	3	1,0E ⁻⁷	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁸
P1	D7	1	Unbekannt	3	U3	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D8	2	Unbekannt	3	U3	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	D9	3	Unbekannt	3	U3	4	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	E7	1	Unbekannt	3	U3	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E8	2	Unbekannt	3	U3	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E9	3	Unbekannt	3	U3	5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F7	1	Unbekannt	3	U3	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	F8	2	Unbekannt	3	U3	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	
P1	F9	3	Unbekannt	3	U3	6	1,0E ⁻⁴	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁵
P1	G7	1	Unbekannt	3	U3	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G8	2	Unbekannt	3	U3	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	G9	3	Unbekannt	3	U3	7	1,0E ⁻³	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁴
P1	H7	1	Unbekannt	3	U3	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	H8	2	Unbekannt	3	U3	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	H9	3	Unbekannt	3	U3	8	1,0E ⁻²	30	50	10	10	100	1,0E ⁻³
P1	A10	1	Kontrolle (max)	E2	S	E2 _{max} 1	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	A11	2	Kontrolle (max)	E2	S	E2 _{max} 2	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	A12	3	Kontrolle (max)	E2	S	E2 _{max} 3	1,0E ⁻⁶	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁷
P1	B10	1	Kontrolle (IC ₅₀)	E2	S	E2IC ₅₀ 1	E2IC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀
P1	B11	2	Kontrolle (IC ₅₀)	E2	S	E2IC ₅₀ 2	E2IC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀
P1	B12	3	Kontrolle (IC ₅₀)	E2	S	E2IC ₅₀ 3	E2IC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	E2IC ₅₀

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	C10	1	Kontrolle NE (max)	S	Ne _{max} 1	1,0E ^{-3,5}	30	50	10	10	100	1,0E ^{-4,5}
P1	C11	2	Kontrolle NE (max)	S	Ne _{max} 2	1,0E ^{-3,5}	30	50	10	10	100	1,0E ^{-4,5}
P1	C12	3	Kontrolle NE (max)	S	Ne _{max} 3	1,0E ^{-3,5}	30	50	10	10	100	1,0E ^{-4,5}
P1	D10	1	Kontrolle NE (IC ₅₀)	S	NEIC ₅₀ 1	NEIC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	NEIC ₅₀
P1	D11	2	Kontrolle NE (IC ₅₀)	S	NEIC ₅₀ 2	NEIC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	NEIC ₅₀
P1	D12	3	Kontrolle NE (IC ₅₀)	S	NEIC ₅₀ 3	NEIC ₅₀ x10	30	50	10	10	100	NEIC ₅₀
P1	E10	1	kaltes E2 (hoch)	NSB	S1	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E11	2	kaltes E2 (hoch)	NSB	S2	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	E12	3	kaltes E2 (hoch)	NSB	S3	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F10	4	kaltes E2 (hoch)	NSB	S4	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F11	5	kaltes E2 (hoch)	NSB	S5	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶
P1	F12	6	kaltes E2 (hoch)	NSB	S6	1,0E ⁻⁵	30	50	10	10	100	1,0E ⁻⁶

Platte	Position	Replikat	Well-Typ	Well-Code	Konzentrationscode	Ausgangskonzentration des Bindungskonkurrenten (M)	hrER-Vorratslösung (µl)	Puffer-Vol. (µl)	Tracer-Volumen (warmes E2) (µl)	Volumen der Verdünnungsplatte (µl)	Endvolumen (µl)	Endkonzentration des Bindungskonkurrenten (M)
P1	G10	1	Gesamtbindung	TB	TB1	—	30	60	10	—	100	—
P1	G11	2	Gesamtbindung	TB	TB2	—	30	60	10	—	100	—
P1	G12	3	Gesamtbindung	TB	TB3	—	30	60	10	—	100	—
P1	H10	4	Gesamtbindung	TB	TB4	—	30	60	10	—	100	—
P1	H11	5	Gesamtbindung	TB	TB5	—	30	60	10	—	100	—
P1	H12	6	Gesamtbindung	TB	TB6	—	30	60	10	—	100	—

(*) Die „warmen“ Wells sind bei der Inkubation leer. Die 10 µl werden nur für die Szintillationszählung hinzugegeben.

Anlage 4

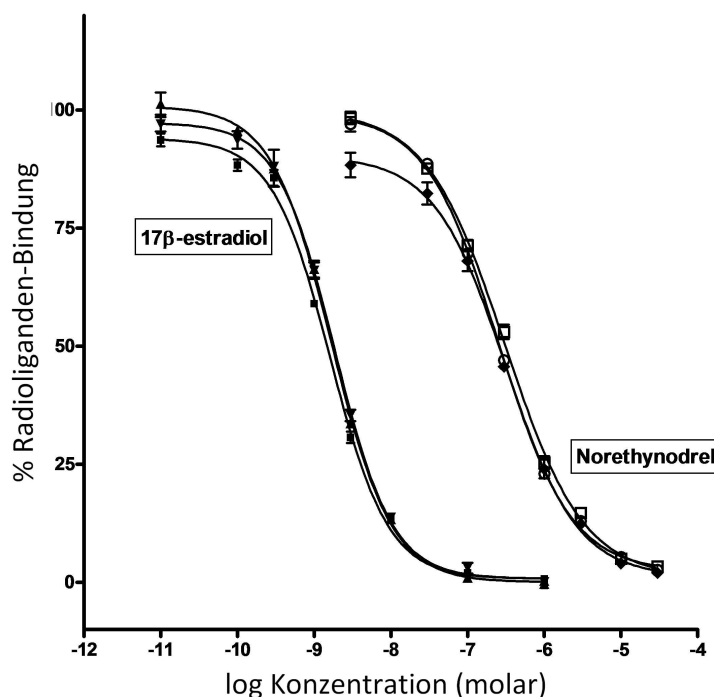
HINWEISE ZUR ANALYSE DER DATEN AUS DEM hrER-ASSAY ZUR ERMITTLUNG KONKURRIERENDER BINDUNGEN

1. Mit dem hrER α -Assay zur Ermittlung konkurrierender Bindungen wird die Bindung von [^3H]-17 β -Estradiol einer einzelnen Konzentration bei zunehmenden Konzentrationen einer Prüfchemikalie gemessen. Die Kurve zur Darstellung konkurrierender Bindungen wird als spezifische Bindung von [^3H]-17 β -Estradiol im Vergleich zur Konzentration (\log_{10} -Stufen) des Bindungskonkurrenten dargestellt. Die Konzentration der Prüfchemikalie, die die maximale spezifische Bindung von [^3H]-17 β -Estradiol um 50 % hemmt, wird als IC $_{50}$ bezeichnet.

Analyse der Daten zum Referenzöstrogen und zum schwachen Binder (1)

2. Daten aus den Prüfläufen mit den Kontrollen werden für weitere Analysen umgewandelt (prozentuale [^3H]-17 β -Estradiol-spezifische Bindung und Log-Konzentration der Kontrollchemikalie). Schätzungen der \log -(IC $_{50}$)-Werte der positiven Kontrollen (z. B. Referenzöstrogen und ein schwacher Binder) sollten mit einer geeigneten Software zur nicht linearen Kurvenanpassung für eine Hill-Gleichung mit 4 Parametern (z. B. BioSoft; GraphPad Prism) vorgenommen werden (2). Die Höchstwerte, die Mindestwerte, die Hillslope-Werte und die \log -(IC $_{50}$)-Werte brauchen bei der Anpassung dieser Kurven allgemein nicht beschränkt zu werden. Zur Ermittlung der Best-Fit-Werte sollte eine robuste Regression vorgenommen werden, sofern nicht eine Begründung für ein anderweitiges Vorgehen angegeben wird. Die gewählte Methode für die Durchführung der robusten Regression ist anzugeben. Beim FW- und beim CERI-hrER-Assay waren Korrekturen für den Ligandenabbau nicht erforderlich; solche Korrekturen können aber ggf. in Betracht gezogen werden. Nach der Ausgangsanalyse sollte jede einzelne Bindungskurve nochmals geprüft werden, um eine angemessene Anpassung an das Modell sicherzustellen. Die relative Bindungsaffinität (RBA) des schwachen Binders kann als Prozentanteil von \log (IC $_{50}$) für den schwachen Binder bezogen auf \log (IC $_{50}$) für 17 β -Estradiol berechnet werden. Die Ergebnisse der Positivkontrollen und der Nicht-Binder-Kontrolle sollten anhand von Parametern für die Leistungsfähigkeit des Assays sowie aufgrund von Akzeptanzkriterien bewertet werden. Im Zusammenhang mit dieser Prüfmethode (Nummer 20), in Anlage 2 (FW-Assay, Nummern 41-51) und in Anlage 3 (CERI-Assay, Nummern 41-51) wurden Beispiele für solche Akzeptanzkriterien genannt. Abbildung 1 enthält Beispiele aus 3 Prüfläufen mit dem Referenzöstrogen und dem schwachen Binder.

Abbildung 1

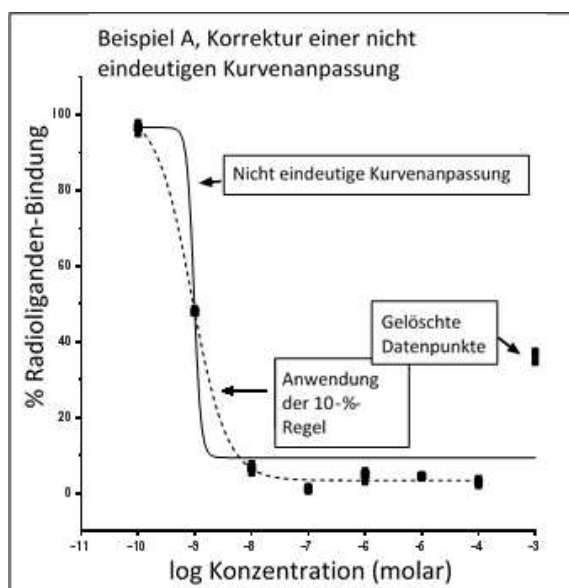
Beispiele für Kurven konkurrierender Bindungen für das Referenzöstrogen und die Kontrolle mit dem schwachen Binder

Analyse der Daten zu den Prüfchemikalien

3. Die Daten aller Prüfchemikalien werden schrittweise analysiert, um eine angemessene Vorgehensweise und eine korrekte Einstufung der einzelnen Kurven zum konkurrierenden Bindungsverhalten sicherzustellen. Für jeden Prüflauf einer Prüfchemikalie sollte zunächst eine standardisierte Datenanalyse nach dem Verfahren vorgenommen werden, das auch zur Analyse der Kontrollen mit dem Referenzöstrogen und dem schwachen Binder durchgeführt wird. Nach dieser Analyse sollten die Parameter zur Kurvenanpassung fachlich geprüft werden; außerdem sollte geprüft werden, in welchem Umfang die Daten mit der erzeugten Kurve der konkurrierenden Bindungen übereinstimmen. Bei dieser fachlichen Prüfung sind die Feststellung eines konzentrationsabhängigen Rückgangs der prozentualen spezifischen Bindung von [^3H]-17 β -Estradiol, eine geringe Variabilität der technischen Wiederholungen bei den einzelnen Chemikalienkonzentrationen und die Konsistenz der Anpassungsparameter bei den drei Prüfläufen gute Indikatoren für die ordnungsgemäße Durchführung des Assays und der Datenanalysen. Die Ergebnisse der einzelnen Prüfläufe mit einer Prüfchemikalie sollten einer fachlichen Bewertung unterzogen werden, und die zur Einstufung der einzelnen Prüfchemikalien als Binder oder als Nicht-Binder verwendeten Daten sollten wissenschaftlich fundiert sein.
4. Gelegentlich liegen möglicherweise Daten vor, die besondere Aufmerksamkeit erfordern, wenn angemessene Analysen und Auswertungen der Daten zu hrER-Bindungen sichergestellt werden sollen. In früheren Studien wurden Fälle festgestellt, in denen die Analyse und die Auswertung von Daten zur Bindung an konkurrierende Rezeptoren durch eine Zunahme der prozentualen spezifischen Bindung bei den höchsten Konzentrationen der betreffenden Prüfchemikalien erschwert werden (Abbildung 2). Dieses Problem ist hinlänglich bekannt und wurde bei der Verwendung von Protokollen für mehrere Assays zur Untersuchung konkurrierender Rezeptorbindungen deutlich (3). In diesen Fällen wird eine konzentrationsabhängige Reaktion bei niedrigeren Konzentrationen festgestellt; wenn sich die Konzentration der Prüfchemikalie jedoch der Löslichkeitsgrenze nähert, nimmt die Verdrängung von [^3H]-17 β -Estradiol nicht mehr weiter ab. In diesen Fällen deuten die Daten bei den höheren Konzentrationen darauf hin, dass die biologische Grenze des Assays erreicht ist. Häufig hängt dieses Phänomen damit zusammen, dass Chemikalien bei hohen Konzentrationen nicht mehr löslich sind und sich niederschlagen. Außerdem kann dies darauf zurückzuführen sein, dass die Kapazität der dextranbeschichteten Aktivkohle zur Bindung des ungebundenen radioaktiv markierten Liganden während des Trennverfahrens bei den höchsten Chemikalienkonzentrationen überschritten wird. Wenn die betreffenden Datenpunkte bei der Anpassung der Daten zu konkurrierenden Bindungen an eine Sigmoidkurve beibehalten werden, kann es zu Fehleinstufungen des Potenzials der jeweiligen Chemikalien für ER-Bindungen kommen (Abbildung 2). Um dies zu vermeiden, sieht das Protokoll des FW- und des CERI-Bindungsassays mit dem hrER die Möglichkeit vor, Datenpunkte aus den Analysen auszuschließen, bei denen der Mittelwert der Wiederholungen für die prozentuale [^3H]-17 β -Estradiol-spezifische Bindung um mindestens 10 % über dem Mittelwert bei einer niedrigeren Konzentration liegt. (Diese Regel wird allgemein als 10%-Regel bezeichnet.) Bei jeder Kurve kann diese Regel nur einmal angewendet werden. Außerdem ist eine Anwendung nur dann möglich, wenn Daten für mindestens 6 weitere Konzentrationen verbleiben, damit die Kurve korrekt eingestuft werden kann.

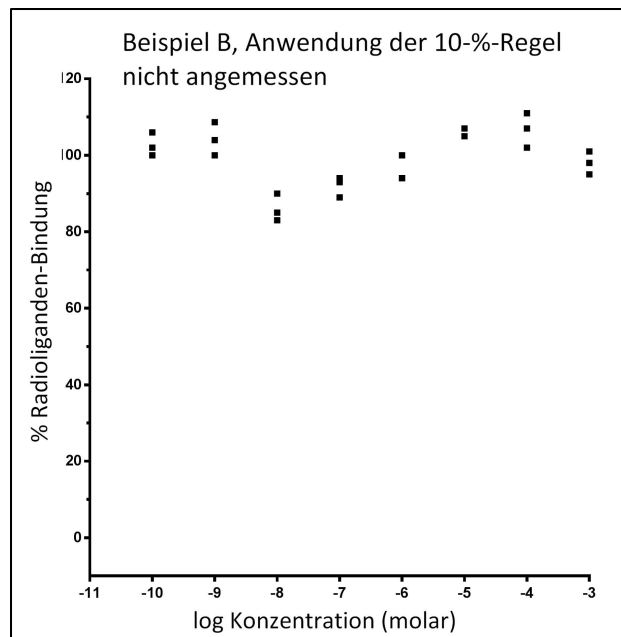
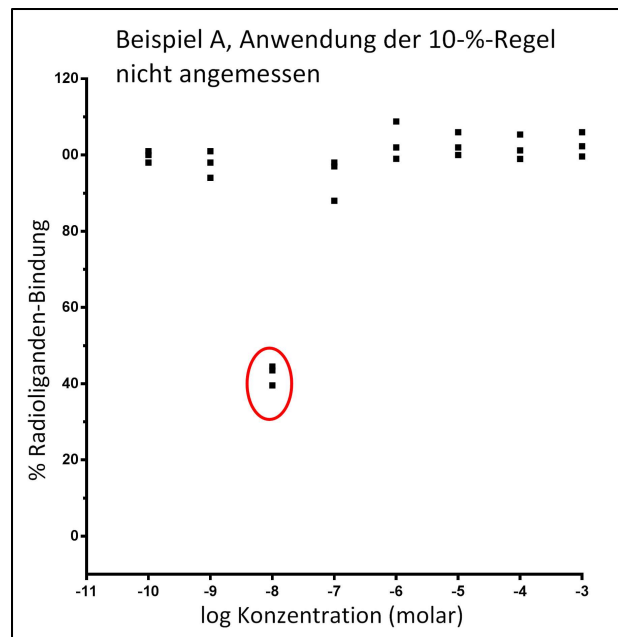
Abbildung 2

Beispiele für die Kurven konkurrierender Binder mit und ohne Anwendung der 10%-Regel



5. Ob es angemessen ist, die 10%-Regel zur Korrektur dieser Kurven anzuwenden, sollte sorgfältig geprüft werden. Die Anwendung sollte auf die Fälle beschränkt werden, in denen starke Anhaltspunkte für das Vorliegen eines hrER-Binders vorliegen. Bei der Durchführung von Versuchen für die Studie zur Validierung des FW-hrER-Bindungsassays wurde festgestellt, dass die 10%-Regel manchmal nicht beabsichtigte und unvorhergesehene Folgen hatte. Chemikalien, bei denen keine Wechselwirkung mit dem Rezeptor auftrat (d. h. echte Nicht-Binder), zeigten häufig eine Variabilität von mehr als 10 % über das Spektrum der geprüften Konzentrationen, wenn der Wert der Radioliganden-Bindung bei nahe 100 % lag. Wenn der niedrigste Wert bei einer niedrigen Konzentration auftrat, konnten nach der 10%-Regel die Daten aller höheren Konzentrationen aus der Analyse möglicherweise gelöscht werden. Allerdings konnten die Daten auch dieser Konzentrationen hilfreich für die Einstufung der betreffenden Chemikalie als Nicht-Binder sein. Abbildung 3 enthält Beispiele, bei denen die Anwendung der 10%-Regel nicht angemessen wäre.

Abbildung 3

Beispiele für Daten konkurrierender Binder, bei denen eine Anwendung der 10%-Regel nicht angemessen wäre

LITERATUR

- (1) OECD (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERA)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation für Wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris.
- (2) Motulsky, H., und Christopoulos, A. (2003). *The law of mass action*, In *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, S. 187-191. www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf.
- (3) Laws, S.C., Yavanxay, S., Cooper, R.L., Eldridge, J.C. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. *Toxicological Sci.* 94(1):46-56.