

TEXTE

123/2019

Bewertung des endokrinen Potenzials von Bisphenol Alternativstoffen in umweltrelevanten Verwendungen

Abschlussbericht

TEXTE 123/2019

Umweltforschungsplan des
Bundesministeriums für Umwelt,
Naturschutz und nukleare Sicherheit

Forschungskennzahl 3716 65 433 0
FB000076

Bewertung des endokrinen Potenzials von Bisphenol Alternativstoffen in umweltrelevanten Verwendungen

Abschlussbericht

von

Elke Eilebrecht
Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie, Bereich
Angewandte Ökologie (IME-AE), Schmallenberg

Andrea Wenzel, Matthias Teigeler
Fraunhofer IME-AE, Schmallenberg

Björn Windshügel
Fraunhofer IME, Bereich Screening Port (SP), Hamburg

Oliver Keminer, Laura Chachulski, Manfred Kohler
Fraunhofer IME-SP, Hamburg

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Impressum

Herausgeber:

Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau-Roßlau
Tel: +49 340-2103-0
Fax: +49 340-2103-2285
buergerservice@uba.de
Internet: www.umweltbundesamt.de

 /umweltbundesamt.de

 /umweltbundesamt

Durchführung der Studie:

Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (Fh-IME)
Bereich Angewandte Ökologie (IME-AE)
Auf dem Aberg 1
57392 Schmallenberg

Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (Fh-IME)
Bereich Screening Port (IME-SP)
Schnackenburgallee 114
22525 Hamburg

Abschlussdatum:

April 2018

Redaktion:

Fachgebiet IV 2.3 Chemikalien
Franziska Kaßner

Publikationen als pdf:

<http://www.umweltbundesamt.de/publikationen>

ISSN 1862-4804

Dessau-Roßlau, Oktober 2019

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

Kurzbeschreibung

Bisphenol A (BPA) wird hauptsächlich als Ausgangsstoff für die Produktion von Kunststoffen eingesetzt. Aufgrund seiner hormonähnlichen Wirkung im Menschen und anderen Organismen ist der Einsatz von BPA mit Umwelt- und Gesundheitsrisiken verbunden. Daher besteht ein großes Interesse an Verbindungen, die mit BPA vergleichbare Eigenschaften hinsichtlich des Einsatzes in der Kunststoffproduktion haben, aber das endokrine System von Organismen nicht beeinflussen. Bezüglich der molekularen Wirkweise vieler BPA-Substitutionskandidaten gibt es substantielle Datenlücken, die eine Bewertung ihres Einflusses auf die Umwelt derzeit nicht erlauben.

In dieser Studie wurde eine Literaturstudie zur Identifizierung von umweltrelevanten BPA-Substitutionskandidaten durchgeführt sowie die Wechselwirkung dieser Substanzen mit mehreren Kernrezeptoren untersucht, die für die endokrine Wirkung von BPA mitverantwortlich sein können. Durch eine Batterie von biochemischen und zellbasierten Screening-Tests konnte so ein Einfluss dieser Substanzen auf die Östrogenrezeptoren α und β sowie den Androgenrezeptor ermittelt werden.

Abstract

Bisphenol A (BPA) is mainly used as raw material in the production of plastic products. Due to its hormone-like effects in humans and other organisms, the use of BPA is closely connected to human health and environmental risks. Thus, there is high interest in substances with similar properties to BPA regarding its use in plastic products, however do not negatively influence the endocrine system of any organism. There are substantial data gaps regarding the molecular mode of action of many substitution candidates, which impede the assessment of their influence on the environment.

A literature research was performed in order to identify environmentally relevant BPA substitution candidates. Furthermore, the interaction of these substances with a set of nuclear receptors was investigated, which might be responsible for the endocrine effects of BPA. The application of a number of biochemical and cell-based screening assays, the influence of these substances on the estrogen receptors α and β , as well as of the androgen receptor was determined.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	11
Zusammenfassung	13
Summary	17
1 Hintergrund und Ziel des Projekts	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Literaturrecherche zur Substanzsuche und Substanzauswahl	23
2.1.1 Manuelle Literaturrecherche	23
2.1.2 Automatisierte Literaturrecherche	24
2.2 Experimentelle Testung	24
2.2.1 Untersuchungen zur Rezeptor-Bindung von BPA-Substitutionskandidaten	25
2.2.2 Substanz-abhängige Koaktivator-Rekrutierung	29
2.2.3 Modulation der Zielgenexpression	32
3 Ergebnis der Literaturrecherche und Substanzauswahl	36
4 Ergebnisse der in vitro-Tests der ausgewählten Substanzen	40
4.1 Ergebnisse der Fluoreszenzpolarisations-Bindungstests	40
4.1.1 Validierung des Fluoreszenzpolarisations-Testformates	40
4.1.2 Ergebnisse der Primärscreens	41
4.1.3 Dosis-Wirkungskurven für den Androgenrezeptor	42
4.1.4 Dosis-Wirkungskurven für die Östrogen-Rezeptoren α und β	43
4.2 Substanz-abhängige Koaktivator-Rekrutierung	46
4.2.1 Androgen Rezeptor Koaktivator - Agonist-Modus	46
4.2.2 Androgen Rezeptor Koaktivator - Antagonist-Modus	48
4.2.3 Östrogen Rezeptor α Koaktivator-Rekrutierungstest - Agonist-Modus	49
4.2.4 Östrogen Rezeptor α Koaktivator-Rekrutierungstest - Antagonisten-Modus	51
4.2.5 Östrogen Rezeptor β Koaktivator-Rekrutierungstest – Agonist-Modus	53
4.2.6 Östrogen Rezeptor β Koaktivator-Rekrutierungstest - Antagonist-Modus	54
4.3 Substanzinduzierte Modulation der Zielgenexpression	56
4.3.1 Östrogen Rezeptor α Transaktivierungstest	57
4.3.2 Östrogen Rezeptor β Transaktivierungstest	59
4.3.3 Androgen Rezeptor Transaktivierungstest	61
5 Beurteilung des endokrinen Gefahrenpotentials der Alternativsubstanzen	62
6 Annex 1	64

7 Quellenverzeichnis.....85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Screenshot zur Patentrecherche über DEPATISnet.....	24
Abbildung 2:	Prinzip des Fluoreszenz-Polarisations-Rezeptor-Liganden Bindungstests (nach Lifetechnologies, 2014; Reproduktion mit freundlicher Genehmigung des Urhebers).....	26
Abbildung 3:	Mikrotiterplatten Layout für Fluoreszenz-Polarisations-Tests mit essentiellen Kontrollen zur Bestimmung a) der Hintergrund-Fluoreszenz, b) des Assay-Maximums und c) des Assay-Minimums..	28
Abbildung 4:	Prinzip des Koaktivator-Rekrutierungstests (im Agonisten-Modus) (Lifetechnologies, 2014b; Reproduktion mit freundlicher Genehmigung des Urhebers).....	30
Abbildung 5:	Mikrotiterplatten-Layout für die Testung von BPA-Alternativen im AR Koaktivator-Rekrutierungstest (Agonist-Modus)	31
Abbildung 6:	Prinzip der GeneBLazer FRET-Detektion (mit freundlicher Genehmigung des Urhebers).....	33
Abbildung 7:	Mikrotiterplatten-Layout für den GeneBLazer Östrogen Rezeptor α und $-\beta$ Test (Agonist-Modus)	34
Abbildung 8:	Dosis-Wirkungskurven von Testosteron, Bisphenol A (BPA), Bisphenol FL (BPFL) und DMT im Androgen Rezeptor Fluoreszenz-Polarisations-Testsystem	43
Abbildung 9:	Dosis-Wirkungskurven von Östradiol, Bisphenol A, 4,4'-Thiodipenol (TDP) und Bisphenol Z im Östrogenrezeptor α Fluoreszenz-Polarisations-Testsystem	44
Abbildung 10:	Androgen Rezeptor Rekrutierungsassay. Konzentrationsabhängige Induktion der Bindung des Koaktivator-Peptids durch den Referenz-Agonisten Testosteron.....	46
Abbildung 11:	Androgen Rezeptor Koaktivator-Rekrutierungstest	47
Abbildung 12:	Androgen Rezeptor Koaktivator-Rekrutierungstest im Antagonisten-Modus	48
Abbildung 13:	Östrogen Rezeptor α Rekrutierungsassay	49
Abbildung 14:	Östrogen Rezeptor α Koaktivator-Rekrutierungstest.....	50
Abbildung 15:	Östrogen Rezeptor α Koaktivator-Rekrutierungstest im Antagonisten-Modus.....	51
Abbildung 16:	Östrogen Rezeptor α Koaktivator-Rekrutierungstest im Antagonisten-Modus.....	52
Abbildung 17:	Östrogen Rezeptor β Koaktivator-Rekrutierungstest.....	53
Abbildung 18:	Östrogen Rezeptor β Koaktivator-Rekrutierungstest.....	53
Abbildung 19:	Östrogen Rezeptor β Koaktivator-Rekrutierungstest im Antagonisten-Modus.....	55
Abbildung 20:	Östrogen Rezeptor β Koaktivator-Rekrutierungstest - Antagonisten-Modus.....	55

Abbildung 21:	Dosis-Wirkungskurven im GeneBLazer DA Östrogen Rezeptor α Test	57
Abbildung 22:	Dosis-Wirkungskurven GeneBLazer DA Östrogen Rezeptor A Test (alle Testsubstanzen).....	58
Abbildung 23:	Dosis-Wirkungskurven im GeneBLazer DA Östrogen Rezeptor β Test	59
Abbildung 24:	Dosis-Wirkungskurven GeneBLazer DA Östrogen Rezeptor β Test (alle Testsubstanzen).....	60
Abbildung 25:	Dosis-Wirkungskurven aus dem Androgen Rezeptor Transaktivierungstest	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Beispiel für eine Suchabfrage zur Identifizierung von Alternativsubstanzen in der Patentdatenbank DEPATISnet.....	23
Tabelle 2:	Fluoreszenz-Polarisations-Testsysteme für die Untersuchung der Bindungseigenschaften von BPA-Alternativen.....	27
Tabelle 3:	PolarScreen™ Testparameter.....	28
Tabelle 4:	LanthaScreen TR-FRET NR Coactivator Assay Fluoreszenz-Polarisations-Testsysteme für die Untersuchung der Bindungseigenschaften von BPA-Alternativen.....	30
Tabelle 5:	LanthaScreen™ Assay-Konditionen.....	31
Tabelle 6:	Anregung und Emissions-Einstellungen zur Messung der GeneBLazer FRET Signale (angepasst nach Angaben des Herstellers, Invitrogen 2009).....	34
Tabelle 7:	Beispiel für eine automatisierte Suchabfrage zur Identifizierung von Alternativsubstanzen (Search Query3).....	36
Tabelle 8:	Beispiel für eine automatisierte Suchabfrage zum Verwendungszweck (Search Query1).....	37
Tabelle 9:	Interpretation des Z-Faktors (nach (Zhang et al. 1999)).....	40
Tabelle 10:	Ergebnisse der Testsystem-Validierung nach dem Primärscreen	40
Tabelle 11:	Ergebnisse der Ligandenbindungstests für alle BPA-Substitutionskandidaten und Kontrollsubstanzen bei einer Substanzkonzentration von 10 µM.....	41
Tabelle 12:	Überblick über die Ergebnisse aus den konzentrationsabhängigen Liganden-Bindetests des FP-Androgenrezeptor Ligandenbindungstests.....	43
Tabelle 13:	Übersicht über die Ergebnisse der konzentrationsabhängigen Liganden-Bindetests an die Östrogen Rezeptoren α und β	45
Tabelle 14:	EC ₅₀ - und AUC-Werte für BPA-Alternativen aus dem AR Koaktivator-Rekrutierungstest im Agonisten-Modus.....	47
Tabelle 15:	Ergebnisse des AR Koaktivator-Rekrutierungstests (EC ₅₀ , AUC- und relative AUC).....	49
Tabelle 16:	EC ₅₀ - und AUC-Werte für BPA-Alternativen aus dem ER α Koaktivator-Rekrutierungstest im Agonisten-Modus.....	51
Tabelle 17:	IC ₅₀ - und AUC-Werte für BPA-Alternativen aus dem ER α Koaktivator-Rekrutierungstest im Antagonisten-Modus	52
Tabelle 18:	IC ₅₀ - und AUC-Werte für BPA-Alternativen aus dem ER β Koaktivator-Rekrutierungstest im Agonisten-Modus.....	54
Tabelle 19:	IC ₅₀ - und AUC-Werte für BPA-Alternativen aus dem ER β Koaktivator-Rekrutierungstest im Antagonisten-Modus	56
Tabelle 20:	Ergebnisse des GeneBLazer Östrogen Rezeptor A Tests.....	57

Tabelle 21:	Ergebnisse des GeneBLAzer Östrogen Rezeptor β Tests	59
Tabelle 22:	Ergebnisse des Androgen Rezeptor Transaktivierungstest	61
Tabelle 23:	Vollständige Liste der potentiellen BPA-Alternativstoffe	64
Tabelle 24:	Liste der umweltrelevanten BPA-Alternativen	77
Tabelle 25:	Liste der getesteten Substanzen	83

Abkürzungsverzeichnis

API	Anpassbarkeit an verschiedene Programmierschnittstellen
AR	Androgenrezeptor
AUC	Area under the curve
BPA	Bisphenol A
BPS	Bisphenol S
CAS	Chemical Abstracts Service
CPA	Cyproterone Acetate
DA	Division arrested
DEPATISnet	Deutsches Patentinformationssystem im Internet
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EFSA	European Food Safety Authority
Ems.	Emission
EPMC	European PubMed Central
ERα	Östrogenrezeptor α
ERβ	Östrogenrezeptor β
Exc.	Excitation
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FP	Fluoreszenz-Polarisation
FRET	Förster-Resonanz Energie Transfer
GST	Glutathion-S-Transferase
HEK	Human Embryonic Kidney
HPG	Hypothalamic Pituitary Gonadal
HPT	Hypothalamic Pituitary Thyroidal
HTS	High Throughput Screening
IC₅₀	Mittlere Inhibitionskonzentration
KNIME	Konstanz Information Miner
LBD	Ligand binding domain
mP	milli-Polarization
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA)
NR	Nuclear receptor
OECD	Organization for Economic Cooperative Development
PMT	Photomultiplier tube

PubMed	Public medicine data base
RBA	Relative Bindungsaffinität
TR-FRET	Zeitaufgelöste Fluorometrie kombiniert mit Förster-Resonanz Energie Transfer
UAS	Upstream activator sequence
UBA	Umweltbundesamt
VTG	Vitellogenin

Zusammenfassung

Einleitung

Bisphenol A (BPA) wird als Härtungsmittel für Polycarbonate und zur Herstellung von Epoxidharzen eingesetzt. Zusätzlich findet BPA derzeit als Farbentwicklerkomponente in Thermopapier Verwendung. Die hormonelle Wirkung von BPA konnte bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen werden. Im Menschen und anderen Vertebraten sind Schädigungen des Reproduktionssystems und der Entwicklung in zahlreichen Studien nachgewiesen worden.

Da BPA in den unterschiedlichsten Produkten Verwendung findet, ist eine substantielle Exposition des Menschen und der Umwelt gegeben. Die Hauptexpositionsrouten für den Menschen sind die Verwendungen in Plastikprodukten wie Flaschen, Tischwaren, Kochgeschirr oder Lebensmittelverpackungen. In die Umwelt gelangt BPA hauptsächlich durch Auswaschungen von BPA-haltigen Produkten, auch abseits der Lebensmittel- und Verpackungsindustrie. Vor allem die Verwendung von BPA in Thermopapier ist kritisch zu betrachten, da dieses in großen Mengen anfällt und BPA durch seine Funktion als Farbentwickler dort in freier, monomerer Form eingesetzt wird.

Aufgrund der hohen Eintragsmengen, ubiquitärer Eintragswege und erwiesenermaßen reproduktions- und entwicklungstoxischer Wirkung wird die Produktion und Nutzung von BPA bereits vielerorts für einzelne Verwendungen reguliert. Sowohl die Bedenken der Bevölkerung, als auch die Regulierung durch die Behörden führt zu der forcierten Entwicklung und Produktion von Alternativstoffen. Substanzen mit ähnlichen Eigenschaften wie zum Beispiel Bisphenol S (BPS) werden bereits in der Herstellung von Polycarbonat-Kunststoffen und Epoxidharzen eingesetzt. Durch die gesteigerte Verwendung in diesen Anwendungen kommt auch BPS bereits in geringen, aber doch relevanten Konzentrationen in der Umwelt vor. Inzwischen liegen auch für BPS Hinweise auf eine endokrine Wirkung vor, allerdings ist aufgrund der geringen Datenlage eine Risikobewertung schwierig. Eine unkritische Wirkung auf das endokrine System wurde bislang weder für BPS noch für andere BPA-Analoga nachgewiesen. Somit ist die Suche nach einer unbedenklichen BPA-Alternative noch nicht abgeschlossen. Als vielversprechend gilt z.B. die Phenol-freie Substanz Pergafast® 201, für die bislang keine östrogene Aktivität nachgewiesen wurde.

Ziel der vorliegenden Studie war die Identifizierung von Substitutionskandidaten für BPA und BPA-Analoga sowie deren Beurteilung hinsichtlich des endokrinen Potentials. Hierfür wurde zunächst eine Literaturrecherche zur Identifizierung von umweltrelevanten BPA-Substitutionskandidaten durchgeführt. Anschließend wurde die Wechselwirkung dieser Substanzen mit mehreren Kernrezeptoren untersucht, die für die endokrine Wirkung von BPA mitverantwortlich sein können. Durch eine Batterie von biochemischen und zellbasierten Screening-Tests konnte so ein Einfluss dieser Substanzen auf die Östrogenrezeptoren α und β sowie den Androgenrezeptor ermittelt werden.

Material und Methoden

Literaturrecherche

Es wurde sowohl eine manuelle als auch eine semi-automatische Literaturrecherche durchgeführt. Bei der manuellen Suchabfrage erfolgte die Abfrage hauptsächlich über öffentliche Datenbanken wie PubMed, ScienceDirect oder Scopus. Weiterhin wurde eine manuelle Recherche in der Patentdatenbank DEPATISnet durchgeführt. Aus den Suchabfragen wurden Informationen wie der Name der Alternativsubstanz (Trivialname, chemischer Name), die CAS-Nummer sowie Informationen zur möglichen Anwendung und Umweltrelevanz extrahiert.

Um sich wiederholende Anfragen bei unterschiedlichen Literaturportalen und die Dokumentation der Ergebnisse zu unterstützen, erfolgte parallel eine automatisierte Literaturrecherche. Mithilfe des

Workflow-Programms KNIME (Konstanz Information Miner) wurde eine automatische Abfrage der Suchbegriffe bei den Literaturrechercheportalen European PubMed Central (EPMC), SCOPUS und ScienceDirect realisiert, die dafür eine Programmierschnittstelle bieten.

Experimentelle Testung

Zur Bewertung des endokrinen Potentials der selektierten Substanzen wurde eine aufeinander aufbauende Kaskade biochemischer und zell-basierter Testsysteme etabliert. Hierzu wurden validierte und kommerziell erhältliche Testsysteme ausgewählt, die folgende Testformate abdecken: kompetitive Rezeptor-Liganden-Bindungstests, Koaktivator-Rekrutierungstests und zellbasierte Reporter-Gen-Testsysteme.

Für den Nachweis der Rezeptor-Liganden-Bindung wurden Fluoreszenz-Polarisations (FP)-Tests für den Androgenrezeptor (AR) sowie für den Östrogenrezeptor α und $-\beta$ (ER α und $-\beta$) verwendet. Für die anschließende Untersuchung der liganden-abhängigen Koaktivator-Rekrutierung wurden TR-FRET Testsysteme herangezogen und sowohl im Agonisten- als auch Antagonisten-Modus durchgeführt.

Um das endokrine Potential auf zellulärer Ebene nachweisen zu können, wurden für den Östrogen-Rezeptor- α und $-\beta$ Transaktivierungs-(Reporter)-Assays mit einer stabil transfizierten Säugetierzelllinie (HEK293T) durchgeführt, bei der eine Rezeptoraktivierung durch die Expression und Aktivität des Enzyms β -Lactamase nachweisbar ist. Für den Androgen-Rezeptor wurde ein Reporter-Gen-Testsystem genutzt, bei dem HEK293T Zellen transient mit einem AR-Reporter- und einem Kontroll-Plasmid transfiziert werden, welche für zwei Luciferase-Enzyme (Firefly- bzw. Renilla) codieren (Dual-Luciferase Reporter). Beide Testformate sind prinzipiell im Agonisten- und Antagonisten-Format durchführbar.

Ergebnisse und Diskussion

Literaturrecherche

Die Suche nach BPA-Alternativstoffen beruhte auf einer gestuften Auswahlstrategie und berücksichtigte unterschiedliche Kriterien. Zunächst wurden mithilfe der manuellen Suche über PubMed und andere wissenschaftliche Suchmaschinen sowie der automatisierten Suche und der Patentsuche über die Patentdatenbank (DEPATISnet) Alternativsubstanzen zu BPA identifiziert. Diese Vorgehensweise resultierte in 93 identifizierten Alternativsubstanzen, die in Naturstoffe, Phenol-freie Substanzen, Bisphenol-freie Substanzen und BPA-freie Substanzen eingeteilt werden können.

Der folgende Schritt der Literaturrecherche wurde auf dieser Auswahl aufgebaut. Die Anwendungsgebiete der identifizierten Substanzen wurden in die Kategorien „umweltrelevant“ und „nicht umweltrelevant“ eingeordnet. Dazu wurde zunächst definiert, welche Anwendung als umweltrelevant eingeordnet wird. Dazu gehören z.B. Verwendungen in Thermopapier, in Epoxidharzen für Außenanwendungen, Wasserleitungen oder Anti-Foaling Agenzien. Auf diesen Auswahlkriterien wurden 44 Substanzen identifiziert, deren Anwendung potentiell umweltrelevant ist.

Im letzten Schritt der Literaturrecherche sollten alle vorhandenen Informationen zum endokrinen Potential der 44 potentiell umweltrelevanten BPA-Alternativen ermittelt werden, um eventuelle Datenlücken zu identifizieren. Diese Recherche ergab, dass für 23 der Substanzen keine Information vorlag. Für 15 Substanzen wurde bereits ein endokrines Potential beschrieben. Die restlichen Substanzen waren in den in der Literatur beschriebenen Tests endokrin unwirksam.

Da die Testung der Substanzen im Hochdurchsatz durchgeführt worden ist, wurde vereinbart, aus den umweltrelevanten Alternativen alle käuflich erwerblichen Substanzen zu testen. Als Positiv-Kontrolle wurde BPA mitgeführt. Zusätzlich wurde die als unbedenklich ermittelte Substanzen Pergafast®201 mitgeführt, um auch in den in diesem Projekt durchgeführten Untersuchungen eine aus endokriner

Sichtweise sichere Alternative zu testen. Es wurden insgesamt 26 Substanzen aus der Liste der umweltrelevanten Alternativen bestellt. Zusätzlich wurden drei Substanzen bestellt, die in der Literaturrecherche nicht identifiziert worden sind, aber dem Auftraggeber als Alternativsubstanzen bekannt sind.

Experimentelle Testung

Initial wurden alle Testsubstanzen in drei Rezeptor-Liganden-Bindungstest (AR, ER α und ER β) bei einer Konzentration von 10 μ M getestet. Alle Substanzen, die eine relative Inhibition von ≥ 50 % bewirkten, wurden im gleichen Assay-System auf eine Dosis-Wirkungsbeziehung überprüft.

Im AR-Bindungstest wurden BPA und 14 Alternativsubstanzen als aktiv identifiziert: Bisphenol-FL > Biphenyl-4-ol > TMBPA, HPP > BPZ > BPC > BPTMC > DMT, Bisphenol AP > 4,4'-Thiodiphenol, BPF-para > Bisphenol PH > TGSA > PHBB > BPA. Hiervon zeigten Bisphenol-FL und Biphenyl-4-ol IC₅₀-Werte im sub-mikromolaren Bereich.

Mittels des ER α Bindungstest konnte BPA und weitere 10 Alternativ-Substanzen als Rezeptor-Binder identifiziert werden: BPZ, 4,4'-Thiodiphenol, BPF-para, PHBB, BPTMC, Bisphenol-AP, BPC, Biphenyl-4-ol, HPP, DD-70. Die ermittelten IC₅₀-Werte von BPZ, BPA und 4,4'-Thiodiphenol lagen im sub-mikromolaren Bereich. Alle anderen Substanzen zeigten IC₅₀-Werte $\geq 1,8$ μ M.

Im ER β -Bindungstest wurden BPA und 9 Alternativsubstanzen als Rezeptor-bindend identifiziert: BPA > Biphenyl-4-ol > BPTMC > 4,4'-Thiodiphenol > BPZ > BPC > BPF-para > BPS > CHDM > PHBB. In diesem Assay war BPA die potenteste Substanz (IC₅₀ = 0,25 μ M).

Da die Rezeptor-Liganden-Bindungstests keine Aussage über den Wirkmechanismus zulassen, wurden die aktiven Substanzen und einige negativ getestete Verbindungen im Substanz-abhängigen **Koaktivator-Rekrutierungstest** sowohl im Agonisten- als auch im Antagonisten-Modus getestet.

Im **AR Koaktivator-Rekrutierungstest** konnte im Agonisten-Modus für keine der Testsubstanzen eine EC₅₀ in einer physiologisch relevanten Konzentration ermittelt werden. Für Biphenyl-4-ol, BPA und BP-FL weisen die Kurvenverläufe jedoch auf eine geringe Rekrutierung des Koaktivator-Peptids bei Konzentrationen ≥ 10 μ M hin. Im Antagonisten-Modus konnte für die Kontrollsubstanz Cyproteronacetat die bereits bekannte inhibitorische Wirkung gezeigt werden, jedoch war weder BPA noch eine der Testsubstanzen aktiv.

Im **ER α -Koaktivator-Rekrutierungstest** waren im Agonisten-Modus 4,4'-Thiodiphenol, BPF-para, BPA, Bisphenol AP, BPC sowie BPZ potente Agonisten, die bei Konzentrationen < 10 nM eine Koaktivator-Rekrutierung bewirkten. Im Antagonisten-Modus war hingegen außer der Kontrollsubstanz (4-Hydroxytamoxifen) keine Substanz aktiv. Auch im **ER β -Koaktivator-Rekrutierungstest** wurden im Agonisten-Modus einige potente Substanzen identifiziert: BPA, Biphenyl-4-ol, BPTMC (EC₅₀ < 10 nM). Weitere aktive Substanzen waren BPZ und 4,4'-Thiodiphenol. Im Antagonisten-Modus war keine der Testsubstanzen aktiv.

Zum Nachweis zellbasierter Modulation der Zielgenexpression wurden einige Substanzen selektiert, die in den vorhergehenden Tests aktiv waren: BPA, BPZ, Biphenyl-4-ol, BPTMC, PHBB, 4,4'-Thiodiphenol, BPS, BPC, BPF. Als potentiell inaktive Substanz wurde Pergafast mit eingeschlossen.

Im ER α -Transaktivierungstest waren BPA > BPZ > 4,4'-Thiodiphenol potente Agonisten, die bei subnanomolaren Konzentrationen aktiv waren. Schwache Aktivität mit teilweise atypischem Kurvenverlauf zeigten BPTMC, BPC, BPS, BPF und Biphenyl-4-ol. Pergafast® 201 war in diesem Test inaktiv.

Mittels ER β -Transaktivierungstest wurde für keine der Testsubstanzen eine Aktivierung der Genexpression bei physiologisch relevanten Konzentrationen nachgewiesen. Bei Konzentrationen von > 10 μ M zeigten jedoch folgende Substanzen eine Transaktivierung: 4,4'-Thiodiphenol, BPF, BPS, Biphenyl-4-ol, PHBB und BPA.

Im Androgen-Rezeptor-Transaktivierungstest induzierte lediglich der natürliche Agonist Testosteron die Genexpression. Sowohl BPA als auch die Substitutionskandidaten waren in diesem Testsystem ohne Wirkung.

Aufgrund der negativen Ergebnisse aus den Koaktivator-Rekrutierungstests im Antagonisten-Modus wurden keine Transaktivierungs-Tests im Antagonisten-Modus durchgeführt.

Der Vergleich der Aktivität von BPA in den hier durchgeführten Tests mit den Daten, die für Fische und Amphibien in der Literatur vorliegen, zeigt große Übereinstimmungen. In den hier beschriebenen Tests zeigte BPA sowohl in dem Fluoreszenzpolarisationstest, im Koaktivator-Rekrutierungstest und im Transaktivierungstest für den Östrogenrezeptor α ein hohes agonistisches Potential. Im Review von Mathieu-Denoncourt et al. (2015) sind die Effekte von BPA auf Reproduktion und Geschlechterverhältnis in Fischen und Amphibien detailliert dargestellt. Analog zu den hier erhobenen Daten wird deutlich, dass BPA auch in Fisch- und Amphibienspezies hauptsächlich den Östrogenrezeptor aktiviert. So wird zum Beispiel in *Xenopus laevis* die Genexpression von Östrogenrezeptor-regulierten Genen wie dem $ER\alpha$, der Aromatase und des Eidotter-Vorläuferproteins Vitellogenin aktiviert. Einen Anstieg der Vitellogenin-Expression wurde auch in unterschiedlichen Fischarten nachgewiesen, wie zum Beispiel im Schwertfisch, der Regenbogenforelle, dem Zebrafisch und der Dickkopfelritze. Mathieu-Denoncourt et al. (2015) beschreibt es als allgemeinen Konsensus, dass die endokrine Aktivität von BPA in Fischen und Amphibien, in Übereinstimmung zu Daten in Säugern, auf der agonistischen Wirkung auf den $ER\alpha$ beruht. Auch ein Einfluss von BPA auf das Geschlechterverhältnis bei Fischen und Amphibien wird der Bindung des BPA an den Östrogenrezeptor und einer daraus resultierenden Steigerung der Östrogenrezeptor-Genexpression zugeschrieben.

Summary

Introduction

Bisphenol A (BPA) is used as curing agent for polycarbonates and for the production of epoxy resins. Furthermore, BPA is currently applied as developer in thermal paper. The endocrine potential of BPA is already demonstrated in a number of studies, e.g., in humans and other vertebrates, with adverse effects on reproduction and development.

As BPA is found in a diverse range of applications, a substantial exposure of human and environment can be assumed. The main exposure routes to humans are applications in plastic products like bottles, tableware, cookware, or food containers. The main exposure routes for the environment are wash-offs from BPA-containing products besides the food- and packaging industry. The application in thermal paper is critical, as thermal paper is produced in high tonnages and BPA as developer is applied in its monomeric form.

Due to its high entry quantity, its ubiquitous entry routes and its demonstrated reproduction- and developmental toxicity, the production and use of BPA is regulated in some countries and for single applications. The concerns of the general public as well as the regulation by authorities drive the development and production of alternative substances. Substances with similar properties like bisphenol S (BPS) for example are already used for the production of polycarbonate plastics and epoxy resins. Due to this application, BPS is already found in the environment in low, however relevant concentrations. Meanwhile, there are indications that BPS also has an endocrine potential, however, due to the low number of available data a hazard assessment is difficult. Neither for BPS nor for any other BPA analogue, a non-critical effect on the endocrine system is proven. Thus, the search for a safe alternative for BPA is still ongoing. Promising is for example the phenol-free substance Pergafast®201. So far, no estrogenic activity for this alternative was demonstrated.

The goal of the present study was the identification of substitution candidates for BPA and BPA analogues and the evaluation of these candidates regarding their endocrine potential. Initially, a literature research was performed, with the aim to identify environmentally relevant BPA substitution candidates. Following, the interaction of these substances with a set of nuclear receptors, which might be responsible for the endocrine effects of BPA, was determined. Finally, the influence of these substances on the estrogen receptors α and β , as well as on the androgen receptor was investigated with of a set of biochemical and cellular screening assays.

Materials and methods

Literature research

A manual as well as a semi-automatic literature research was performed. The manual literature research mainly used public data bases like PubMed, ScienceDirect or Scopus. Furthermore, the manual research was extended to the patent data base DEPATISnet. Information like the name of the alternative substance (trivial name, chemical name), the CAS number as well as information on potential use and environmental relevance was extracted.

In order to support repeating researches in different literature data bases and the documentation of the results, a semi-automated literature research was performed in parallel. Applying the workflow program KNIME (Konstanz Information Miner), the automated research of the search terms in the literature data bases European PubMed Central (EPMC), SCOPUS, and ScienceDirect was realized, which provide the corresponding programming interfaces.

Experimental testing

For the evaluation of the endocrine potential of the selected substances a successive testing cascade of biochemical and cell-based assays was established. For this purpose, validated and commercially available test systems were selected, which cover the following test formats: competitive receptor-ligand binding assays, coactivator recruiting assays, and cell-based reporter gene assays.

For the performance of receptor-ligand binding assays, fluorescence polarization (FP) assays for the androgen receptor (AR) and the estrogen receptors α and β (ER α and ER β) were used. The following evaluation of the ligand-dependent coactivator recruiting assays, TR-FRET assay were conducted, which were performed in the agonist- as well as in the antagonist mode.

In order to demonstrate the endocrine potential at the cellular level, transactivation (reporter) assays with a stable transfected mammalian cell line (HEK293T cells) were performed for the estrogen receptors α and β . In this cell line, receptor activation is detectable by the expression and activity of the enzyme β -lactamase. For the androgen receptor, a reporter gene assay was used, which utilizes transiently transfected HEK293T cells, transfected with an AR reporter plasmid and a control plasmid. These plasmids code for two luciferase enzymes (firefly and renilla luciferase; dual luciferase reporter). Both test formats could in principle be performed in the agonist- and the antagonist mode.

Results and Discussion

Literature research

The research for BPA alternatives was based on a tiered selection strategy and considered several criteria. Initially, BPA alternatives were identified by the manual research in PubMed and other scientific search engines and the automated search, as well as by the patent search in the patent data base (DEPATISnet). This approach resulted in 93 identified alternatives, which were classified into natural products, phenol-free substances, bisphenol-free substances, and BPA-free substances.

The next step of the literature research was based on this selection. The fields of application of the identified substances were categorized into "environmentally relevant" and "environmentally not relevant". For this purpose, environmentally relevant fields of application were defined. These included application in thermal paper, epoxy resins applied on outer surfaces, water pipes, or anti-foaming agents. Based on these criteria, 44 substances with a potential environmental relevance were identified.

The last step of the literature research was aimed at collecting all information on the endocrine potential of these substances in order to determine potential data gaps. This research resulted in 23 substances for which no information was available. For further 15 substances, an endocrine potential was already described. No endocrine potential was determined for the remaining substances.

As the experimental testing of the substances was performed in a high throughput approach, it was decided to test all commercially available environmentally relevant substances. As positive control, BPA was tested in parallel. Additionally, Pergafast®201, a substance clearly determined as uncritical and determined as safe alternative to BPA. In total, 26 substances from the list of environmentally relevant alternatives were ordered. Additionally, three substances were ordered, which were not identified by the literature research, however were identified as BPA alternative by the sponsor.

Experimental testing

Initially, all test substances were tested in the three receptor ligand binding tests (AR, ER α and ER β) at a concentration of 10 μ M. All substances, which displayed a relative inhibition of ≥ 50 %, were tested in a dose response relationship in the same assay system.

In the AR binding study, BPA and 14 alternative substances were identified as active. Bisphenol-FL > Biphenyl-4-ol > TMBPA, HPP > BPZ > BPC > BPTMC > DMT, Bisphenol AP > 4,4'-Thiodiphenol, BPF-para > Bisphenol PH > TGSA > PHBB > BPA. Of these substances Bisphenol-FL and Biphenyl-4-ol showed IC₅₀-values in the sub-micromolar concentration range.

In the ER α receptor binding assay, BPA and 10 alternative substances were identified as active compounds: BPZ, 4,4'-Thiodiphenol, BPF-para, PHBB, BPTMC, Bisphenol-AP, BPC, Biphenyl-4-ol, HPP, DD-70. The IC₅₀-values determined for BPZ, BPA, and 4,4'-Thiodiphenol were in the sub-micromolar concentration range. All other substances displayed IC₅₀-values of $\geq 1.8 \mu\text{M}$.

In the ER β receptor binding assay BPA and 9 alternative substances were identified as active compounds: BPA > Biphenyl-4-ol > BPTMC > 4,4'-Thiodiphenol > BPZ > BPC > BPF-para > BPS, > CHDM > PHBB. In this assay, BPA was identified as most potent substance (IC₅₀ = 0.25 μM).

As the receptor ligand binding tests allow no conclusion on the mode of action, all substances identified as active as well as some of the substances identified as non-active were tested in the substance-dependent coactivator recruiting assay, in both, the agonist and the antagonist mode.

In the AR coactivator recruiting assay, an EC₅₀ in a physiologically relevant concentration could be determined for none of the test substances in the agonist mode. For Biphenyl-4-ol, BPA, and BP-FL, the curve fits point to a minor recruiting of the coactivator peptide at concentrations $\geq 10 \mu\text{M}$. In the antagonist mode, the positive control cyproteronacetate displayed the already known inhibitory potential, however, neither BPA nor one of the alternative substances showed inhibitory effects.

In the ER α coactivator recruiting assay, 4,4'-Thiodiphenol, BPF-para, BPA, Bisphenol AP, BPC, and BPZ were active in the agonist mode, and provoked a coactivator recruiting at concentrations < 10 nM. In the antagonist mode, no substance despite of the positive control (4-hydroxy tamoxifen) was active. The ER β coactivator recruiting assay also displayed a number of positive substances: BPA, Biphenyl-4-ol, BPTMC (EC₅₀ < 10 nM). Furthermore, BPZ and 4,4'-Thiodiphenol were identified as active. No substance was active in the antagonist mode.

For the proof of cell-based modulation of the target gene expression, some substances were selected, which were demonstrated to be active in the preceding assays: BPA, BPZ, Biphenyl-4-ol, BPTMC, PHBB, 4,4'-Thiodiphenol, BPS, BPC, BPF. As potentially inactive substance, Pergafast®201 was included.

In the ER α transactivation assay, BPA > BPZ > 4,4'-Thiodiphenol were potent agonists, which were active in a sub nanomolar concentration range. A weak activity with a partially atypical curve fit was shown for BPTMC, BPC, BPS, and Biphenyl-4-ol. Pergafast®201 was shown to be inactive in this assay.

In the ER β transactivation test, an activation of the gene expression at physiologically relevant concentrations was shown for none of the substances. At concentrations > 10 μM , the following substances displayed a transactivation: 4,4'-Thiodiphenol, BPF, BPS, Biphenyl-4-ol, PHBB, and BPA.

In the AR transactivation assay, solely the agonist testosterone was able to induce gene expression. BPA as well as the substitution candidates were without effect in this assay.

Due to the negative results of the coactivator recruiting assays in the antagonist mode, no transactivation assays were performed in the antagonist mode.

The comparison of the activity of BPA in the performed assay with data for fish and amphibians from the literature displayed a wide range of similarities. In the here described assays, BPA displayed an agonistic potential for all assays, the ER α in the fluorescence polarization assay, the coactivator recruiting assay, and the transactivation assay. The review of Mathieu-Denoncourt et al. (2015) in detail describes effect of BPA on reproduction and sex ratio in fish and amphibians. Analogous to the data obtained in the present study, it becomes evident that BPA mainly activates the estrogen receptors in fish

and amphibian species. For example, in *Xenopus laevis*, the gene expression of estrogen receptor regulated genes like the ER α , the aromatase, and the egg yolk precursor protein vitellogenin (VTG) are activated. Increased VTG concentrations were also demonstrated in a number of fish species, for example in the swordfish, the rainbow trout, the zebrafish, and the fathead minnow. Mathieu-Denoncourt et al. (2015) also describes a common consensus, that the endocrine potential of BPA in fish and amphibians, analogous to data obtained in mammals, is based on the agonistic effect on the ER α . The influence of BPA on the sex ratio in fish and amphibians is ascribed to the binding of BPA to the ER and the resulting increased ER-mediated gene expression.

1 Hintergrund und Ziel des Projekts

Bisphenol A (BPA) wurde erstmals 1891 synthetisiert und in den 1930er Jahren als synthetisches Östrogen für die Hormonersatztherapie getestet. Ein Einsatz als Medikament erfolgte aber nie, da BPA im Vergleich zu Östradiol als zu wenig potent galt. In den 1950er Jahren wurden seine Eigenschaften als Härtungsmittel für Polykarbonate und zur Herstellung von Epoxidharzen entdeckt. Zusätzlich wird Bisphenol A derzeit noch als Farbentwicklerkomponente in Thermopapieren eingesetzt.

In zahlreichen Studien konnte eine hormonelle Wirkung von BPA auf das endokrine System nachgewiesen werden. Hormonell wirkende Stoffe, auch als Endokrine Disruptoren bezeichnet, binden in Zellen z.B. an Hormon-Rezeptoren und stören somit die natürliche Funktion des Hormonsystems in Menschen und Tieren. Als Folge davon kann es beim Menschen zu Schädigungen des Nerven-, Immun- und Herz-Kreislaufsystems sowie zu Störungen der Reproduktion und Entwicklung kommen (zusammengefasst in Rochester (2013)). Auch auf andere Organismen (z.B. Frösche, Vögel, Fische) sind BPA-vermittelte negative Effekte auf das Thyroid-System (Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse; HPT-Achse) und auf das Reproduktionssystem (Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse; HPG-Achse) in zahlreichen Studien nachgewiesen worden (zusammengefasst z.B. in Mathieu-Denoncourt et al. (2015)). Dies kann beispielsweise zu Fehlbildungen der Fortpflanzungsorgane führen.

Da BPA in den unterschiedlichsten Produkten Verwendung findet, ist eine substantielle Exposition des Menschen und der Umwelt gegeben. Das Hauptanwendungsgebiet von BPA ist die Herstellung von Polykarbonat-Plastik und Epoxidharzen. Die Verwendung von Polykarbonat-Plastik in Produkten wie Flaschen, Tischware, Kochgeschirr oder Lebensmittelverpackungen legt die Vermutung nahe, dass dies die Hauptexpositionsrouten für den Menschen sind (Geens et al. 2012). In die Umwelt gelangt BPA hauptsächlich durch Auswaschung aus BPA-haltigen Produkten (Mathieu-Denoncourt et al. 2015). Da BPA auch in Anwendungsgebieten abseits des Lebensmittelbereiches eingesetzt wird, z. B. in Epoxidharz-basierten Farben, Medizinalprodukten, Oberflächenbeschichtungen, Druckerfarben oder Flammschutzmitteln, wird der Eintrag in die Umwelt zusätzlich erhöht (EFSA 2015). Vor allem die Verwendung von BPA in Thermopapier ist kritisch zu betrachten, da dieses nicht nur in großen Mengen eingesetzt wird, sondern BPA durch seine Funktion als Farbentwickler dort in freier, monomerer Form vorkommt. Deshalb ist eine einfache und mengenmäßig relevante Kontamination der Umwelt mit BPA über das Papierrecycling als wahrscheinlich anzunehmen (Mendum et al. 2011).

Aufgrund der hohen Eintragungsmengen, der ubiquitären Eintragungspfade und der erwiesenermaßen reproduktions- und entwicklungstoxischen Wirkung wird die Produktion und Nutzung von BPA für einzelne Verwendungen bereits in Nordamerika und der EU reguliert. So ist der Einsatz von BPA in Babyflaschen in Kanada seit 2010 (Canada 2010) und in der EU seit 2011 (EU 2011) verboten. Die Bedenken der Bevölkerung, aber auch die behördliche Regulierung, haben die Entwicklung und Produktion von Alternativstoffen schnell vorangetrieben. Substanzen mit BPA-ähnlichen Eigenschaften werden bereits bei der Herstellung von Polykarbonat-Kunststoffen und Epoxidharzen eingesetzt. Bei der Herstellung von Epoxidklebern, für Beschichtungen von Metallkanistern, oder bei der Herstellung von Thermopapier wird zum Beispiel bereits das BPA-Analogon Bisphenol S (BPS) eingesetzt, das sich von BPA durch den Ersatz der zentralen Dimethylmethylengruppe durch eine Sulfonylgruppe nur leicht unterscheidet (Liao and Kannan 2014; Liao et al. 2012). Durch die gesteigerte Verwendung in den oben genannten Anwendungen als Ersatz für BPA liegt auch BPS bereits in einer geringeren, aber doch relevanten Konzentration in unterschiedlichsten Umweltmedien vor (zusammengefasst in Wu et al. (2017)). Auch für BPS gibt es Hinweise auf eine endokrine Wirkung (Molina-Molina et al. 2013; Naderi et al. 2014) ähnlich der von BPA. Aufgrund der geringen Datenlage ist eine Risikobewertung für BPS allerdings derzeit noch schwierig. Da auch für weitere BPA-Analoga, die zum Teil ebenfalls in großer Menge in die Umwelt eingebracht werden (Chen et al. 2016), eine unkritische Wirkung auf das endokrine System noch nicht bewiesen wurde, ist die Suche nach einer unbedenklichen BPA-Alternative noch nicht abgeschlossen. Als vielversprechend gilt z.B. die Phenol-freie Substanz Pergafast® 201 für den Einsatz in

Thermopapier, da erste Studien zumindest keine östrogene Aktivität von Pergafast® 201 nachweisen konnten (Bjornsdotter et al. 2017).

Ziel der vorliegenden Studie war die Identifizierung von Substitutionskandidaten für BPA und BPA-Analoga sowie deren Beurteilung hinsichtlich des endokrinen Gefahrenpotentials in umweltrelevanten Verwendungen. Als umweltrelevant wurden solche Verwendungen eingeschätzt, die zu einem direkten Kontakt der Umwelt mit der Substanz führen und bei denen sich die Substanzen aus dem Material herauslösen können. Hierzu wurde eine umfangreiche Recherche zu Substitutionskandidaten durchgeführt, die sowohl eine Suche in verschiedenen Literatur- und Patentdatenbanken, als auch eine Firmenabfrage nach der Relevanz der Alternativen beinhaltete. Die dabei identifizierten Substitutionskandidaten für Bisphenol A mit Datenlücken bezüglich des endokrinen Potentials wurden in einer Reihe von biochemischen und zellbasierten Screening-Tests hinsichtlich einer anti-/östrogenen und anti-androgenen Wirkung hin untersucht. Basierend auf den Ergebnissen dieser Tests wurden die untersuchten Substanzen bezüglich ihres endokrinen Gefahrenpotentials beurteilt.

2 Material und Methoden

2.1 Literaturrecherche zur Substanzsuche und Substanzauswahl

2.1.1 Manuelle Literaturrecherche

2.1.1.1 Suche über wissenschaftliche Suchmaschinen

Die manuelle Literaturrecherche wurde hauptsächlich über öffentliche Datenbanken wie PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com/>) oder Scopus (<https://www.elsevier.com/solutions/scopus>) durchgeführt. Folgende Informationen wurden initial aus den Suchergebnissen extrahiert:

- ▶ Name der Alternativsubstanz
- ▶ Chemischer Name
- ▶ CAS-Nummer
- ▶ Mögliche Anwendung
- ▶ Umweltrelevanz

Die genaue Strategie zur Literaturrecherche ist in Kapitel 3 beschrieben.

2.1.1.2 Suche in den Patentdatenbanken

In der Datenbank des Deutschen Patent- und Markenamts, DEPATISnet (<https://depatis-net.dpma.de/DepatisNet/>), wurde nach möglichen Alternativstoffen oder Substitutionen für Bisphenol A im Rahmen der Kunststoffherstellung (Suchworte „epoxy“ und „resin“) gesucht. Für die Suche nach Verfahren mit direktem Umweltbezug wurde die Suchabfrage mit „environment“ verknüpft.

Tabelle 1: Beispiel für eine Suchabfrage zur Identifizierung von Alternativsubstanzen in der Patentdatenbank DEPATISnet

Suchbegriff*	Boolescher Operator
AB=(Bisphenol(W)A	UND
AB = alternativ?	UND
AB = ?resin	
AB=(Bisphenol(W)A	UND
AB = alternativ?	UND
AB = ?resin	UND
AB = epoxy	UND
AB = environment?	

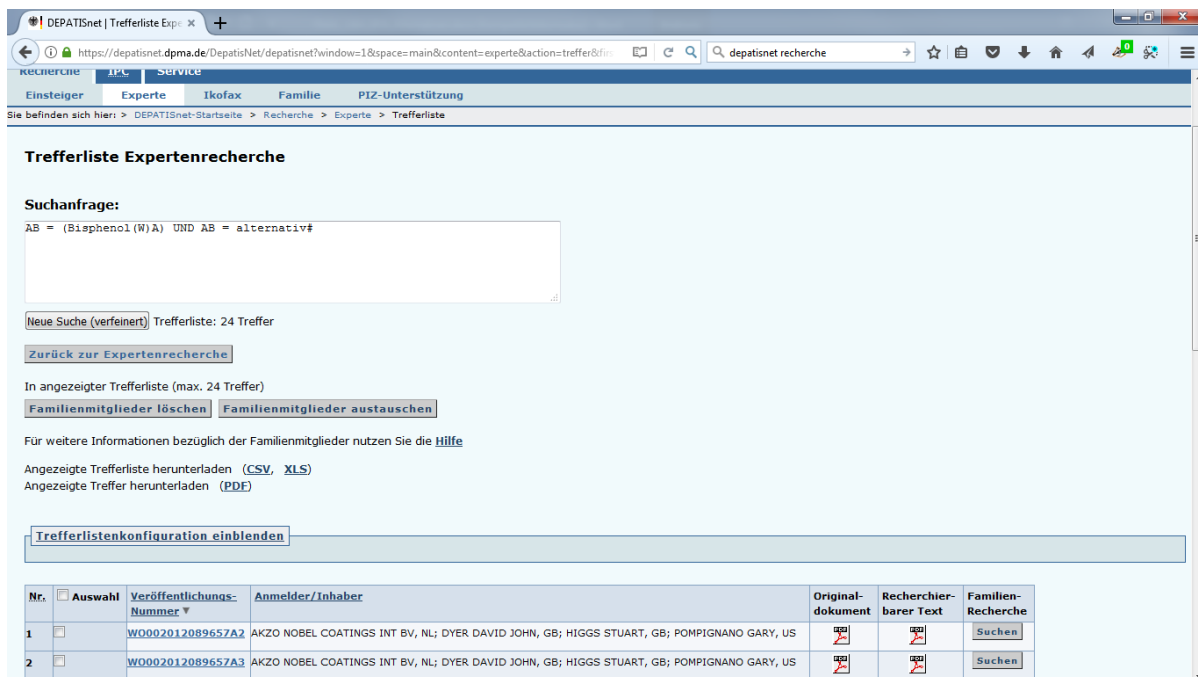
* inkl. Nachbarschaftsoperatoren und Platzhalter

Die Suche liefert als Ergebnis die Veröffentlichungs-Nummer der Patente und den Anmelder, bzw. Inhaber des jeweiligen Patents. Somit lassen sich sowohl die vorhandenen bibliografischen Daten als auch das Originaldokument im PDF-Format einsehen. Ein Beispiel eines Suchergebnisses zeigt Abbildung 1.

Die Patent-Veröffentlichungen wurden im Hinblick auf Projekt-relevante Informationen ausgewertet. Dabei lag der Schwerpunkt auf umweltrelevanten Anwendungen. So wurden Patente für Epoxidharz-Beschichtungen von Konservendosen nicht für die Auswertung herangezogen.

Die ausgewählten Ersatzstoffe mit den relevanten Detailinformationen sind in Tabelle 23 aufgeführt.

Abbildung 1: Screenshot zur Patentrecherche über DEPATISnet



2.1.2 Automatisierte Literaturrecherche

Um die sich wiederholenden Anfragen bei den unterschiedlichen Literaturportalen und der Dokumentation der Ergebnisse zu unterstützen, wurde eine automatisierte Literatursuche implementiert. Als Hauptanforderungen wurden eine leichte Anpassbarkeit an verschiedene Programmierschnittstellen (APIs) der Literaturrechercheportale sowie eine leichte Bedienbarkeit durch den Anwender definiert.

Aufgrund seiner leichten Anpassbarkeit sowie der einfachen Bedienung wurde das Pipelining-Programm KNIME (Konstanz Information Miner) für die Implementierung der automatisierten Literatursuche ausgewählt, mit dem durch die Verknüpfung von Modulen für die Datenverarbeitung, Modellierung sowie Analyse und Visualisierung unterschiedlichste Fragestellungen bearbeitet werden können. Die durch KNIME erstellten Workflows erlaubten eine semi-automatische Suchanfrage bei der European PubMed Central (EPMC) sowie bei weiteren Literatursuchmaschinen wie SCOPUS und ScienceDirect. Eine Suche über Google Scholar war nicht möglich, da kein API zur Verfügung steht.

2.2 Experimentelle Testung

Für die experimentelle Untersuchung der BPA-Alternativen wurde eine aufeinander aufbauende Kaskade von biochemischen und zell-basierten Testsystemen eingesetzt. Die anti-/östrogene, bzw. anti-/androgene Wirkung von BPA beruht auf molekularer Ebene auf der Bindung an die Kernrezeptoren Östrogenrezeptor α und β sowie an den Androgenrezeptor. Kernrezeptoren sind Liganden-modulierte Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Zielgenen regulieren. Die Bindung einer aktivierenden Substanz in die Ligandenbindetasche des Rezeptors bewirkt eine Konformationsänderung und ermöglicht die Rekrutierung sogenannter koaktivierender Proteine an den Rezeptor, welche für den Start der Genexpression benötigt werden. Die Bindung einer inhibierenden Substanz verhindert hingegen die Rekrutierung der koaktivierenden Proteine, sodass die Expression der Zielgene auch in Gegenwart des natürlichen Liganden (z.B. Östrogen) nicht mehr möglich ist.

Um den Effekt der BPA-Alternativen auf die drei Kernrezeptoren zu testen, wurden diese Substanzen daher in einem ersten Schritt hinsichtlich deren Bindung in die Ligandenbindetasche der Östrogenrezeptoren α und β sowie des Androgenrezeptors mittels eines biochemischen Bindungstests untersucht. In einem zweiten Schritt erfolgte die Untersuchung der Substanzen auf deren Fähigkeit zur Rekrutierung, bzw. Verdrängung von koaktivierenden Proteinen. In einem letzten Schritt wurde die substanzvermittelte Aktivierung der Genexpression in einem zellbasierten System untersucht.

2.2.1 Untersuchungen zur Rezeptor-Bindung von BPA-Substitutionskandidaten

2.2.1.1 Prinzip des kompetitiven Fluoreszenz-Polarisations-Bindungstests

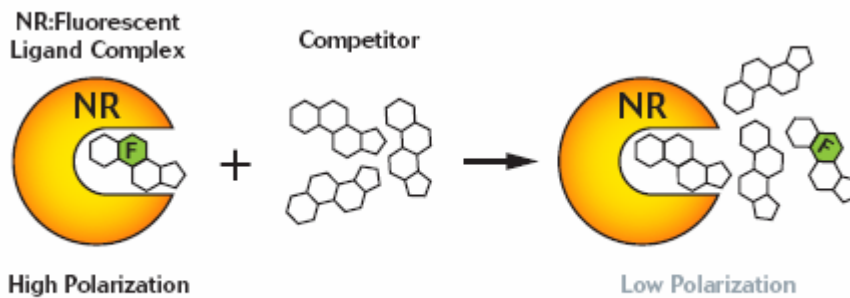
Für die Untersuchung der Bindung von BPA-Alternativen an die jeweiligen Kernrezeptoren wurden kommerziell verfügbare Testsysteme ausgewählt, bei denen ein Referenzligand durch die Testsubstanzen potentiell kompetitiv verdrängt wird. Anders als bei Radio-Ligandenbindungstests (vgl. z.B. Kuiper et al. (1997), OECD 2015), wird bei dem für die vorliegende Studie gewählten Fluoreszenz-Polarisations- (FP) Test ein fluoreszenz-markiertes Hormon-Analogon (Fluoromon) als Ligand verwendet, welches selektiv und mit vergleichbarer Affinität wie der natürliche Hormon-Ligand in die Ligandenbindetasche des Kernrezeptors bindet (Ohno et al. 2002). Dieses Test-Format wurde bereits in der Vergangenheit in Hochdurchsatz-Screening-Kampagnen insbesondere zur Identifizierung von selektiven ER α - und ER β -Liganden erfolgreich eingesetzt (Filgueira et al. 2014; Parker et al. 2000). Die Messmethode ist auf Multititerplatten-Lesegeräten verschiedener Hersteller etabliert.

Zum Nachweis der Bindung des Fluoromons an den Rezeptor bzw. der Konkurrenz durch Testsubstanzen lässt sich der Anteil des polarisierten Lichtes nutzen, das die Fluoromone nach der Anregung mit polarisiertem Licht emittieren. Das Prinzip beruht darauf, dass umso mehr polarisiertes Licht emittiert wird, je geringer die Beweglichkeit und die Rotation eines Fluoromon-Moleküls in Lösung ist (Jameson and Croney 2003). Da nicht gebundene Fluoromone beweglicher sind als gebundene, emittieren diese weniger polarisiertes Licht als an den Rezeptor gebundene Fluoromone, d.h. durch die Detektion des polarisierten Lichtes kann auf den Anteil freier, beweglicher und auf den Anteil proteingebundener, weniger beweglicher Liganden zurückgeschlossen werden, ohne dass die beiden Spezies getrennt werden müssen (Abbildung 2).

Da die kompetitive Bindung von Testsubstanzen in der Ligandenbindetasche die Fluoromone verdrängt, erhöht sich der Anteil beweglicher Fluoromon-Moleküle, was in einer Abnahme des polarisierten Lichtes resultiert. Dagegen führt die Zugabe von Testsubstanzen, die das Fluoromon nicht verdrängen können, nicht zu einer Verringerung der Emission polarisierten Lichtes (LifeTechnologies, MAN0007703).

Mit diesem Assay-Prinzip lassen sich Bindungskurven vermessen, sowie IC₅₀-Werte, relative Bindungsaffinitäten (RBA) und Dissoziationskonstanten bestimmen (Ohno et al. 2002; Yiu et al. 2014).

Abbildung 2: Prinzip des Fluoreszenz-Polarisations-Rezeptor-Liganden Bindungstests (nach Lifetechnologies, 2014; Reproduktion mit freundlicher Genehmigung des Urhebers)



Der Kernrezeptor (NR) und das Fluoromom bilden einen NR/Fluoromom-Komplex. Die geringere Beweglichkeit des gebundenen Fluoromoms führt bei Anregung zu einem hohen Anteil polarisierten Lichtes an der Gesamtemission nach Anregung. Die Zugabe von Testsubstanzen (Competitor) führt bei Bindung an den Kernrezeptor zu einer Verdrängung des Fluoromoms aus der Ligandenbindetasche und damit zu einer verringerten Emission polarisierten Lichtes (verändert nach Lifetechnologies, MAN0007703).

Die Messung und Analyse polarisierten Lichtes ist auf einer Reihe von Hochdurchsatz-Screening Plattformen, insbesondere zur Wirkstofftestung in der Arzneimittelforschung realisiert (Lea and Simeonov 2011). Dabei wird simultan polarisiertes Licht parallel (S-Ebene) und lotrecht (P-Ebene) zum Anregungsfilter detektiert. Quantitativ lässt sich die Fluoreszenz-Polarisation durch Differenz der Emission der S-Ebene (F-S) und der P-Ebene (F-P) normalisiert zur totalen Fluoreszenz-Emission [(F-S) + (F-P)] beschreiben:

$$FP = (F-S) - (F-P) / (F-S) + (F-P)$$

Praktisch wird der Grad der Fluoreszenz-Polarisation in milli-Polarization (mP) ausgedrückt:

$$\text{Polarization (mP)} = 1000 * (S - G * P) / (S + G * P),$$

Dabei sind S und P die Hintergrund-bereinigten Fluoreszenz-Intensitäten und G ein Korrekturfaktor, der sich aufgrund der Transmission der jeweils verwendeten Polarisations-Filter ergibt:

$$G = (S/P) * (1 - L/1000) / (1 + L/1000).$$

In diese Gleichung geht ebenfalls ein Fluorophor-abhängiger Wert L ein (für eine 1nM Fluoreszin-Lösung beträgt der Wert L bei RT 27 mP).

2.2.1.2 Reagenzien und FP-Detektor-Einstellungen

Die verwendeten Testsysteme wurden als gebrauchsfertige Kits (PolarScreen™, Lifetechnologies) bezogen, die eine hohe Qualität bezüglich der Reagenzien (Fluoromone, Rezeptor und Puffer) sowie eine Validierung im vorgeschlagenen Assay-Format durch den Hersteller (Lifetechnologies MAN0009993, MAN0009423, MAN0008943) garantieren.

Tabelle 2: Fluoreszenz-Polarisations-Testsysteme für die Untersuchung der Bindungseigenschaften von BPA-Alternativen

PolarScreen™ -Testsystem	Fluoromon	Rezeptor/ GenBank Nummer
AR Competitor Assay, Green (A15880)	AL-Green	Rekombinanter Ratten Androgenrezeptor (Ligandenbindedomäne), NP_036634
ER α Competitor Assay, Green (A15882)	ES2-Green	Rekombinanter humaner Östrogenrezeptor α , NP_000116.2
ER β Competitor Assay, Green (A15889)	ES2-Green	Rekombinanter humaner Östrogenrezeptor β , NP_001428.1

Die Fluoreszenz-polarisations-Detektion erfolgte auf dem EnVision Multititerplatten-Lesegerät (2103 Multimode Reader, PerkinElmer, Waltham, MA). Dabei wurden entsprechend den Herstellerangaben zur Detektion der grünen Fluoromone (AL-Green und ES2-Green) die entsprechenden „Optimized FITC FP Dual Emission Label Filter“ verwendet (PE 2100-8060), welche ein optisches Modul „FITC FP Dual Emission“ (2100-4070), einen Anregungsfilter 480 nm (2100-5040) und zwei Emissionsfilter (535 nm, S-polarisiert (2100-5140) und P-polarisiert (2100-5150)) enthält (vgl. PerkinElmer 2007).

Die Messparameter wurden mittels „Assay Wizard“ optimiert, wobei die Messhöhe und der Gain-Faktor für beide Emissionsfilter optimiert und im Messprotokoll gespeichert wurden. Als Fluorophor abhängiger L-Wert (siehe 2.2.1.1) wurde für alle Fluoromon-Green Farbstoffe (Tabelle 2) der Wert von 27 mP genutzt, da nach Herstellerangaben die Farbstoffe in ihren Eigenschaften dem von FITC entsprechen. Die finalen Messparameter des FP-Testsystems sind nachfolgend angegeben: FITC FP Dual Enh, Exc. Filter = FITC FP 480; Ems. Filter FITC FP P-pol 535; 2nd ems. Filter FITC FP S-pol 535; Measurement height = 11 mm; Number of flashes = 30; Number of flashes integrated = 1; PMT gain = 750, 2nd PMT gain = 750, G-factor = 0,43.

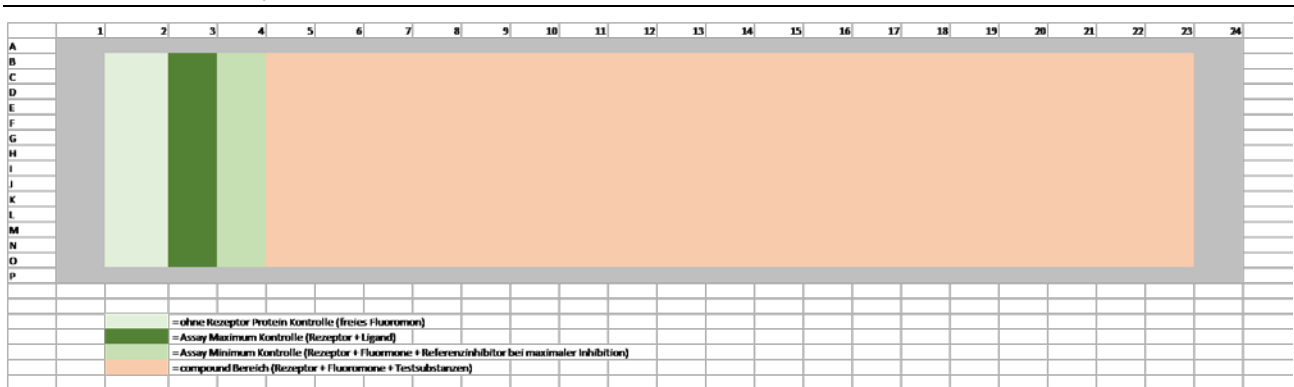
2.2.1.3 Assay-Design: Kontrollen, Primärscreen-Konditionen und Dosis-Wirkungs-Tests

Für die Durchführung valider FP-Tests sind verschiedene Kontrollen essentiell:

- ▶ Fluoromon im Assay-Puffer ohne Rezeptor (zur Bestimmung der Hintergrund-Werte der Gesamt-Fluoreszenz und der Signale in P- und S-Ebene zur Berechnung des Polarisation-Minimums = **(Free Fluoromone Tracer Control)**),
- ▶ zur Bestimmung des Assay-Maximums (**Assay Maximum mP Control**) sollten ungehemmte Kontrollen mit Rezeptor plus Fluoromon im Puffer-System mitgeführt werden und
- ▶ für die Bestimmung des Assay-Minimums eine entsprechende Kontrolle (Rezeptor plus Fluoromon) in Gegenwart eines Referenz-Inhibitors im Sättigungsbereich durchgeführt werden (**Assay Minimum mP Control**).

Diese Kontrollen wurden auf allen Mikrotiterplatten (384 Reaktionskammern, Corning Small Volume) in Säule 1, 2 und 3 mitgeführt. Auf jede der Kontrollen entfallen 12-14 Reaktionskammern (Abbildung 3).

Abbildung 3: Mikrotiterplatten Layout für Fluoreszenz-Polarisations-Tests mit essentiellen Kontrollen zur Bestimmung a) der Hintergrund-Fluoreszenz, b) des Assay-Maximums und c) des Assay-Minimums



Zur initialen Testung der BPA-Alternativen wurden alle Substanzen in Triplikaten bei einer Endkonzentration von 10 µM getestet. Zur Bestimmung der Dosis-Wirkungsabhängigkeit wurden die Substanzen in Duplikaten bei 0.00001-, 0.0001-, 0.001-, 0.01, 0.1-, 1.0-, 10 µM getestet.

2.2.1.4 Durchführung der FP-Bindungstests

Alle Testsubstanzen und Referenz-Liganden wurden in 100 % DMSO (Uvasol, Fluka) als 20 mM Stammlösung gelöst, aliquotiert und bei -20° C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Verdünnung der Testsubstanzen und der Referenz-Liganden erfolgte erst unmittelbar vor der Durchführung der Tests. Die Herstellung von Vorverdünnungen und serieller Verdünnungsreihen erfolgte in 100 % DMSO. Diese wurden anschließend 50-fach in Testpuffer weiter verdünnt und als 2x Lösung (2 % DMSO) in die Multititerplatten transferiert (10 µl). Anschließend wurden Kernrezeptor und Fluoromon in Assay-Puffer als 2x PräMix vorgemischt (siehe Tabelle 3). Von dieser Lösung wurden 10 µl in jede Reaktionskammer der Multititerplatten transferiert. Für die Herstellung der Free Fluoromone Tracer Control wurde ein Aliquot der Fluoromon-Lösung mit dem entsprechenden Volumen ohne Rezeptor versetzt und ebenfalls als 2x-Lösung in die Mikrotiterplatte transferiert (10 µl). Die Mikrotiterplatten wurden anschließend für 5 min bei 200 g zentrifugiert, mit Aluminiumfolie abgeklebt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Die Messung der Fluoreszenz und die Bestimmung der Polarisation erfolgte gemäß dem optimierten Messprotokoll auf dem EnVision Plattenlesegerät.

Tabelle 3: PolarScreen™ Testparameter

Testsystem	Konzentration der Stocklösungen Fluoromon und Kernrezeptor	Finale Konzentrationen im Test	Verdünnungs-faktor 2x
AR A15880 (Lot 1873989)	[AL Green] = 715 nM; [AR] = 18800 nM	[AL Green] = 3,6 nM; [AR] = 461 nM	[AL Green] = 99x; [AR] = 20.4x
ER α A15883 (Lot 1888256)	[ES2 Green] = 1800 nM; [ER α] = 3460 nM	[ES2 Green] = 4,5 nM; [ER α] = 75 nM	[ES2] = 200x; [ER α] = 23,1x
ER β A15890 (Lot 1909296)	[ES2 Green] = 1800 nM; [ER β] = 6550 nM	[ES2 Green] = 4,5 nM; [ER β] = 64 nM	[ES2] = 200x; [ER β] = 51x

Stammlösungskonzentrationen (von Rezeptor und Fluoromon) und Verdünnungsfaktoren zur Herstellung der 2x Vorverdünnungen für den Transfer in die Mikrotiterplatte.

2.2.1.5 Datenauswertung

Die Messwerte aus dem Primärscreen wurden in prozentuale Inhibition umgerechnet. Dazu wurde folgende Gleichung verwendet:

$$I_{\%} = (P_0 - P / P_0 - P_{100}) * 100$$

wobei P_0 dem Wert bei vollständiger Inhibition entspricht (komplette Verdrängung des Fluoromons aus der Ligandenbindetasche), P_{100} der Fluoreszenz-Polarisation bei ungehemmter Bindung im Gleichgewicht entspricht und P für den experimentellen Wert bei einer gegebenen Konzentration einer Testsubstanz steht.

Zur Ermittlung von Dosis-Wirkungskurven wurden die mP-Werte der Testsubstanzen oder die %-Werte der Inhibition zur Inhibitor-Konzentration dargestellt. Die mP-Werte wurden auf der Y-Achse, die Konzentration der Testsubstanzen wurden als Logarithmus der Substanzkonzentration ($\log[\text{compound}]$) auf der X-Achse aufgetragen. Die experimentellen Dosis-Wirkungskurven wurden mittels GraphPad Prism™ 4.0 Software analysiert. Dabei wurde ein nichtlinearer sigmoidaler Kurvenverlauf zugrunde gelegt (*xy analysis - nonlinear regression (curve fit)/ dose-response inhibition*). Die Software erlaubt die Extrapolation der Konzentration, bei der das Signal auf den halbmaximalen Wert reduziert ist (IC_{50} = mittlere Inhibitionskonzentration), sowie die Extrapolation der Werte für das obere und untere Plateau und der Steigung am Wendepunkt der Kurve. Für Substanzen, die dem idealtypischen Verlauf dieser Kurve entsprechen, wurden alle vier Parameter frei *gefittet* (4PL Modell = 4 Parameter Fit).

Für Substanzen, bei denen aufgrund zu geringer Potenz der Substanzen die Kurve nicht das untere Plateau erreicht, wurde das sogenannte *bottom (3PLFB)-Fit-Modell* verwendet, bei dem der Wert für das untere Plateau auf 0 % oder den mP-Wert bei vollständiger Inhibition durch den Referenz-Liganden fixiert wurde (vgl. Beck et al. 2012).

Aus den IC_{50} -Werten wurden die relativen Bindungsaffinitäten (RBA) berechnet:

$$RBA = IC_{50}(\text{natürlicher Ligand}) / IC_{50}(\text{Testsubstanz}) * 100.$$

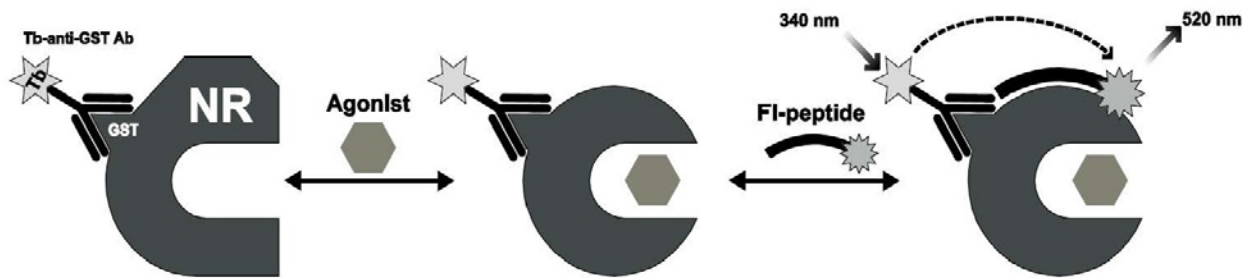
2.2.2 Substanz-abhängige Koaktivator-Rekrutierung

2.2.2.1 Prinzip der Koaktivator-Rekrutierungstests

Bindet der natürliche Ligand in die Ligandenbindetasche des Kernrezeptors, so bewirkt dies eine Konformationsänderung des Proteins. Diese führt zu einer erhöhten Affinität des Kernrezeptors für sogenannte Koaktivatorproteine, die nach Bindung an den Kernrezeptor weitere Proteine der basalen Transkriptionsmaschinerie rekrutieren, sodass die Genexpression der Zielgene initiiert wird (vgl. Dasgupta et al. (2014)).

Die in dieser Studie verwendeten „LanthaScreen TR-FRET Coactivator Assays“ nutzen das Prinzip des TR-FRET (zeitaufgelöste Fluorometrie kombiniert mit Förster-Resonanz Energie Transfer) (vgl. z.B. Rouleau et al. (2006)), um die Interaktion des Kernrezeptors mit einem Koaktivator-Peptid zu messen. Realisiert wird dies durch die Verwendung eines Terbium-markierten anti-GST Antikörpers (Donor) und eines Fluorescein-markierten Koaktivator-Peptids (Akzeptor). Bindet ein Kernrezeptor nach Liganden-induzierter Konformationsänderung das Koaktivator-Peptid (siehe Abbildung 4), so kann ein Energie-Transfer von Terbium auf das Fluorescein erfolgen (Hilal et al. 2010). Die Bindung wird durch den Anstieg der Fluoreszenz der Fluorescein (Akzeptor)-Emission nachgewiesen. Da Terbium im Vergleich zu anderen Fluorophoren einen sehr langen Anregungszustand hält (ms bis ns), lassen sich durch die zeitverzögerte Detektion der Fluorescein-Emission eine Autofluoreszenz von Testsubstanzen und falsch positive Resultate ausschließen (ThermoFisher Scientific).

Abbildung 4: Prinzip des Koaktivator-Rekrutierungstests (im Agonisten-Modus) (Lifetechnologies, 2014b; Reproduktion mit freundlicher Genehmigung des Urhebers)



Prinzip des Koaktivator-Rekrutierungstests (im Agonisten-Modus) (Lifetechnologies, 2014b). Ein Terbium-markierter anti-GST Antikörper bindet an den GST-Teil des Kernrezeptor(NR)-GST-Fusionsproteins. Bindet der NR einen Agonisten, so kann er durch die induzierte Konformationsänderung ein Koaktivator-Peptid binden, welches mit Fluorescein markiert ist (FI-peptide). Dadurch kommen beide Fluorophore so nah zusammen, dass im Falle einer Anregung des Terbiums bei 340 nm ein Energietransfer auf das Fluorescein erfolgen kann, der durch die zeitaufgelöste Detektion bei 520 nm gemessen werden kann.

2.2.2.2 Reagenzien und Monochromator-Einstellungen

Für die Koaktivator-Rekrutierungstests wurden LanthaScreen TR-FRET NR Coactivator Assay Kits bezogen (siehe Tabelle 4). Die Kits enthalten sowohl den Kernrezeptor, das Koaktivator-Peptid, den Testpuffer und einen Terbium-markierten Anti-GST-Antikörper als stabilisierte Stocklösungen.

Die Details zu den Kernrezeptoren und den Koaktivator-Peptiden finden sich in Tabelle 4.

Tabelle 4: LanthaScreen TR-FRET NR Coactivator Assay Fluoreszenz-Polarisations-Testsysteme für die Untersuchung der Bindungseigenschaften von BPA-Alternativen

LanthaScreen TR-FRET Assay	Kernrezeptor	Koaktivator-Peptid
AR Coacitvator Assay (A15878, Lot 1899266)	Rat AR LBD (AA 606-902; NP_036634), GST-tagged	Fluorescein-D11FxxLF peptide (He et al., 2002); Sequence: VESGSSRFMQLF-MANDLLT
ER α Coactivator Assay (A15885, Lot 1887430)	ER α LBD (AA 282-595, NP_000116.2), GST-tagged	Fluorescein-PGC1a coactivator peptide (Puigserver et al., 1998); Sequenz: EAEEPSLLKLLLLAPANTQ
ER β Coactivator Assay (A15893, Lot 1900806)	ER β LBD (AA244-530, NP_001428.1), GST-tagged	Fluorescein-PGC1a coactivator peptide (Puigserver et al., 1998); Sequence: EAEEPSLLKLLLLAPANTQ

Als Assayplatten wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers Mikrotiterplatten von Corning® 384-well, low volume, non-binding, solid black, round bottom plates verwendet (Cat No 4514).

Die Fluoreszenzpolarisations-Detektion erfolgte auf einem Tecan Infinite M1000 Mikroplatten Lesegerät, welches für die LanthaScreen Detektion vom Hersteller validiert wurde (Lifetechnologies, 2012). Die empfohlenen Monochromator-Einstellungen sind die folgenden: Anregung: 332 nm/20 nm (Bandbreite); Emissionsdetektion 1: 490 nm/10 nm (Bandbreite); Emissionsdetektion 2: 520nm/20 nn (Bandbreite). Der Gain Faktor und die Messhöhe wurden im Experiment Setup in Reaktionskammer B2 optimiert (Kontrolle mit maximalem Signal). Die weiteren Messparameter lauten: 100 μ s Lag time, 200 μ s Integration time TR-FRET Settings; Flashes Mode 2(100 Hz) ~8 Joule.

2.2.2.2 Durchführung des Koaktivator-Rekrutierungstests

Alle Reagenzien wurden kurz vor der Verwendung aufgetaut. Die Stocklösungen der Kernrezeptor-LBD wurden auf Eis aufgetaut und maximal für 10 min bei 0 °C gelagert. Die Lösungen des TB anti-GST Antikörpers und der Peptide wurden ebenfalls auf Eis aufgetaut und kurz vor der Verwendung für 2 min in einer Tischzentrifuge (Sprout™ 220/230 VAC) bei maximaler Umdrehung (2000 g) zentrifugiert.

Die Liganden wurden zunächst in 100 % DMSO als 100-fache Lösungen vorverdünnt. Anschließend erfolgte die Verdünnung im mitgelieferten Puffer zur Herstellung einer 2x Liganden-Verdünnung mit 2 % DMSO final. Von der 2x Liganden-Vorverdünnung wurden 10 µl pro Reaktionskammer überführt.

Die weiteren Reaktionskomponenten wurden gemäß Tabelle 5 in eiskaltem Assay-Puffer zu einer 2x Vorverdünnung verdünnt. Von diesen 2x Vorverdünnungen wurde ohne weitere Vorinkubation 10 µl pro Reaktionskammer zu der vorgelegten 2x Liganden-Vorverdünnung transferiert, wodurch 1x finale Assay-Konzentrationen erreicht wurden. Die finalen Konzentrationen der Testsubstanzen sind 0,01-, 0,1-, 1,0-, 10- und 100 µM (siehe Mikrotiterplatten-Layout). Als Kontrollen wurden Positiv-Kontrollen mit 10 µM der Referenz-Agonisten (Testosteron für den AR Koaktivator-Test, Östradiol für ERα und β Koaktivator-Tests) und Negativ-Kontrollen mit 1 % DMSO mitgeführt. Um den sogenannten Gain-Faktor (engl. für Verstärkungsfaktor) zu ermitteln, wurden Kontrollen ohne Rezeptor-Protein gemessen.

Tabelle 5: LanthaScreen™ Assay-Konditionen

LanthaScreen Assay	Komponente	Konzentration Stocklösungen	Finale Konzentrationen	Verdünnungsfaktor 2x*
AR Coactivator (A15878, Lot 1899266)	Peptid	100 µM	500 nM	100 fach
	Tb anti-GST antibody	3100 nM	5 nM	310 fach
	AR-LBD-GST	7760 nM	28 nM	138 fach
ER α Coactivator (A15885, Lot 1887430)	Peptid (PGC1a)	100 µM	250 nM	200 fach
	Tb anti-GST antibody	3100 nM	5 nM	310 fach
	ER-α-LBD-GST	20100 nM	7.3 nM	1376 fach
ER β Coactivator (A15893, Lot 1900806)	Peptid	100 µM	250 nM	200 fach
	Tb anti-GST antibody	3100 nM	5 nM	310 fach
	ER-β-LBD-GST	20800 nM	7.0 nM	1486 fach

Stammlösungskonzentrationen (Rezeptor, Koaktivator-Peptid, Terbium-AB) und Verdünnungsfaktoren (zur Herstellung der 4x Vorverdünnungen zum Transfer in die Assay-Platte). *zur Herstellung einer 2x Vorverdünnung, von der 10 µl pro Reaktionskammer für 20 µl Endvolumen transferiert wurden.

Abbildung 5: Mikrotiterplatten-Layout für die Testung von BPA-Alternativen im AR Koaktivator-Rekrutierungstest (Agonist-Modus)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
a	gain	Min Ctrl	Max Ctrl	1					5					5					13					
b	no receptor	DMSO	Testosterone 20 µM																					
c				183 Testosterone						99 BPA					5 BPAP					85 TMBPA				
d									6					10						14				
e				2																				
f						94 BP-FL					36 DMT					73 BPP					91 BPTMC			
g				3					7					11										
h																								
i						20 Diphenyl-4-ol					2 BPF-pars					8 BPS					empty			
j				4					8					12										
k																								
l						21 4,4 Thio					3 BPC					5 BPS-2,4					empty			
m																								
n																								
o																								
p																								

Im Antagonisten-Modus wurden die gleichen Test-Konditionen verwendet. Die Bindungstests wurden aber in Gegenwart einer submaximalen Konzentration ($\sim EC_{80}$) der natürlichen Liganden (Testosteron und Östradiol) durchgeführt. Als Referenz-Antagonisten (Positiv-Kontrolle für einen Inhibitor) wurden für den AR-Test Cyproterone Acetate (CPA) (Sigma A8380) und für die ER α und ER β Tests 4-Hydroxytamoxifen (Sigma H7904) verwendet. Im Test wurde der jeweilige Referenz-Antagonist bei gleichen Konzentrationen wie die Testsubstanzen eingesetzt.

Anschließend wurde die Testplatte auf einen Plattenschüttler gegeben, mit Aluminiumfolie versiegelt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Direkt vor der Messung wurde die Platte kurz zentrifugiert (Puls für 5 Sekunden; Heraeus Megafuge 16R, Plattenrotor M-20, Thermo Scientific) und dann gemäß Kapitel 2.2.2.2 im Tecan Infinite 1000 Mikrotiterplattenlesegerät gemessen.

2.2.2.1 Analyse der konzentrationsabhängigen Koaktivator-Rekrutierungsdaten

Zur Ermittlung der TR-FRET-Signale wurde der Quotient bzw. die Ratio (Emission 520 nm/Emission 495 nm) ermittelt. Die Darstellung und Analyse der Bindungskurven erfolgte mittels GraphPad Prism™ 4.0 Software. Für die Ermittlung der EC_{50} -Werte im Agonisten-Modus wurde ein nichtlinearer sigmoidaler Kurvenverlauf modelliert [(xy analysis – nonlinear regression (curve fit)/log(agonist) vs. response – variable slope (four parameters)]. Für den Antagonisten-Modus wurde folgendes Modell verwendet [(xy analysis – nonlinear regression (curve fit)/log(inhibitor) vs. response – Variable slope (four parameters)].

Für Substanzen, bei denen aufgrund zu geringer Potenz der Substanzen die Kurve nicht das untere Plateau erreichte, wurde das sogenannte *top* oder *bottom (3PLFB)-Fit* Modell verwendet, bei dem der Wert für das obere oder untere Plateau der sigmoidalen Kurve aus den Tests der Referenz-Liganden Testosteron bzw. Östradiol fixiert wurde (Beck et al. 2012). Um Kurven analysieren zu können, die in dem gewählten Konzentrationsbereich nicht den idealtypischen sigmoidalen Verlauf zeigen, wurde sowohl für den Agonisten- als auch für den Antagonisten-Mode die Fläche unter der Kurve (AUC = *Area under the Curve*) bestimmt.

2.2.3 Modulation der Zielgenexpression

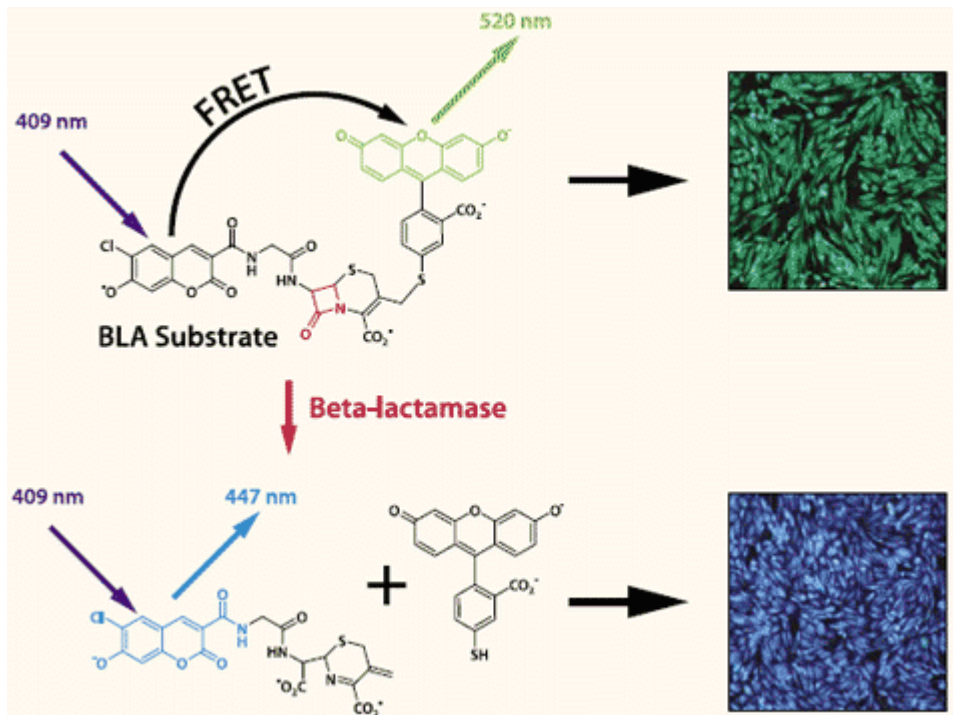
2.2.3.1 GeneBLAzer DA Assays: Prinzip der Transaktivierung und das Detektionsprinzip

Die in dieser Studie verwendeten Testsysteme (GeneBLAzer® DA Assays ER α GripTite DA (Invitrogen Cat No K1393, sowie ER β GripTite™ DA (K1399)) nutzen stabil transfizierte HEK293 Zellen. Die Zellen exprimieren die Ligandenbindedomäne des jeweiligen Rezeptors, welches mit der DNA-Bindedomäne des GAL4-Proteins fusioniert ist. Als Reporter-Gen enthalten die Zellen ein ebenfalls stabil integriertes β -Lactamase Reporter-Gen-Konstrukt, welches eine *upstream activator sequence* (UAS) enthält. Diese UAS ist die Zielsequenz des GAL4 Proteins. Bindet ein Agonist in die Ligandenbindetasche des GAL4-ER(LBD)-Fusionsproteins, so kann das Protein aufgrund der Agonist-induzierten Konformationsänderung an die UAS binden und so die Expression des β -Lactamase Reporter Gen Produktes initiieren (Invitrogen 2009 und 2010).

Um die Expression des Reporter-Gens zu detektieren, nutzt der Test ein fluoreszierendes Substrat, das mit zwei Fluorophoren (Coumarin und Fluorescein) markiert ist. Das intakte Substrat ermöglicht einen Energie-Transfer von Coumarin auf Fluorescein nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 409 nm, was durch die Detektion grünen Lichtes der Wellenlänge 520 nm nachweisbar ist. Wird das Substrat aufgrund induzierter β -Lactamase (bla)-Expression gespalten, so werden die Fluorophore separiert und ein Energie-Transfer unmöglich. Die Anregung mit Licht der Wellenlänge 409 nm führt zu einer Emission bei 447 nm (blau). Die Normalisierung der Emissionssignale 447 zu 520 (Ratio(blue/Green)) ermöglicht eine Normalisierung, wodurch der Test robust gegen Variationen in der Zellzahl wird (ThermoFisher Scientific).

Die Technologie wurde für verschiedene Zielmolekülklassen (*Targets*) bereits in verschiedenen Hochdurchsatz-Tests eingesetzt. Die hier verwendeten Testsysteme für die Östrogen Rezeptoren α und β sind erfolgreich in einem 3.456-Well Format verwendet worden (Peekhaus et al. 2003).

Abbildung 6: Prinzip der GeneBLazer FRET-Detektion (mit freundlicher Genehmigung des Urhebers)



Das Testsystem nutzt ein zellpermeables, akkumulierendes und fluoreszierendes Substrat, welches mit den zwei Fluorophoren Coumarin (blau) und Fluorescein (grün) markiert ist. Das intakte Substrat ermöglicht einen FRET von Coumarin auf Fluorescein nach Anregung bei 409 nm. Die Spaltung des Substrates durch β -Lactamase führt zu einer Separierung der Fluorophore, wodurch ein FRET unterbunden wird (verändert nach ThermoFisher Scientific, 2014).

2.2.3.2 GeneBLazer DA Reagenzien und Monochromator-Einstellungen

Die GeneBLazer DA Testsysteme enthalten wachstumsarretierte (Division Arrested (DA)) kryokonservierte CellSensor® UAS-bla Zellen, die für mindestens eine Mikrotiterplatte mit 384 Reaktionskammern ausreichen. Sowohl die DA-Zellen als auch die weiteren Reagenzien des Kits wurden vom Hersteller in diesem Plattenformat validiert. Die Werte für den Z-Faktor und die EC_{50} -Werte für Östradiol betragen 0,9 und 0,085 nM (ER α , Cat No K1393) bzw. 0,77 und 0,59 nM (ER β Cat. No K1399). Beide Kits enthalten das LiveBLazer™-FRET B/G Loading Kit (K1085) mit folgenden Komponenten:

- ▶ 70 μ g LiveBLazer™-FRET B/G Substrate CCF4-AM (K1427),
- ▶ 1ml water free DMSO for Solution A (K1040),
- ▶ 5 ml Solution B (K1041) und
- ▶ 32 ml Solution C (K1030).

Zum Nachweis der β -Lactamase Aktivität wurden zwei sukzessive Messungen in schwarzen transparenten Mikrotiterplatten (Corning 384 Flat Transparent) auf dem Tecan Infinite 1000 Monochromator-Mikrotiterplattenlesegerät mit automatisch optimierter Signalverstärkung und mehreren Messungen pro Reaktionskammer durchgeführt.

Tabelle 6: Anregung und Emissions-Einstellungen zur Messung der GeneBLazer FRET Signale (angepasst nach Angaben des Herstellers, Invitrogen 2009)

Monochromator-Einstellungen	Scan 1	Scan 2
Messung	Coumarin Fluoreszenz (blauer Kanal)	FRET Fluoreszenz (grüner Kanal)
Anregungs-Wellenlänge	409/ 20 nm	409/ 20 nm
Emissions-Wellenlängen	460/ 20 nm	530/ 20 nm

Weitere Messparameter waren: Reading mode: Bottom; Lag time: 0 µs; Integration time: 200 µs; Flash Frequency: Mode 1 [400Hz]; Settle time: 10 ms; Gain: Optimal; Number of reads: 10; Label: 530; Beam diameter: 2500 µm; Multiple reads per well type: FilledSquare; Multiple reads per well size: 3 x 3; Well border: 565 µm; Value of optimal gain: (530): 151; Value of optimal gain: (460): 127; Meas. temperature: 530: 28.9 °C; Meas. temperature: 460: 29.0 °C

2.2.3.3 GeneBLazer Assay Durchführung (Agonist-Modus)

Die wachstumsarretierten Zellen wurden gemäß der Herstellerprotokolle aufgetaut und bei einer Zellzahl von 20.000 Zellen/Mikrotiterplatte in 32 µl Phenolrot-freiem Testmedium ausgesät (Phenol red-free DMEM, Invitrogen 21063-029, +10 % Aktivkohle-behandeltes fötales Rinderserum, Invitrogen 26400-036). Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ für 16 Stunden inkubiert und am nächsten Tag für den Substanztest verwendet.

Die Substanzen wurden für den Substanzentest wie zuvor beschrieben in 100 % DMSO seriell verdünnt. Diese DMSO-Verdünnungen wurden anschließend in Assay-Medium 1:200-fach verdünnt, so dass eine 5x Vorverdünnung in Assay-Medium mit 0,5 % DMSO vorlag. Analog dazu wurde der Referenz-Agonist (Östradiol) verdünnt. Von diesen Lösungen wurden je 8 µl pro Reaktionskammer überführt. Für eine Lösemittelkontrolle wurden 8 µl/Reaktionskammer einer Mediumkontrolle mit 0,5 % DMSO in gleicher Weise überführt. Die Anordnung der Tests auf der Mikrotiterplatte erfolgte gemäß dem Layout in Abbildung 7. Die Substanzen wurden als Triplikate in den Konzentrationen 0,00001-, 0,0001, 0,001-, 0,01-, 0,1-, 1,0-, 10-, 100-, 1000- und 10000 nM gemessen.

Abbildung 7: Mikrotiterplatten-Layout für den GeneBLazer Östrogen Rezeptor α und –β Test (Agonist-Modus)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
a	DMSO (Minimum)	10 µM Östradiol (Maximum)	Östradiol-Verdünnung										Testsubstanz 5											
b			Testsubstanz 1										Testsubstanz 6											
c			Testsubstanz 2										Testsubstanz 7											
d			Testsubstanz 3										Testsubstanz 8											
e			Testsubstanz 4										Testsubstanz 9											
f			Testsubstanz 10										Testsubstanz 10											
g																								
h																								
i																								
j																								
k																								
l																								
m																								
n																								
o																								
p																								
			Konzentrationen																					
			0,00001, 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10000, 0,00001, 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10000																					

Die Präparation des fluoreszierenden Substrates (LiveBLazer™-FRET B/G Substrate (CCF4-AM)) erfolgte am nächsten Tag nach Angaben des Herstellers durch sukzessive Verdünnung in Lösung B und C. Von dieser 6x Substrat-Lösung wurde schließlich 8 µl pro Reaktionskammer pipettiert, vorsichtig vermischt und anschließend für 2 Std bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Messung wurde die Mikrotiterplatte mit Aluminium-Folie versiegelt und in das Plattenlesegerät gegeben. Die Messzeit betrug ca. 15 min, wobei zuerst die Emission bei 460 nm und anschließend bei 530 nm detektiert wurde.

Zur Analyse wurde der Quotient der Emission 530/460 berechnet [Ratio(Blue/Green)]. Die weitere Analyse der Dosis-Wirkungsbeziehung erfolgte wie unter Kapitel 2.2.2.1 beschrieben (Koaktivator-Rekrutierungstest, Agonist-Modus).

2.2.3.4 Transiente Transfektion Dual Glo Reporter Gene Assays

Der in dieser Studie verwendete Androgenrezeptor Transaktivierungs-Test ist ein kommerzieller Kit, der auf einer transienten Transfektion von HEK293T-Zellen mit einem Dual-Luciferase Reporter Plasmid-Mix beruht (Qiagen 2011). Das Kit Androgen Receptor Dual Luciferase (Qiagen CCS-1010L) enthält eine Mischung aus einem induzierbaren AR-Transkriptionsfaktor-Response-Element-Firefly Luciferase K und einem konstitutiv aktiven Renilla-Konstrukt in dem Mischungsverhältnis von 40:1.

Das induzierbare AR-Responsive Element Konstrukt kodiert für ein Firefly-Luziferase Reporter Gen unter der Kontrolle eines Basalpromoter Elements (TATA box) gefolgt von einem Tandem-Repeat des AR-Responsive Elementes (TRE). Dieses Reporter-Gen wird AR-Agonisten vermittelte Transkriptions-Aktivierung expremiert. Das konstitutiv aktive Renilla-Konstrukt enthält ein Renilla-Luziferase Gen unter der Kontrolle eines CMV Enhancer Promotors und diente als interne Transfektionskontrolle.

Zur Durchführung des Assays wurden HEK293T Zellen in Suspension mittels Effektene (Qiagen) transfiziert. Dazu wurden $1,9 \cdot 10^6$ Zellen in 5 ml Assaymedium (Phenolrot-freies DMEM-high supplementiert mit 10 % Aktivkohle-behandeltem fötalem Rinderserum) resuspendiert und nach Angaben des Herstellers mit 2 µg DNA transfiziert. Nach 20 min Inkubation wurde der Transfektionsmix mit Assay-Medium auf 7,7 ml aufgefüllt. Anschließend wurden mittels Multikanal-Pipette 20 µl pro Reaktionskammer ausgesät.

Die Messung der Luciferase Aktivität erfolgte mit dem Dual-Luciferase Reporter Test-System von Promega (Cat No. 1919). Als Messgerät wurde der Perkin-Elmer Envision mit einem Standard-Lumineszenz-Protokoll verwendet. Für die Messung wurden die Zellen zuerst im Firefly-Substratpuffer lysiert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Renilla-Substrat 1:100 in Stop-Glo Puffer verdünnt. Von dieser Stop/Renilla-Substratlösung wurde ebenfalls 20 µl pro Reaktionskammer dazugeben. Nach weiteren 20 min Inkubationszeit wurde das Renilla-Signal bei gleichen Messparameter gemessen.

3 Ergebnis der Literaturrecherche und Substanzauswahl

Die Suche nach BPA-Alternativstoffen beruhte auf einer gestuften Auswahlstrategie und berücksichtigte unterschiedliche Kriterien (siehe unten). Zunächst wurden mithilfe der manuellen Suche über PubMed und andere wissenschaftliche Suchmaschinen sowie der automatisierten Suche und der Patentsuche über die Patentdatenbank (DEPATISNet) Alternativsubstanzen zu BPA identifiziert.

Die manuelle und die automatisierte Literaturrecherche wurden parallel zueinander durchgeführt. Die verwendeten Suchbegriffe wurden in internen Telefonkonferenzen abgesprochen und sowohl für die manuelle als auch für die automatisierte Suchabfrage verwendet.

Ein Beispiel für die Suchbegriffe zu einer Suche ist in Tabelle 7 dargestellt. Insgesamt wurden neun automatisierte Suchabfragen durchgeführt. Die Ergebnisse der automatisierten Suchabfrage wurden anschließend auf relevante Literaturstellen und Aussagen durchgesehen und die entsprechenden Informationen extrahiert. Die Suchabfragen beschränkten sich auf die Suchmaschinen PubMed, ScienceDirect und Scopus. Die manuelle Suchabfrage wurde ausgehend von der automatisierten Suchabfrage und der Ergebnisse flexibel angepasst.

Anders als im Angebot dargestellt, wurde die Patentsuche in DEPATISNet parallel zur Literaturrecherche in den Literaturdatenbanken durchgeführt. Sie wurde hauptsächlich dazu genutzt, weitere patentierte Alternativsubstanzen zu identifizieren und ihrem Patenthalter zuzuordnen.

Auf eine Firmenabfrage zur Ermittlung der Relevanz der Alternativsubstanzen wurde verzichtet, da ein relevanter Rücklauf als unwahrscheinlich angesehen wurde.

Tabelle 7: Beispiel für eine automatisierte Suchabfrage zur Identifizierung von Alternativsubstanzen (Search Query3)

SearchTerm	BooleanOperator
(
Bisphenol A	OR
4,4'-propane-2,2-diylidiphenol	OR
4,4'-isopropylidenediphenol	OR
2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane	OR
Diphenylol propane	OR
CAS 80-05-07	OR
EC 201-245-8	
)	
	AND
(
alternat*	OR
substit*	OR
replace*	
)	

Diese Vorgehensweise resultierte in einer Liste von 93 identifizierten Alternativsubstanzen (siehe Tabelle 23), die in Naturstoffe, Phenol-freie Substanzen, Bisphenol-freie Substanzen und BPA-freie Substanzen eingeteilt werden können. Von den 93 Alternativsubstanzen sind 31 Substanzen BPA frei, weitere 4 Substanzen Bisphenol-frei und weitere 39 Substanzen Phenol-frei. Insgesamt wurden außerdem

8 Naturstoffe identifiziert, die als Ersatz für BPA beschrieben sind (Isosorbid, ein Polyester aus Tomatenhaut, Tannin, Leinsamenöl, marine Braunalgen, Limonene und Cardanol).

Der folgende Schritt der Literaturrecherche wurde basierend auf der Liste der Alternativsubstanzen aufgebaut. Für die identifizierten Substanzen sollte die Verwendung ermittelt werden, um sie in die Kategorien „umweltrelevant“ und „nicht umweltrelevant“ einzuordnen. Dazu wurde zunächst definiert, welche Anwendungen als „umweltrelevant“ zu werten sind.

Als umweltrelevant gelten Anwendungen, die mit der Umwelt in Kontakt kommen und sich die entsprechenden Substanzen aus dem Material herauslösen können.

Umweltrelevant sind somit:

- ▶ Alternativen verwendet in Thermopapier
- ▶ Alternativen verwendet in Epoxidharzen verwendet für Außenanwendungen
- ▶ Alternativen verwendet in Textilien (durch Reinigungsprozess)
- ▶ *Anti-Foaling* Agenzien
- ▶ Wasserleitungen

Nicht umweltrelevant sind:

- ▶ Alternativen in inerten Polykarbonaten
- ▶ Alternativen verwendet in Lebensmittelbehältern oder Wasserflaschen (gelangen in die Müllverbrennung)

Die Literaturrecherche wurde wiederum parallel mit einer automatisierten Suchabfrage und mit einer manuellen Suchabfrage durchgeführt. Dabei wurde der Substanzname (inklusive der Synonyme und der CAS-Nummer) in Kombination mit dem Suchbegriff „potential use“ in die verschiedenen Suchmaschinen eingegeben. Tabelle 8 zeigt eine Eingabe für eine automatisierte Suchabfrage für die Substanz Bisphenol F.

Tabelle 8: Beispiel für eine automatisierte Suchabfrage zum Verwendungszweck (Search Query1)

SearchTerm	BooleanOperator
(
Bisphenol F	OR
Bis(4-Hydroxyphenyl)Methane	OR
para(4,4'-methylenediphenol)	OR
620-92-8	
)	
	AND
(
potential use	
)	

Nach Rücksprache mit dem Auftraggeber wurden basierend auf den Suchabfragen und den oben aufgezählten Auswahlkriterien 44 BPA-Alternativsubstanzen identifiziert, für die ein Eintrag in die Umwelt möglich ist (Tabelle 24).

Im letzten Schritt der Literaturrecherche sollten alle vorhandenen Informationen zum endokrinen Potential der 44 potentiell umweltrelevanten BPA-Alternativen ermittelt werden, um eventuelle Datenlücken zu identifizieren und somit die Substanzauswahl für die weitere Testung einzugrenzen. Bei dieser Suchabfrage wurde auf eine automatisierte Suche verzichtet. Die Suchkriterien waren in diesem Fall z.B. „Name der Alternativsubstanz“ AND „endocrine“. Zunächst wurden aus den gefundenen Literaturstellen generelle Informationen zum Testsystem/Testansatz und zu den *in vitro*-Daten und Ergebnissen erhoben. Die Einordnung der Suchergebnisse erfolgte anschließend nach folgenden Kriterien:

- ▶ Östrogene Aktivität
- ▶ Anti-östrogene Aktivität
- ▶ Androgene Aktivität
- ▶ Anti-androgene Aktivität
- ▶ Thyroidale Aktivität
- ▶ Anti-thyroidale Aktivität

Hier erfolgte eine Beurteilung nach einfachem Ja-/Nein-/Keine Information-Beurteilung. Für 23 der Substanzen war nach der Literaturrecherche keine Information über das endokrine Wirkpotential verfügbar. Für 15 der Substanzen ist bereits ein endokrines Potential beschrieben, für die restlichen Substanzen ist kein endokrines Potential bekannt oder es lagen nur unvollständige Informationen vor. Zu den Substanzen, für die kein endokrines Potential beschrieben ist, zählen Pergafast® 201, D-8 und Decamethylcyclotetrasiloxan (D5).

Zu den Substanzen mit endokrinem Potential zählen BPF-para, BPC, PHBB, BPS, Biphenyl-4-ol, 4,4-Thiodiphenol (TDP), 4-tert-Butylphenol, Octamethylcyclotetrasiloxan (D4), CBD0, Leinsamenöl, Vitamin C, BPZ, HPP, TMBPA und BPFL (BHPP) (vgl. Tabelle 24). Dabei waren sowohl die verwendeten Untersuchungsmethoden unterschiedliche, als auch die Qualität und somit die Aussagekraft der erhobenen Daten.

Als Testsysteme wurden z.B. H295R Steroidogenese Assays (OECD Richtlinie 456), Genexpressionsanalysen, Reporterassays, Rezeptorbindungs-Experimente, Uterotrophie-Assays, Hershberger-Assays, molekulare Dockingstudien (*in situ*-Analysen) oder *Yeast-Two-Hybrid*-Studien identifiziert. Zu Leinsamenöl lagen zum Beispiel lediglich Studien zu Gesundheitseffekten nach Fütterungsversuchen vor, die einen generellen Effekt durch die Gabe von ungesättigten Fettsäuren beschreiben (INERIS). Konkrete *in vitro*-Studien zur Ermittlung der endokrinen Wirkweise lagen nicht vor. Die einzelnen Assays zu den jeweiligen Substanzen mit einer Zusammenfassung der Ergebnisse sind in Tabelle 24 beschrieben. Substanzen mit beschriebener östrogenen Aktivität sind BPF-para, BPC, Biphenyl-4-ol, 4,4-Thiodiphenol (TDP), 4-tert-Butylphenol, Octamethylcyclotetrasiloxan (D4), BPZ, HPP und TMBPA, eine anti-östrogene Wirkung ist für BPFL (BHPP) beschrieben. Für keine der Substanzen ist eine androgene Aktivität beschrieben. Für PHBB, BPS, 4,4'-Thiodiphenol (TDP) und TMBPA wiesen einige Studien eine anti-androgene Aktivität nach. Eine thyroideale Aktivität ist für 4,4'-Thiodiphenol (TDP) und TMBPA beschrieben, während für keine Substanz eine anti-thyroidale Aktivität nachgewiesen ist.

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollten im nächsten Schritt die Substanzen ausgewählt werden, für die Datenlücken bestehen, um für diese Substanzen die Hochdurchsatz *in vitro*-Tests durchzuführen und anschließend einen vollständigen Datensatz zum endokrinen Wirkpotential von BPA und den Alternativsubstanzen vorliegen zu haben. Diese Vorgehensweise macht allerdings einen Vergleich von bereits erhobenen Daten unterschiedlichster Testsysteme mit den in dieser Studie erhobenen Daten erforderlich. Dies setzt voraus, dass die Versuche Ergebnisse in einem ähnlichen Konzentrationsbereich liefern wie die in der Literatur beschriebenen Versuche oder zumindest in allen Versuchen die gleiche Positiv- und Negativkontrolle sowie BPA mitgeführt wird, um zumindest eine relative Einschätzung und Vergleichbarkeit zu erlauben. Aus diesem Grund wurde entschieden, alle verfügbaren Alternativsubstanzen (auch für jene, für die z.B. schon eine östrogene Aktivität beschrieben wurde), in

den ersten *in vitro*-Studien zu untersuchen. Als Kontrollen wurden außerdem BPA mitgeführt, um einen direkten Vergleich mit der zu substituierenden Substanz zu erlauben, und Pergafast® 201, für das bereits ein nicht-endokrines Potential (keine anti-/östrogene und keine anti-/androgene Aktivität; (Goldinger et al. 2015; US-EPA 2014)) erwiesen ist, um auch in den hier durchgeführten Untersuchungen eine aus endokriner Sichtweise sichere Alternative zu testen. In Tabelle 25 sind alle Substanzen aufgeführt, die käuflich zu erwerben waren und die für die Hochdurchsatz *in vitro*-Tests eingesetzt wurden. Aus der Liste der umweltrelevanten Alternativen wurden 26 Substanzen bestellt. Zusätzlich wurden drei Substanzen bestellt, die in der Literaturrecherche nicht identifiziert wurden, aber dem Auftraggeber als potentielle Substitutionskandidaten bekannt sind. Diese Substanzen sind DMT (Dimethylterephthalat), CHDM (1,4-Cyclohexandimethanol) und DOPO (9,10-Dihydro-9-oxa-10-phosphaphenanthren-10-oxid).

4 Ergebnisse der in vitro-Tests der ausgewählten Substanzen

4.1 Ergebnisse der Fluoreszenzpolarisations-Bindungstests

4.1.1 Validierung des Fluoreszenzpolarisations-Testformates

Zur Validierung des Fluoreszenzpolarisations-Formates wurden für jeden Assay die unter Kapitel 2.2.1.3 beschriebenen Kontrollen (Hintergrundfluoreszenz, Maximum, Minimum) gemessen. Für die AR-Testsysteme wurde als Minimumkontrolle 20 µM Testosteron zugegeben. Die ERα- und ERβ Minimumkontrollen wurden in Gegenwart von 20 µM Östrogen gemessen. Für die anderen Kontrollen erfolgte ein Lösungsmittelausgleich mit DMSO (1 % final).

Die für die Minimum- und Maximum-Kontrollen ermittelten Messwerte wurden um den Mittelwert der Hintergrundfluoreszenz bereinigt. Für die Replikate wurden dann die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet. Zur Qualitätskontrolle der jeweiligen Tests wurde mit diesen Werten das (Signal/Hintergrund)-Verhältnis und der sogenannte Z-Faktor ermittelt (Zhang et al. 1999)

Letzterer ist eine dimensionslose Indikator-Zahl, die durch vier Parameter definiert wird: den Mittelwert und die Standardabweichungen von Positiv- (Maximum-) und Negativ- (Minimum-) Kontrolle. Die Berechnung erfolgte mit der Formel:

$$\text{Z-Faktor} = 1 - [3 \cdot (\sigma_p - \sigma_n) / |\mu_p - \mu_n|],$$

wobei: σ = Standardabweichung, μ = Mittelwert, n = negativ, p = positiv. Die Werte des Z-Faktors für einen gegebenen Assay lassen sich gemäß Tabelle 9 interpretieren.

Tabelle 9: Interpretation des Z-Faktors (nach Zhang et al. (1999))

Z-Faktor	Interpretation
1,0	Ideal (Z-Faktoren können 1 nicht überschreiten)
0,5-1,0	Exzellenter Test
0-0,5	Schlechter Test
< 0	Starker Überlapp zwischen Positiv- und Negativkontrollen

Die Ergebnisse der Kontrollen aus den Primärscreen-Tests sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die mP-Werte (Maximum, Minimum, Hintergrund) und der ΔmP-Wert (max.-min.) liegen in dem vom Hersteller beschriebenen Toleranzbereich (Lifetechnologies MAN0009993, MAN0009423, MAN0008943). Die berechneten Z-Faktoren ergaben eine exzellente Qualität der Test-Durchführung gemäß Tabelle 9.

Tabelle 10: Ergebnisse der Testsystem-Validierung nach dem Primärscreen

Testsystem	AR	ERα	ERβ
Maximum (mP)	169,88 ± 6,79	199,64 ± 7,12	136 ± 7,16
Minimum (mP)	93,72 ± 6,11	99,42 ± 7,30	57,53 ± 5,62
Hintergrund (mP)	31,48 ± 5,45	79,04 ± 7,77	47,06 ± 5,16
(ΔmP) (max.-min.)	76,17	100,22	78,47
Z-Faktor	0,50	0,57	0,51

4.1.2 Ergebnisse der Primärscreens

Die Ergebnisse der Primärscreens sind in Tabelle 11 aufgeführt. Die Fluoreszenzwerte (mP) wurden in prozentuale Inhibition umgerechnet. Alle Substanzen, die bei 10 µM eine relative Signalreduktion von ~50 % erreichten, wurden anschließend für die exakte Bestimmung der IC₅₀-Werte anhand von Dosis-Wirkungskurven ausgewählt. Für den Androgenrezeptor zeigten 17 Substitutionskandidaten eine derartige Signalreduktion, für den ER α 11 Substanzen und für den ER β 13 der getesteten Alternativstoffe.

Tabelle 11: Ergebnisse der Ligandenbindungstests für alle BPA-Substitutionskandidaten und Kontrollsubstanzen bei einer Substanzkonzentration von 10 µM

Nr.	Testsubstanz	Rezeptor					
		AR		ER α		ER β	
		% Inhibition	SD	% Inhibition	SD	% Inhibition	SD
2	BPF – para	77,05	15,63	44,79	3,03	115,62	13,52
3	BPC	91,14	16,93	69,02	6,35	2,20	3,89
5	BisOPP-A; Bisphenol PH	75,60	4,60	-2,52	5,31	5,29	16,59
6	BPAP	47,46	8,03	33,42	6,56	20,56	7,49
7	PHBB	68,12	23,70	56,77	7,69	111,10	6,03
8	BPS	29,95	1,44	26,28	11,24	25,75	18,57
9	2,4-BPS	49,30	10,16	-2,95	3,69	5,43	16,02
10	TGSA	47,64	13,91	-3,72	5,12	-20,54	7,02
11	BPS-MAE	22,69	17,17	14,91	3,25	90,60	36,67
12	BPS-MPE	36,52	9,97	116,58	7,65	-16,40	14,37
13	D-8	36,83	10,95	5,69	7,01	-6,32	13,01
15	DD-70	40,24	11,23	26,88	9,30	43,02	13,63
16	Pergafast 201	21,55	12,70	-1,36	11,88	127,66	12,21
19	BPF – ortho	69,08	10,61	-12,33	2,69	11,24	9,79
20	Biphenyl-4-ol	118,19	4,54	53,12	4,64	83,65	13,55
21	4,4-Thiodiphenol (TDP)	74,55	1,48	100,57	1,20	69,05	7,83
22	4-tert-Butylphenol	16,52	10,39	-3,19	5,44	101,26	17,79
24	DMP-OH	41,16	10,17	-15,26	5,50	16,38	4,31
25	3,5-di-ter-butylsalicylic acid	40,55	13,42	-17,09	1,00	-9,13	8,49
26	Octamethylcyclotetrasiloxane	29,87	6,06	-10,57	4,93	-21,97	12,58
30	Decamethylcyclopentasiloxane	4,22	11,70	-14,49	5,34	89,03	22,04
34	CBDO; TMCD	32,27	28,53	-17,12	3,04	9,10	9,88
35	Isosorbide	21,03	4,07	-18,52	3,00	-6,46	7,05
42	A® free (Vitamin C)	32,49	2,11	-13,26	4,18	-22,97	12,57
66	BPZ (Bisphenol Z)	53,63	5,06	97,36	5,00	104,35	2,32
73	HPP	64,62	11,15	52,99	9,88	80,61	9,61
80	n-Alkyl Diphenolate Diglycidyl Ethers	21,46	13,23	-11,40	6,65	30,17	5,30
85	TMBPA	104,93	7,57	24,19	3,17	23,32	19,93
91	BPTMC	55,16	11,32	80,03	2,73	80,04	6,93

Nr.	Testsubstanz	Rezeptor					
		AR		ER α		ER β	
		% Inhibition	SD	% Inhibition	SD	% Inhibition	SD
92	THPE	41,29	1,84	7,66	4,10	60,53	8,51
94	BPFL, Bisphenol FL	66,76	10,58	-2,06	5,63	48,87	12,09
96	DMT	42,30	23,42	-10,64	2,26	4,34	10,36
97	CHDM	9,95	7,73	-9,74	8,61	78,28	8,34
98	DOPO	19,71	14,44	-14,00	1,80	17,14	28,44
99	Bisphenol A	68,86	4,17	61,17	2,53	79,61	15,60
100	Östradiol	105,58	12,17	91,07	8,86	85,17	12,95
101	Androstan	83,31	10,07	67,79	6,94	88,36	10,32
102	L-Thyrosin	17,22	2,61	-12,50	6,16	11,48	10,42
103	Testosteron	98,84	3,83	7,16	11,62	79,37	6,54

Für jede Verbindung ist die prozentuale Inhibition verglichen mit der Hormonkontrolle sowie die Standardabweichung (SD) angegeben.

4.1.3 Dosis-Wirkungskurven für den Androgenrezeptor

Die aus dem Primärscreen selektierten Substanzen wurden im gleichen Testsystem in Form von seriellen 1:10 Verdünnungen in Duplikaten getestet. Anhand der Dosis-Wirkungskurven (Abbildung 8) wurden die IC₅₀-Werte ermittelt. Von den 17 getesteten BPA-Substitutionskandidaten ließen sich die Substanzen BPS, 2,4-BPS und BPF-ortho nicht als Liganden des Androgenrezeptors bestätigen. Die übrigen 14 Substitutionskandidaten zeigten hingegen eine Bindung in die Ligandenbindetasche des Androgenrezeptors. Die aus den Dosis-Wirkungskurven ermittelten IC₅₀-Werte sind alle niedriger als für BPA (Tabelle 12), liegen aber noch deutlich über dem Wert des natürlichen Liganden Testosteron. Der potenteste Substitutionskandidat ist Bisphenol FL, mit einem IC₅₀-Wert von 33 nM (Abbildung 8). Dieser Wert liegt um drei Größenordnungen niedriger als der IC₅₀-Wert für BPA (17,5 µM). Die relative Bindungsaffinität (RBA) von Bisphenol FL ist im Vergleich zum natürlichen Testosteron 12-fach geringer. Für alle anderen Substitutionskandidaten wurden deutlich höhere IC₅₀-Werte ermittelt. Lediglich für Biphenyl-4-ol wurde ein weiterer sub-mikromolarer IC₅₀-Wert bestimmt (0,8 µM).

Abbildung 8: Dosis-Wirkungskurven von Testosteron, Bisphenol A (BPA), Bisphenol FL (BPFL) und DMT im Androgen Rezeptor Fluoreszenz-Polarisations-Testsystem

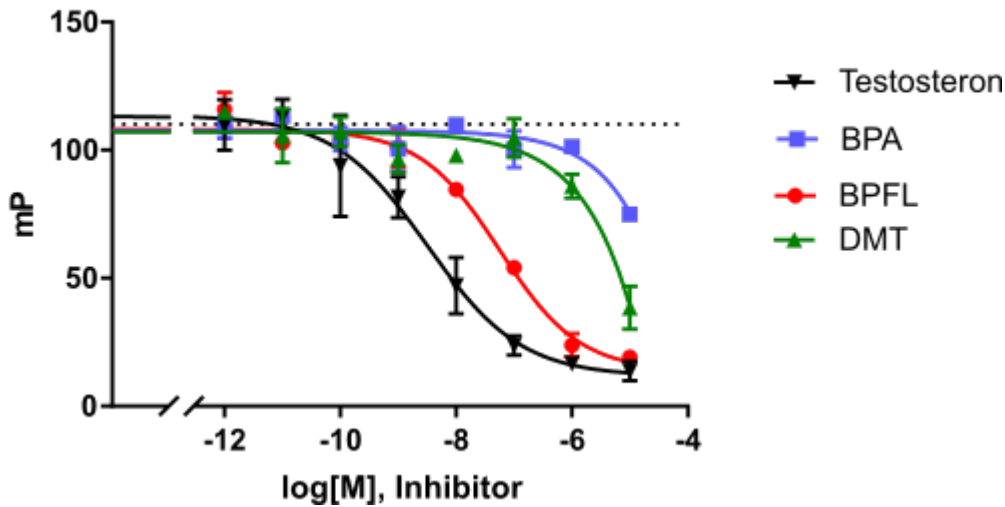


Tabelle 12: Überblick über die Ergebnisse aus den konzentrationsabhängigen Liganden-Bindetests des FP-Androgenrezeptor Ligandenbindungs-Tests

Testsubstanz	IC ₅₀	RBA (%)
Testosteron	2,8 nM	100,00
Östradiol	23 nM	12,170
Bisphenol-FL	33 nM	8,500
Biphenyl-4-ol	0,8 µM	0,350
TMBPA	1,1 µM	0,250
HPP	1,1 µM	0,250
BPZ	1,6 µM	0,175
BPC	1,8 µM	0,160
BPTMC	3,4 µM	0,082
DMT	3,5 µM	0,080
Bisphenol AP	5,4 µM	0,052
4,4'-Thiodiphenol (TDP)	5,8 µM	0,048
BPF-para	5,8 µM	0,048
Bisphenol PH	9,5 µM	0,029
TGSA	10,7 µM	0,026
PHBB	11,6 µM	0,024
BPA	17,5 µM	0,016
BPS	inaktiv	-
2,4-BPS	inaktiv	-
BPF-ortho	inaktiv	-

Aus den IC₅₀-Werten wurden die relativen Bindungsaffinitäten (RBA) berechnet:

$$RBA = IC_{50}(\text{Testosteron}) / IC_{50}(\text{Testsubstanz}) * 100.$$

4.1.4 Dosis-Wirkungskurven für die Östrogen-Rezeptoren α und β

Die aus dem Primärscreen selektierten Substanzen wurden im gleichen Testsystem in Form von seriellen 1:10 Verdünnungen in Duplikaten getestet. Anhand der Dosis-Wirkungskurven wurden die IC₅₀-Werte ermittelt.

Von den 11 Substitutionskandidaten, die hinsichtlich der Bindung an ER α getestet wurden, zeigte nur eine Substanz (BPS-MPE) keine Interaktion. Von den 10 bindenden Substanzen wies nur Bisphenol Z eine stärkere Bindung an den Rezeptor auf als Bisphenol A (Abbildung 9). Nur für diese beiden Substanzen, sowie 4,4'-Thiodiphenol konnte ein sub-mikromolarer IC₅₀-Wert ermittelt werden. Aufgrund der starken Bindung von Östradiol an den Rezeptor liegt die relative Bindungsaffinität für diese Substanzen trotzdem lediglich zwischen 0,2 und 1,1 %. Alle anderen Substanzen binden deutlich schwächer in die Ligandenbindetasche.

Von den 13 auf ER β -Bindung getesteten Alternativsubstanzen konnte für 9 eine Bindung in die Ligandenbindetasche nachgewiesen werden. Die für die Substitutionskandidaten ermittelten IC₅₀-Werte liegen mindestens drei Größenordnungen über dem für den natürlichen Liganden Östradiol bestimmten Wert. Keine Alternativsubstanz zeigte eine stärkere Bindung an den Rezeptor als BPA. Lediglich die IC₅₀-Werte von Biphenyl-4-ol und BPTMC liegen ebenfalls im mikromolaren Bereich. Die relativen Bindungsaffinitäten von BPA, BPTMC und Biphenyl-4-ol liegen zwischen 0,03 und 0,12 %.

Abbildung 9: Dosis-Wirkungskurven von Östradiol, Bisphenol A, 4,4'-Thiodiphenol (TDP) und Bisphenol Z im Östrogenrezeptor α Fluoreszenz-Polarisations-Testsystem

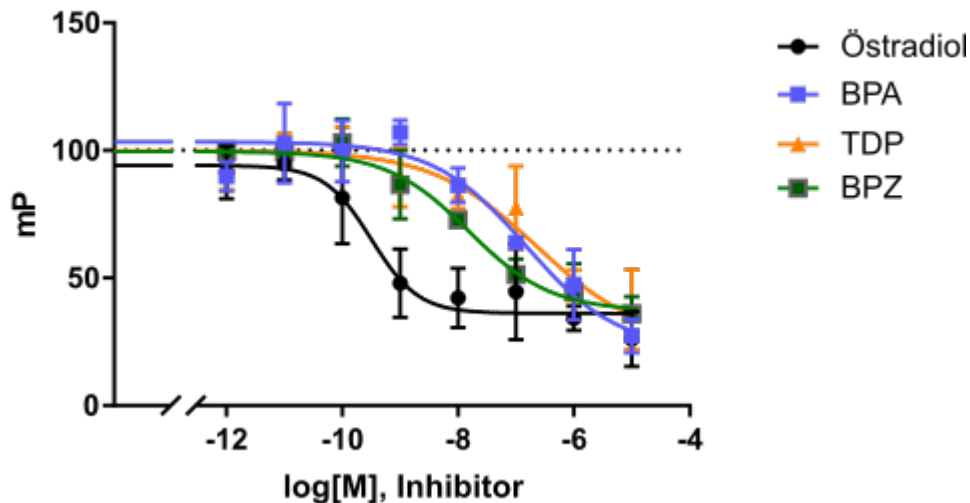


Tabelle 13: Übersicht über die Ergebnisse der konzentrationsabhängigen Liganden-Bindetests an die Östrogen Rezeptoren α und β

Testsubstanz	ER α		ER β	
	IC ₅₀	RBA (%)	IC ₅₀	RBA (%)
Östradiol	0,9 nM	100,0	0,3 nM	100,0
BPZ	0,08 μ M	1,13	1,1 μ M	0,027
BPA	0,18 μ M	0,500	0,25 μ M	0,120
4,4'Thiodiphenol (TDP)	0,48 μ M	0,187	1,1 μ M	0,027
BPF-para	1,8 μ M	0,050	3,8 μ M	0,008
PHBB	1,8 μ M	0,050	~38 μ M	0,001
BPTMC	1,9 μ M	0,047	0,9 μ M	0,033
Androstan	2,0 μ M	0,045	nicht getestet	-
Bisphenol-AP	2,6 μ M	0,035	nicht getestet	-
BPC	3,9 μ M	0,023	3,1 μ M	0,010
Biphenyl-4-ol	4,3 μ M	0,021	0,5 μ M	0,060
HPP	8,6 μ M	0,010	nicht getestet	-
DD-70	14,8 μ M	0,006	nicht getestet	-
BPS	nicht getestet	-	7,8 μ M	0,012
CHDM	nicht getestet	-	~35 μ M	0,0008
Bisphenol-FL	nicht getestet	-	inaktiv	-
BPS-MPE	inaktiv	-	nicht getestet	-
Pergafast	nicht getestet	-	inaktiv	-
Decamethylcyclopentasiloxane	nicht getestet	-	inaktiv	-
TMBPA	nicht getestet	-	inaktiv	-
THPE	nicht getestet	-	inaktiv	-

Aus den IC₅₀-Werten wurden die relativen Bindungsaffinitäten (RBA) berechnet:

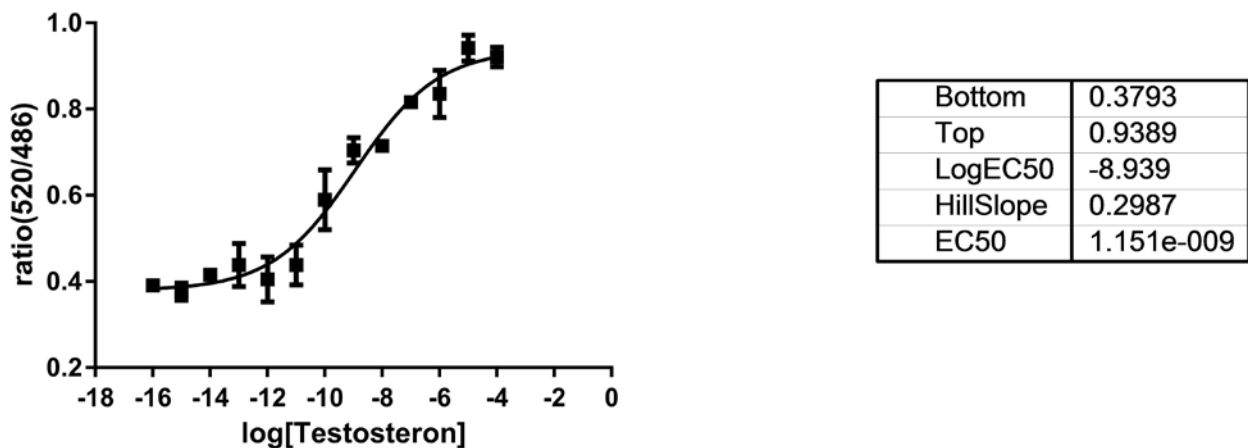
$$RBA = IC_{50}(\text{Östradiol}) / IC_{50}(\text{Testsubstanz}) * 100.$$

4.2 Substanz-abhängige Koaktivator-Rekrutierung

4.2.1 Androgen Rezeptor Koaktivator - Agonist-Modus

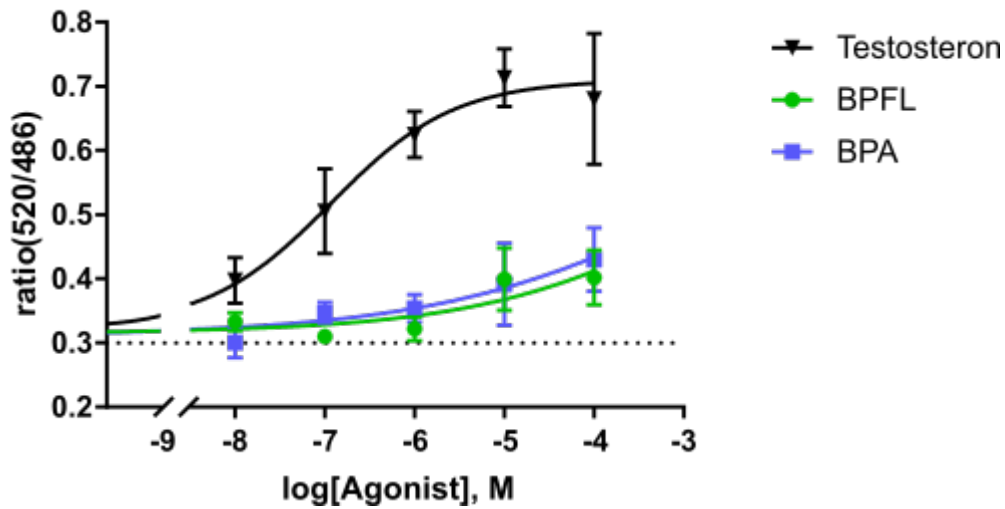
Zur Assay-Validierung wurde zunächst ein Koaktivator-Rekrutierungstest mit Testosteron als Agonist durchgeführt. Die Messung erfolgte nach 2 Stunden Inkubationszeit. Die Analyse ergab einen EC_{50} -Wert von 11,5 nM. Die Mittelwerte ($n = 2$) für das Assay Maximum und das –Minimum betragen 0,86 +/- 0,032 bzw. 0,32 +/- 0,033. Damit wurde ein Z-Faktor von > 0,9 erreicht, womit der Test den formalen Anforderungen genügt.

Abbildung 10: Androgen Rezeptor Rekrutierungsassay. Konzentrationsabhängige Induktion der Bindung des Koaktivator-Peptids durch den Referenz-Agonisten Testosteron



Im Agonisten-Mode wurden in dem Koaktivator-Rekrutierungstest folgende Substanzen getestet: Testosterone (103), Bisphenol-FL (94), Biphenyl-4-ol (20), 4,4'-Thiodiphenol (21), BPA (99), DMT (96), BPF-para (2), BPAP (5), BPC (3), HPP (73), BPS (8), BPS-2,4 (9), TMBPA (85), sowie BPTMC (91). Außer der Kontrollsubstanz Testosteron zeigte keine der getesteten Verbindungen eine Rekrutierung des Koaktivator-Peptids bei einer physiologisch relevanten Konzentration (Abbildung 10). Die Dosis-Wirkungskurven von Testosteron, BPA, sowie Bisphenol FL sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Ergebnisse der EC_{50} - und AUC-Bestimmung sind in Tabelle 14 enthalten. Neben dem natürlichen Liganden Testosteron konnte für keine der getesteten Verbindungen ein EC_{50} -Wert in einer physiologisch relevanten Konzentration bestimmt werden. Allerdings ist der Dosis-Wirkungskurven-Kurvenverlauf für Biphenyl-4-ol atypisch und die relative AUC deutet auf eine (geringe) Rekrutierung des Koaktivators hin.

Abbildung 11: Androgen Rezeptor Koaktivator-Rekrutierungstest



Konzentrationsabhängige Detektion der der Bindung des Koaktivator-Peptids für den Referenz-Agonisten (Testosteron, Bisphenol-FL (BPFL) und Bisphenol A (BPA)).

Tabelle 14: EC₅₀- und AUC-Werte für BPA-Alternativen aus dem AR Koaktivator-Rekrutierungstest im Agonisten-Modus

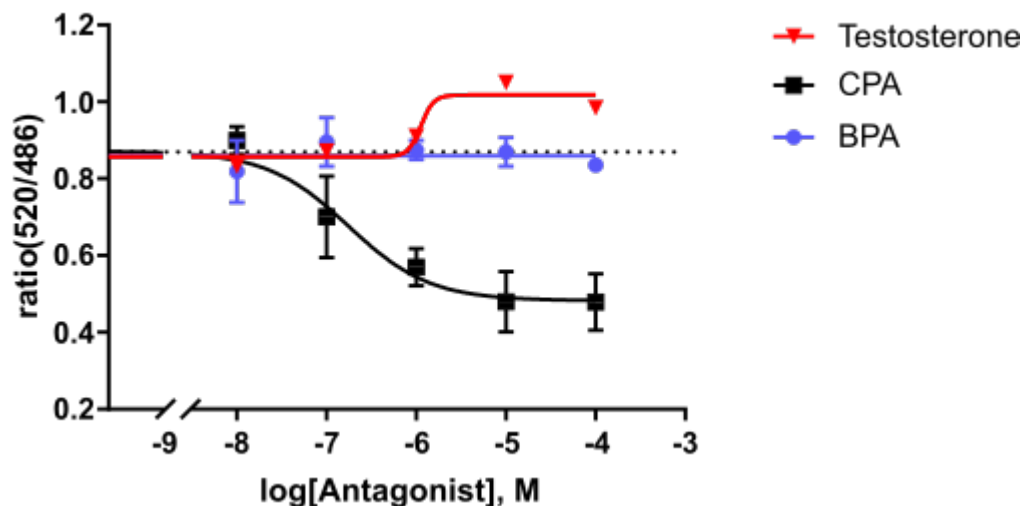
Testsubstanz(Nr.)	EC ₅₀	AUC (Area)	Relative AUC [%]
Testosterone (103)	89 nM	1,131	100
BP-FL (94)	~ 3762 µM	0,339	11,0
Biphenyl-4-ol	> 100 µM	0,3338	29,5
4,4'-Thiodiphenol (TDP) (21)	Inaktiv	0,1053	9,3
BPA (99)	~ 2613 µM	0,1893	16,7
DMT (96)	~ 24 mM	0,1132	10,0
BPF-para (2)	1807µM	0,06853	6,1
BPAP (5)	Inaktiv	0,1197	10,6
BPC (3)	Inaktiv	0,09915	8,8
HPP (73)	Inaktiv	0,05607	5,0
BPS (8)	Inaktiv	0,1065	9,4
BPS-2,4 (9)	Inaktiv	0,08366	7,3
TMBPA (85)	Inaktiv	0,1631	14,4
BPTMC (91)	Inaktiv	0,0846	7,5

4.2.2 Androgen Rezeptor Koaktivator - Antagonist-Modus

Alle Testsubstanzen aus Kapitel 4.2.1 wurden ebenfalls im Antagonist-Modus getestet. Dazu wurde der gleiche Test in Gegenwart einer konstanten submaximalen Konzentration (EC_{80}) von Testosteron (15 nM) durchgeführt. Substanzen, die als Antagonist wirken, sollten eine Signalreduktion bewirken. Als Referenz-Antagonist wurde, wie vom Hersteller empfohlen, CPA (Cyproteronacetat, Sigma, Cat. No. C3412) verwendet.

Exemplarisch sind die Ergebnisse in Abbildung 12 für CPA, BPA und Testosteron dargestellt. Die Grafik zeigt eine deutliche Signalreduktion (Ratio (520/486) bei zunehmender CPA-Konzentration, was auf einer verminderten Koaktivator-Rekrutierung aufgrund der inhibitorischen Wirkung von CPA beruht. Die ermittelte IC_{50} -Wert beträgt 174 nM für CPA (in der Herstellerbeschreibung ist ein Vergleichswert von 200 nM nach gleicher Inkubationszeit angegeben, Lifetechnologies MAN0009996), Im Falle von Testosteron kommt es mit steigender Konzentration zu einem zusätzlichen moderaten Signalanstieg, was durch die steigende Konzentration des natürlichen Agonisten zu erwarten ist. Im Falle von BPA und allen weiteren Testsubstanzen war keine Signal-Reduktion vorhanden, so dass für keine der Substanzen eine IC_{50} ermittelt werden konnte. Um aber auch leichte Effekte sichtbar zu machen, wurde die AUC bestimmt (Tabelle 15).

Abbildung 12: Androgen Rezeptor Koaktivator-Rekrutierungstest im Antagonisten-Modus



Dargestellt sind beispielhafte Dosis-Wirkungskurven von CPA als Referenz-Antagonist, Testosteron als natürlicher Agonist und BPA als Beispiel für eine inaktive Testsubstanzen.

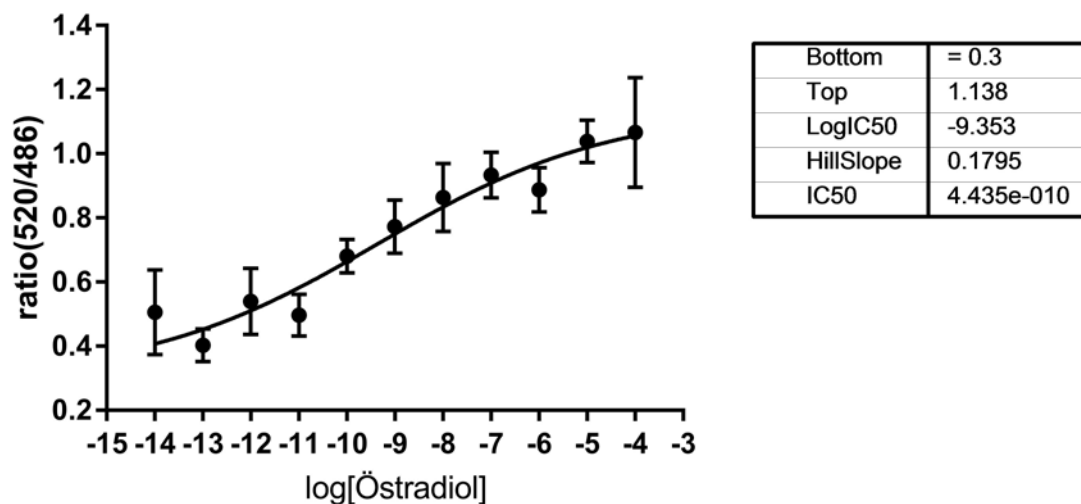
Tabelle 15: Ergebnisse des AR Koaktivator-Rekrutierungstests (EC₅₀, AUC- und relative AUC)

Testsubstanz (Nr.)	IC ₅₀	AUC (total Area)	Relative AUC [%]*
Testosteron (103)	n.a. (Agonist)	2,19	240
BP-FL (94)	inaktiv	1,7	186
Biphenyl-4-ol	inaktiv	1,97	216
4,4'-Thiodiphenol (TDP) (21)	inaktiv	1,98	218
BPA (99)	inaktiv	1,89	208
DMT (96)	inaktiv	1,85	203
BPF-para (2)	inaktiv	2,12	232
BPAP (5)	inaktiv	2,19	241
BPC (3)	inaktiv	1,97	216
HPP (73)	inaktiv	1,86	204
BPS (8)	inaktiv	2,1	231
BPS-2,4 (9)	inaktiv	2,2	241
TMBPA (85)	inaktiv	1,96	215
BPTMC (91)	inaktiv	1,86	204
DMSO**	Lösemittelkontrolle	1.93	212
CPA	174 nM	0,91	100 %

AUC(Testsubstanz)/AUC(CPA)* 100, ** Inaktive Lösemittelkontrolle

4.2.3 Östrogen Rezeptor α Koaktivator-Rekrutierungstest - Agonist-Modus

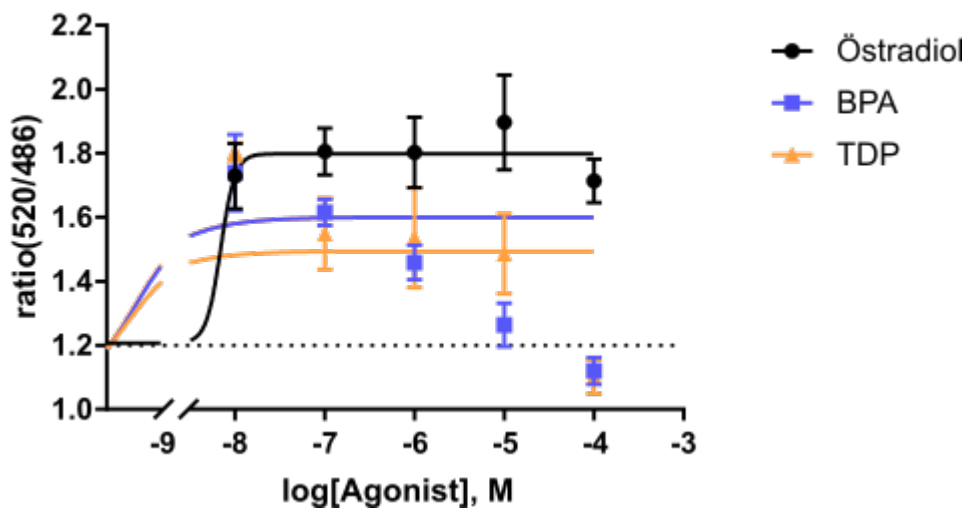
Zur Assay-Validierung wurde zunächst ein Koaktivator-Rekrutierungstest mit Östradiol als Agonist durchgeführt. Die Messung erfolgte nach 2 Stunden Inkubationszeit. Die Analyse ergab einen EC₅₀-Wert von 0,4 nM (Abbildung 13).

Abbildung 13: Östrogen Rezeptor α Rekrutierungsassay

Konzentrationsabhängige Induktion der Bindung des Koaktivator-Peptids durch den Referenz-Agonisten Östradiol.

Für den Test der BPA-Alternativen wurden folgende Substanzen ausgewählt: Östradiol (100), BPZ (66), BPA (99), 4,4'-Thiodiphenol, BPF-para (2), PHBB (7), BPTMC (91), Biphenyl-4-ol (20), Bisphenol AP (6), BPC (3), HPP (73), BPS (15), BP-FL (94), sowie Pergafast® 201 (16). Exemplarisch sind die Ergebnisse der Substanztestung für Östradiol, BPA und 4,4'-Thiodiphenol (TDP) in Abbildung 14 dargestellt. Die Ergebnisse der EC_{50} - und AUC-Bestimmung sind in Tabelle 16 zusammengestellt. Anhand der EC_{50} - und der AUC-Bestimmung sind in diesem Testsystem die BPA-Alternativsubstanzen 4,4'-Thiodiphenol (TDP), BPF-para, Bisphenol AP, BPC, sowie BPZ sehr potente Agonisten, die bei niedrigen Konzentrationen eine Koaktivator-Rekrutierung bewirken.

Abbildung 14: Östrogen Rezeptor α Koaktivator-Rekrutierungstest



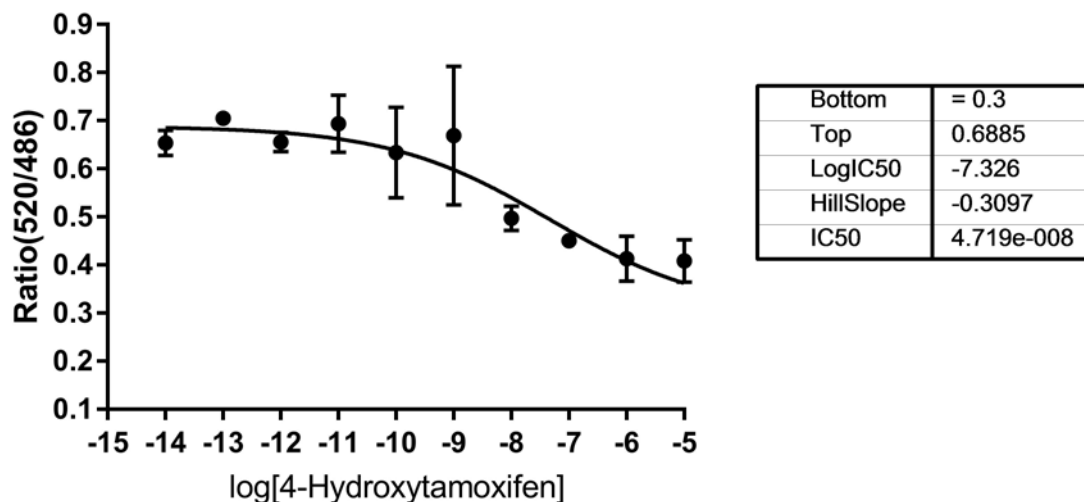
Konzentrationsabhängige Detektion der Bindung des Koaktivator-Peptides für den Referenz-Agonisten (Östradiol), BPA und 4,4'-Thiodiphenol (TDP).

Tabelle 16: EC₅₀- und AUC-Werte für BPA-Alternativen aus dem ER α Koaktivator-Rekrutierungstest im Agonisten-Modus

Testsubstanz (Nr.)	EC ₅₀	AUC (Area)	Relative AUC [%]
Östradiol (100)	< 10 nM (4,9 nM)	2,66	100
BPZ (66)	< 10 nM	1,30	48,9
BPA (99)	< 10 nM	1,66	62,4
4,4'-Thiodiphenol (TDP) (21)	< 10 nM	1,93	72,6
BPF-para (2)	< 10 nM	1,93	72,6
PHBB (7)	29 μ M (~ inaktiv)	0,59	22,2
BPTMC (91)	n.a.	1,4	52,6
Biphenyl-4-ol (20)	n.a.	1,36	51,1
Bisphenol AP (6)	< 10 nM	1,61	60,5
BPC (3)	< 10 nM	0,75	28,2
HPP (73)	n.a.	1,4	52,6
BPS (8)	n.a.	1,52	57,1
BP-FL (94)	n.a.	1,69	63,5
Pergafast (16)	n.a. (~ inaktiv)	0,65	24,4

4.2.4 Östrogen Rezeptor α Koaktivator-Rekrutierungstest - Antagonisten-Modus

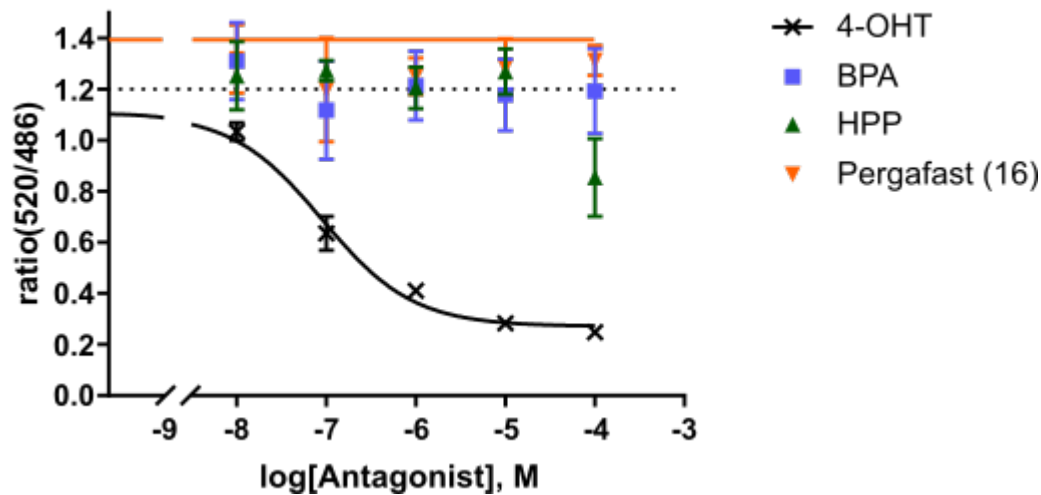
Die Testsubstanzen aus Kapitel 4.2.3 wurden gleichermaßen im Antagonist-Modus getestet. Dazu wurde der gleiche Test in Gegenwart einer konstanten submaximalen Konzentration (EC₈₀) von Östradiol (1 nM) durchgeführt. Antagonistisch wirkende Testsubstanzen sollten in dieser Konfiguration eine Signalreduktion bewirken. Als Kontrolle wurde der vom Hersteller verwendete Referenz-Antagonist 4-Hydroxytamoxifen (Sigma H7904) eingesetzt. Eine Dosis-Wirkungskurve für 4-Hydroxytamoxifen ist in Abbildung 15 gezeigt. Die ermittelte IC₅₀ beträgt 47 nM.

Abbildung 15: Östrogen Rezeptor α Koaktivator-Rekrutierungstest im Antagonisten-Modus

Dargestellt ist die Dosis-Wirkungskurven von 4-Hydroxytamoxifen als Referenz-Antagonist. Die Analyse der Kurve ergab einen IC₅₀ Wert von 47 nm.

Keine der getesteten Substanzen zeigte einen Effekt auf die Koaktivator-Rekrutierung. Die Dosis-Wirkungskurven für die Referenzsubstanz 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT), sowie BPA und PHBB sind in Abbildung 16 dargestellt. Die IC₅₀-Werte und Werte für die AUC für alle getesteten Substanzen sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Abbildung 16: Östrogen Rezeptor α Koaktivator-Rekrutierungstest im Antagonisten-Modus



Dargestellt sind beispielhafte Dosis-Wirkungskurven von 4-Hydroxytamoxifen(4-OHT) als Referenz-Antagonist, BPA und PHBB. Der IC₅₀-Werte für 4-Hydroxytamoxifen beträgt 87 nM. Für BPA und HPP konnte die Kurve aufgrund fehlender oder zu geringer Effekte nicht entsprechend modelliert werden.

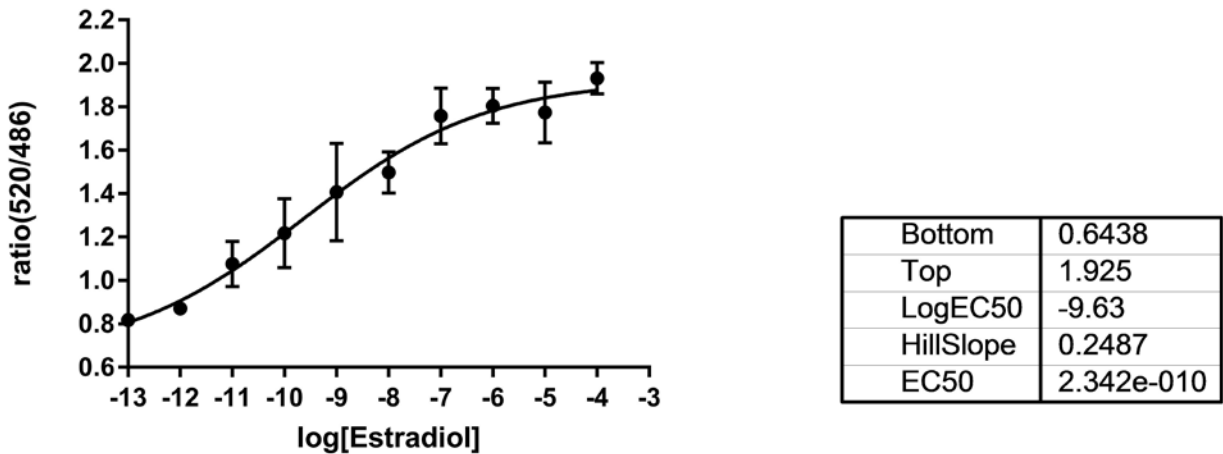
Tabelle 17: IC₅₀- und AUC-Werte für BPA-Alternativen aus dem ERα Koaktivator-Rekrutierungstest im Antagonisten-Modus

Testsubstanz (Nr.)	IC ₅₀	AUC (Area)
BPA (99)*	n.a. (inaktiv)	6,11
BPZ (66)*	n.a. (inaktiv)	6,30
Biphenol-4-ol (20)	n.a. (inaktiv)	6,48
4,4´Thiodiphenol (TDP) (21)	n.a. (Signalzunahme)	6,90 (AUC-Zunahme)
BPF-para (2)	n.a. (inaktiv)	6,67
PHBB (7)	~ 123 µM	5,97
BPTMC (91)	n.a. (inaktiv)	6,4
BPC (3)	n.a. (inaktiv)	6,44
HPP (73)	> 100µM	5,97
Bisphenol-AP (6)	n.a. (inaktiv)	6,09
BPS (8)	n.a. (inaktiv)	6,04
Pergafast (16)	~ 360 µM	6,26
BP-FL (94)	~ 360 µM	5,95
Hydroxyamoxifen	87 nM	3,03

4.2.5 Östrogen Rezeptor β Koaktivator-Rekrutierungstest – Agonist-Modus

Vor dem Testen der BPA-Alternativen wurde zunächst zu Validierungszwecken der EC_{50} -Wert des Referenzliganden Östradiol ermittelt. Dazu wurde eine 10x serielle Ligandenverdünnung eingesetzt und ebenfalls nach 2 Stunden Inkubation gemessen. Der aus der Dosis-Wirkungskurve ermittelte EC_{50} -Wert liegt bei 0,23 nM (Abbildung 17).

Abbildung 17: Östrogen Rezeptor β Koaktivator-Rekrutierungstest

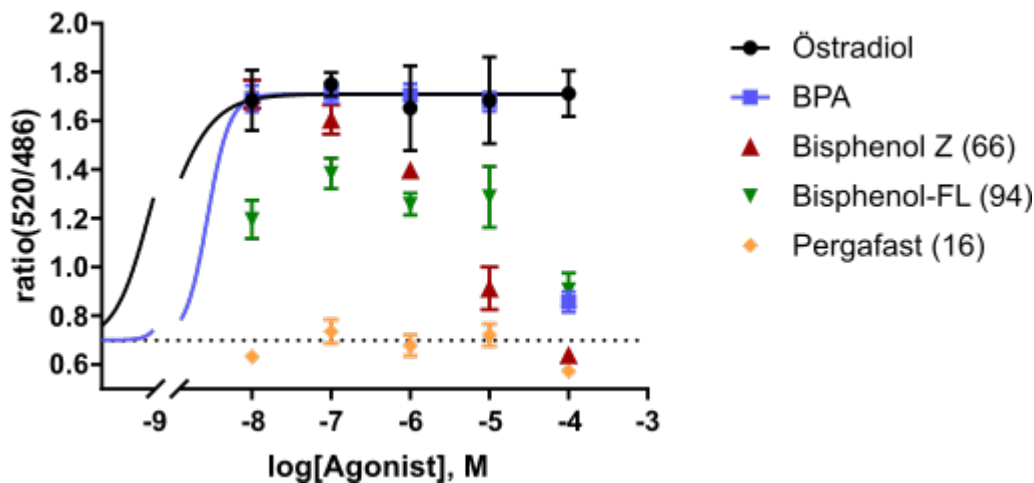


Konzentrationsabhängige Induktion der Bindung des Koaktivator-Peptids durch den Referenz-Agonisten Östradiol.

Für den Test der BPA-Alternativen wurden die gleichen Substanzen ausgewählt wie für den Östrogen Rezeptor α Koaktivatorortest (Östradiol (100), BPZ (66), BPA (99), 4,4'-Thiodiphenol (TDP), BPF-para (2), PHBB (7), BPTMC (91), Biphenyl-4-ol (20), Bisphenol AP (6), BPC (3), HPP (73), BPS (15), BP-FL (94), Pergafast (16)).

Exemplarisch sind Ergebnisse der Substanztestung in Abbildung 18 dargestellt. Die Ergebnisse der EC_{50} - und AUC-Bestimmung sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Abbildung 18: Östrogen Rezeptor β Koaktivator-Rekrutierungstest



Dargestellt sind die Dosis-Wirkungskurven für Östradiol, BPA, BPZ, BP-FL und Pergafast.

Die Dosis-Wirkungskurven in Abbildung 18 zeigen, dass BPA in diesem Test-System ein ähnlich starker ER α -Agonist ist wie Östradiol (die Kurven liegen teilweise übereinander). Im Bereich um 10 nM ist BPZ ebenfalls ein sehr potenter Agonist, die Dosis-Wirkungs-Kurve fällt aber bei höheren Konzentrationen wieder ab. Ebenfalls im nanomolaren Bereich wirksam ist BP-FL. Die Potenz ist aber nicht so hoch wie bei Östradiol, BPA oder BPZ. Dagegen ist Pergafast® 201 inaktiv, da die Kurve im Basalbereich verläuft. Um auch hier Effekte zu ermitteln, die nicht dem idealtypischen sigmoidalen Kurvenverlauf entsprechen, wurde für diesen Test ebenfalls die AUC und das Verhältnis der AUC (Testsubstanz/Östradiol) bestimmt (siehe Tabelle 18).

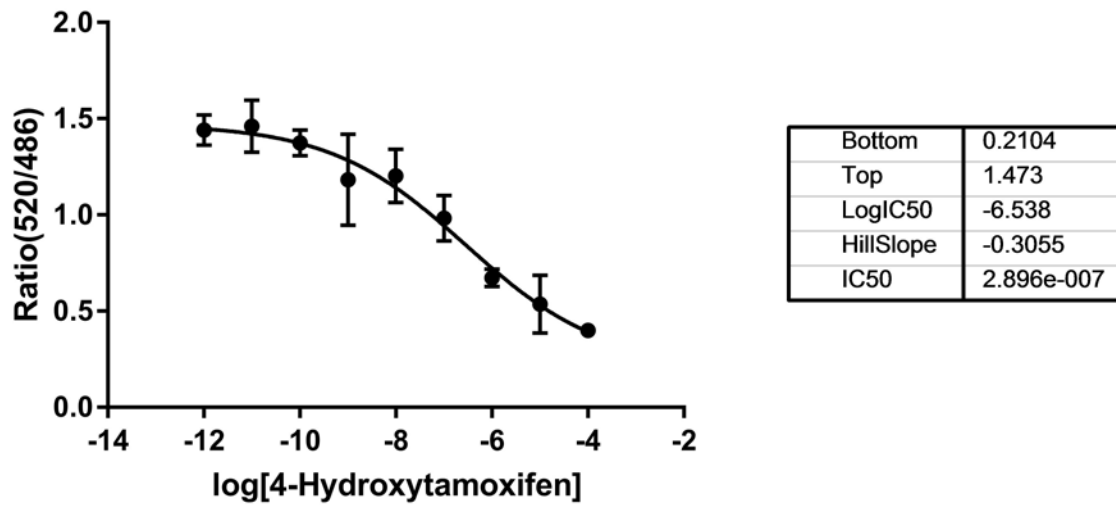
Tabelle 18: IC₅₀- und AUC-Werte für BPA-Alternativen aus dem ER β Koaktivator-Rekrutierungstest im Agonisten-Modus

Testsubstanz (Nr.)	IC ₅₀	AUC (Area)	Relative AUC [%]
Östradiol (100)	< 10 nM	4,31	100
BPA (99)	< 10 nM	4,1	95,3
Biphenyl-4-ol (20)	< 10 nM	2,56	59,4
BPTMC (91)	< 10 nM	1,2	27,8
Bisphenol Z (66)	2,13 μ M	2,82	65,4
4,4'-Thiodipheol	5,1 μ M	2,2	51,0
BPC (3)	n.a. (weak effect)	0,52	12,1
BPF-para (2)	542 μ M	0,34	7,9
PHBB (7)	~ 34 μ M	2,58	59,9
Bisphenol-FL (94)	256 μ M	2,26	52,4
BPS (8)	~3400 μ M	1,14	26,5
Pergafast (16)	n.a. (inactive)	0,145	3,4

4.2.6 Östrogen Rezeptor β Koaktivator-Rekrutierungstest - Antagonist-Modus

Alle Testsubstanzen aus Kapitel 4.2.5-wurden auch im Östrogen Rezeptor β Koaktivator-Rekrutierungstest im Antagonisten-Modus untersucht. Die Reaktionen wurden in Gegenwart von 10 nM Östradiol als Referenz-Agonist angesetzt. Als Kontroll-Antagonist wurde ebenfalls 4-Hydroxytamoxifen verwendet. Zur Evaluation des Tests wurde ebenfalls zunächst eine Dosis-Wirkungskurve für 4-Hydroxytamoxifen bestimmt (Abbildung 19). Die für diesen Test ermittelte IC₅₀ beträgt 290 nM.

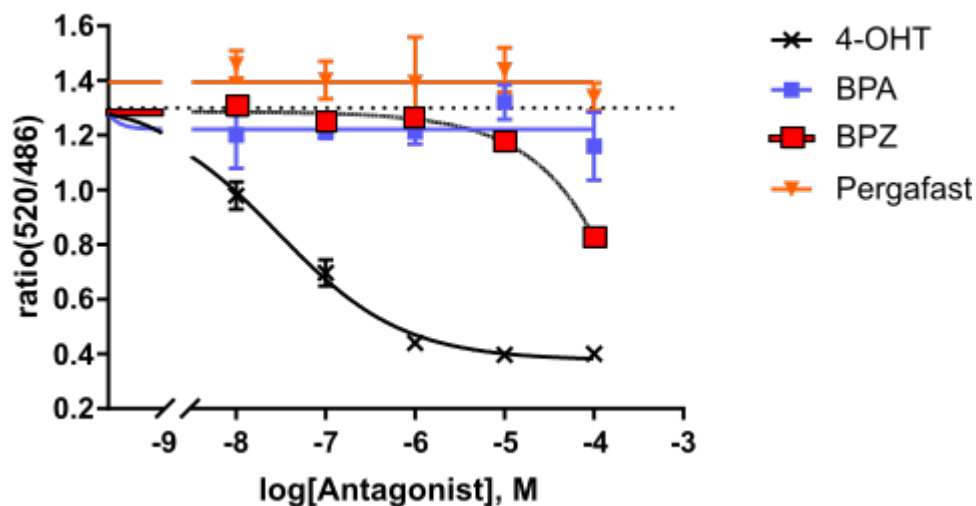
Abbildung 19: Östrogen Rezeptor β Koaktivator-Rekrutierungstest im Antagonisten-Modus



Dargestellt ist die Dosis-Wirkungskurven von 4-Hydroxytamoxifen als Referenz-Antagonist. Die Analyse der Kurve ergab einen IC₅₀ Wert von 290 nm.

Die Ergebnisse aus dem Test sind exemplarisch in Abbildung 20 gezeigt. Die IC₅₀-Werte und Werte für die AUC sind in Tabelle 17 zusammengestellt. In dem Test zeigt 4-Hydroxytamoxifen den erwarteten antagonistischen Effekt. Die Kurven von BPZ, PHBB und BPTMC zeigen bei 100 μ M eine Signalreduktion. Die IC₅₀ Werte wurden aber aufgrund der geringen Potenz der Substanzen mittels bottom (3PLFB)-Fit Modell extrapoliert. Alle anderen Substanzen zeigen geringere Effekte oder sind inaktiv (siehe Tabelle 19).

Abbildung 20: Östrogen Rezeptor β Koaktivator-Rekrutierungstest - Antagonisten-Modus



Dosis-Wirkungskurven von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT), BPA, BPZ und Pergafast[®] 201. Die Untersuchungen ergaben folgende IC₅₀ Werte: 4-Hydroxytamoxifen = 70 nM, BPZ ~ 97 μ M, BPA und Pergafast[®] 201 sind inaktiv.

Tabelle 19: IC₅₀- und AUC-Werte für BPA-Alternativen aus dem ER β Koaktivator-Rekrutierungstest im Antagonisten-Modus

Testsubstanz (Nr.)	IC ₅₀	AUC (Area)
BPA (99)*	n.a. (inaktiv)	6,2
BPZ (66)*	97 μ M	6,1
Biphenol-4-ol (20)	~ 300 μ M	6,7
4,4´Thiodiphenol (21)	~ 400 μ M	6,90
BPF-para (2)	~ 170 μ M	6,23
PHBB (7)	~ 123 μ M	6,4
BPTMC (91)	~ 118 μ M	6,7
BPC (3)	~ 269 μ M	7,0
HPP (73)	n.a.	6,0
Bisphenol-AP (6)	~ 1.76 mM	6,4
BPS (8)	~ 380 μ M	6,4
Pergafast (16)	n.a. (inaktiv)	7,0
BP-FL (94)	n.a. (inaktiv)	6,6
Hydroxyamoxifen	70 nM	3,4

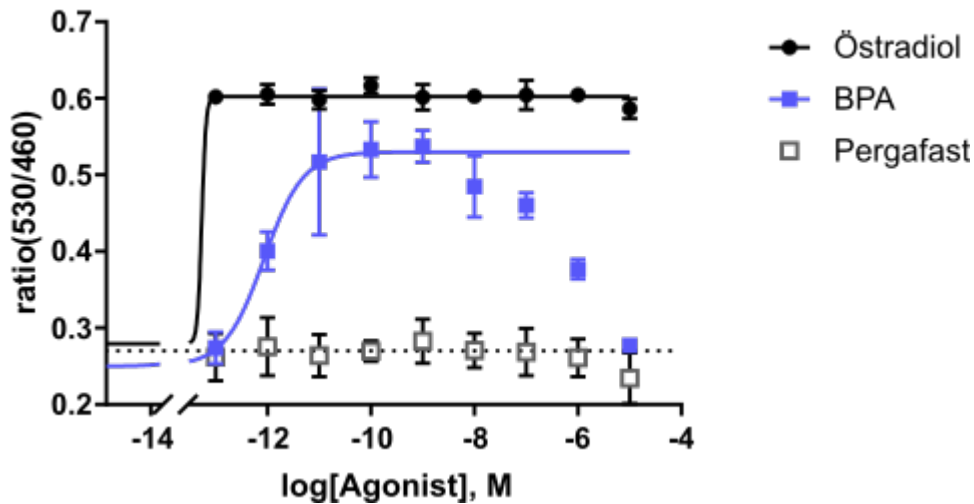
4.3 Substanzinduzierte Modulation der Zielgenexpression

Zum Nachweis zellbasierter Modulation der Zielgenexpression wurden verschiedene Reporter-Gen-Tests verwendet. Die Auswahl der Testsubstanzen orientierte sich im Wesentlichen an der Aktivität der Substanzen in den vorhergehenden Tests, wobei neben den Lösemittelkontrollen auch einige Testsubstanzen eingesetzt werden sollten, die potentiell inaktiv sind.

4.3.1 Östrogen Rezeptor α Transaktivierungstest

Im GeneBLazer DA Östrogen Rezeptor A Test wurden folgende Substanzen getestet: Östradiol, BPA(99), BPZ(66), Biphenyl-4-ol (20), BPTMC (91), PHBB (7), 4,4-Thiodiphenol (21), BPS (8), BPC (3), BPF(2), Pergafast® 201 (16).

Abbildung 21: Dosis-Wirkungskurven im GeneBLazer DA Östrogen Rezeptor α Test



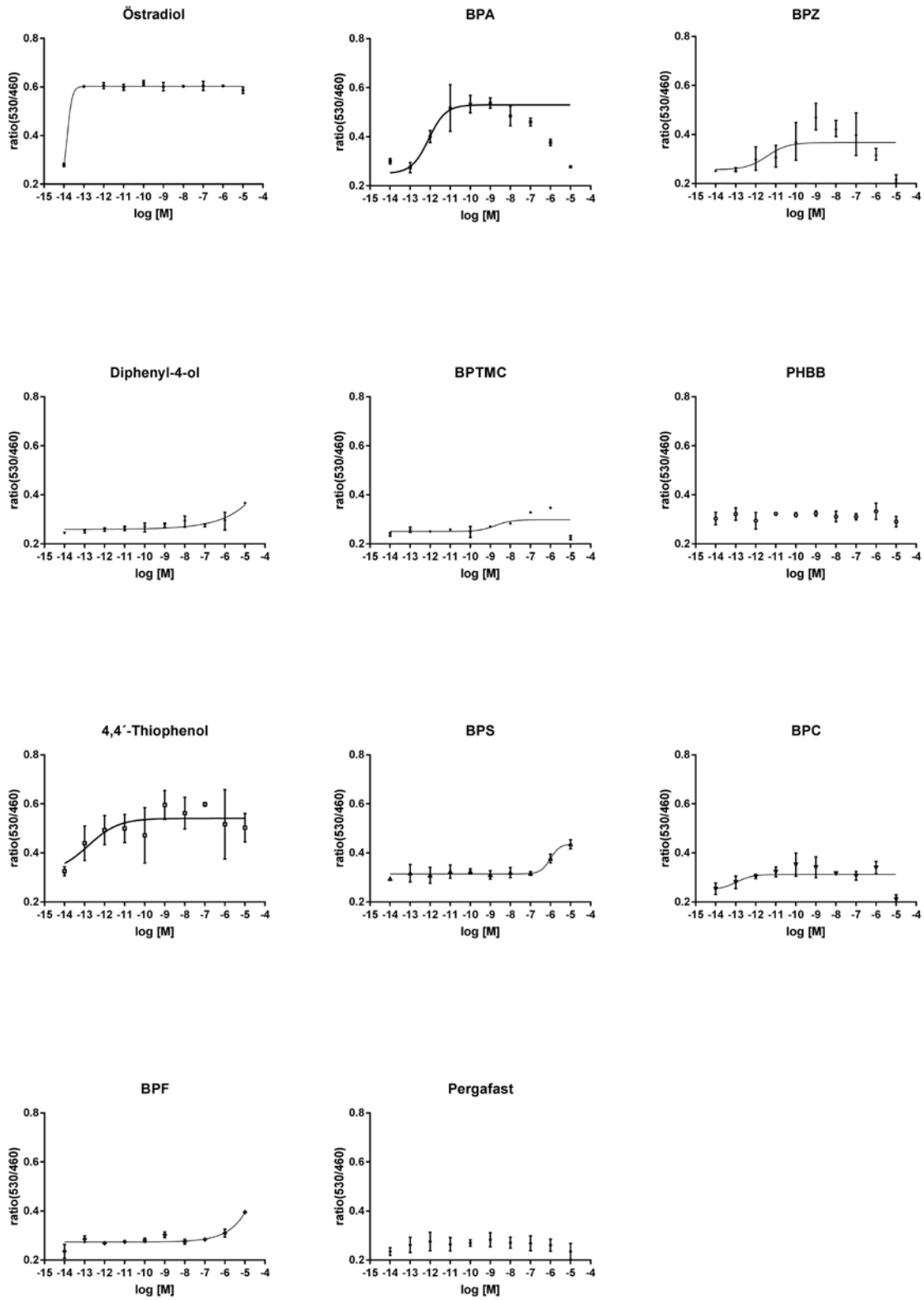
Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Signalentwicklung (Ratio (530/460)) als Indikator für die Reporter-Genexpression (β -Lactamase). Als Referenz-Agonist wurde Östrogen parallel zu den BPA-Alternativen getestet.

Abbildung 21 zeigt die Dosis-Wirkungskurven des natürlichen Liganden Östradiol, sowie von BPA und Pergafast® 201. Daraus wurde für Östradiol ein EC_{50} -Wert von 0,1 fM ermittelt, während der EC_{50} -Wert für BPA mit 0,8 pM ($8,3 \cdot 10^{-13}$ M) ermittelt wurde. Pergafast® 201 zeigte keine Aktivierung. Weitere BPA-Substitutionskandidaten, die eine Aktivierung der Genexpression zeigten sind BPZ, 4,4'-Thiodiphenol, sowie BPC (Tabelle 20).

Tabelle 20: Ergebnisse des GeneBLazer Östrogen Rezeptor A Tests

Testsubstanz (Nr.)	EC_{50}	AUC (Area)	Rel. AUC (%)
Östradiol (100)	< 1E-13 M	3,20	100
BPA (99)	8,3E-13 M	1,80	56,3
BPZ (66)	3,7E-12 M	1,02	31,9
Biphenyl-4-ol (20)	> 10 μ M	0,41	12,8
BPTMC (91)	0,2 μ M	0,41	12,8
PHBB (7)	n.a. (inaktiv)	0,11	3,4
4,4'-Thiodiphenol (21)	1,6E-13 M	2,52	78,8
BPS (8)	0,97 μ M	0,89	27,8
BPC (3)	1E-13 M (Kurvenverlauf uneindeutig)	0,73	22,8
BPF (2)	0,4 M	0,53	16,6
Pergafast (16)	n.a. (inaktiv)	0,274	8,4

Abbildung 22: Dosis-Wirkungskurven GeneBLAzer DA Östrogen Rezeptor A Test (alle Testsubstanzen)

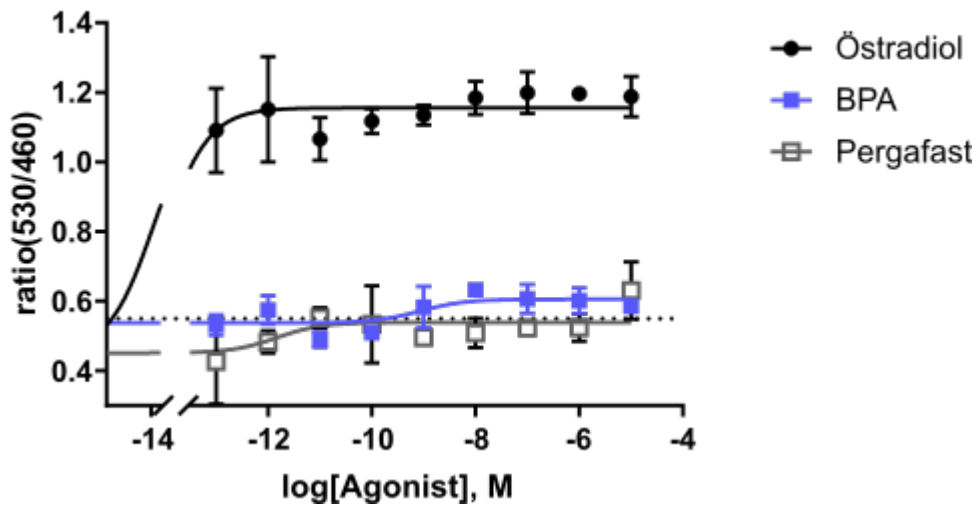


4.3.2 Östrogen Rezeptor β Transaktivierungstest

Im GeneBLazer DA Östrogen Rezeptor β Test wurden folgende Substanzen getestet: Östradiol, BPA(99), BPZ(66), Biphenyl-4-ol (20), BPTMC (91), PHBB (7), 4,4-Thiodiphenol (21), BPS (8), BPC (3), BPF(2), Pergafast® 201 (16).

Abbildung 23 zeigt die Dosis-Wirkungskurven des natürlichen Liganden Östradiol sowie von BPA und Pergafast® 201. Daraus wurde für Östradiol ein EC_{50} -Wert 0,1 fM ermittelt, während BPA und Pergafast® 201 inaktiv sind. Keiner der getesteten Substitutionskandidaten zeigte eine Aktivierung der Genexpression bei physiologisch relevanten Konzentrationen (Tabelle 21).

Abbildung 23: Dosis-Wirkungskurven im GeneBLazer DA Östrogen Rezeptor β Test

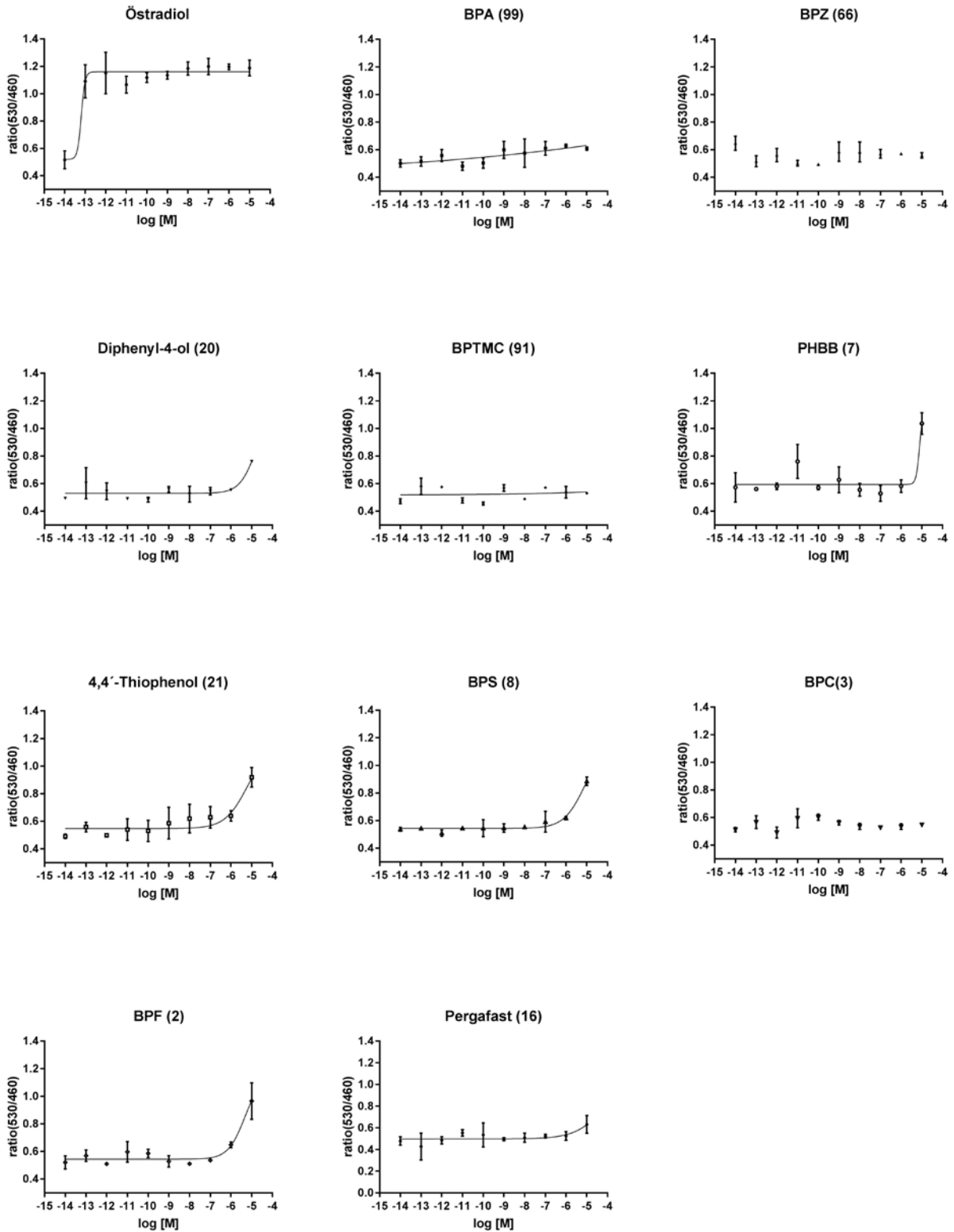


Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Signalentwicklung (Ratio(530/460)) als Indikator für die Reporter-Genexpression (β -Lactamase). Als Referenz-Agonist wurde Östrogen parallel zu BPA-Alternativen getestet.

Tabelle 21: Ergebnisse des GeneBLazer Östrogen Rezeptor β Tests

Testsubstanz (Nr.)	EC_{50}	AUC (Area)	Rel. AUC (%)
Östradiol (100)	< 1E-13 M	5,49	100
BPA (99)	> 100 μ M	0,54	9,8
BPZ (66)	n.a. (inaktiv)	0,50	9,1
Biphenyl-4-ol (20)	~ 16 μ M	0,46	8,4
BPTMC (91)	n.a. (inaktiv)	0,35	6,4
PHBB (7)	8 μ M	1,07	19,5
4,4'-Thiodiphenol (21)	6 μ M	0,81	14,8
BPS (8)	8 μ M	0,67	12,2
BPC (3)	n.a. (inaktiv)	0,44	8,0
BPF (2)	5 μ M	0,73	13,3
Pergafast (16)	> 100 μ M	0,29	5,2

Abbildung 24: Dosis-Wirkungskurven GeneBLAzer DA Östrogen Rezeptor β Test (alle Testsubstanzen)



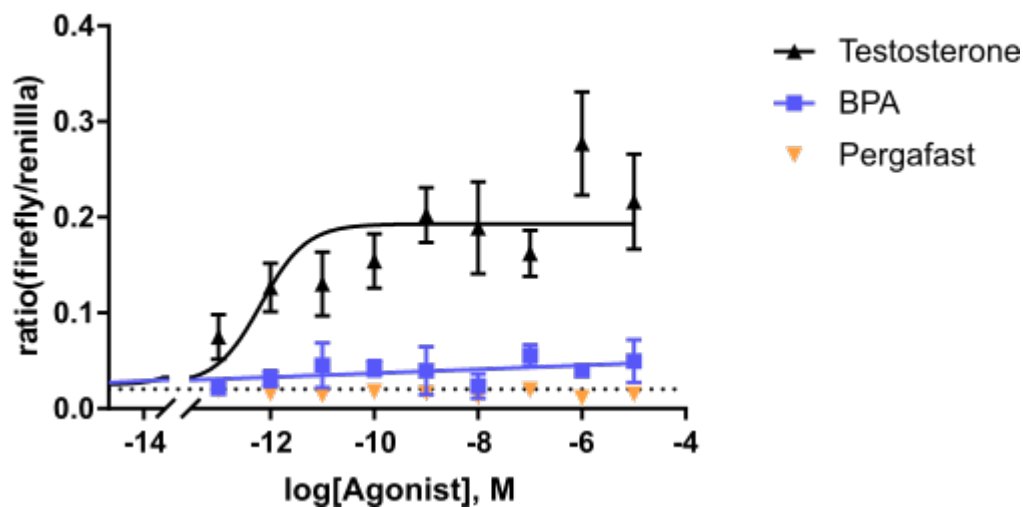
4.3.3 Androgen Rezeptor Transaktivierungstest

Die Verdünnung der Testsubstanzen erfolgte wie unter Kapitel 2.2.3.3 beschrieben. Als Referenz-Agonist wurde Testosteron (statt Östradiol) eingesetzt. Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgte über Nacht für 16 h.

Zur Analyse der Daten wurde der Quotient aus dem Firefly-/Renilla-Signal gebildet und diese entsprechend zu Konzentration mittels GraphPad Prism wie schon zuvor beschrieben modelliert.

Von den getesteten Substanzen induzierte lediglich der natürliche Ligand Testosteron die Genexpression. Sowohl BPA, als auch die Substitutionskandidaten waren in diesem Testsystem ohne Wirkung.

Abbildung 25: Dosis-Wirkungskurven aus dem Androgen Rezeptor Transaktivierungstest



Dargestellt ist die konzentrationsabhängige Signalentwicklung (Ratio(Firefly/Renilla)) als Indikator für die Reporter-Genexpression. Als Referenz-Agonist wurde Testosteron parallel zu BPA-Alternativen getestet. Der ermittelte EC_{50} -Wert für Testosteron liegt bei 6,7 pM, während BPA und Pergafast® 201 inaktiv sind.

Tabelle 22: Ergebnisse des Androgen Rezeptor Transaktivierungstest

Testsubstanz (Nr.)	EC_{50}	AUC (Area)	Rel. AUC (%)
Testosteron	6,7 pM	1,44	100
BPA (99)	inaktiv	0,34	23,6
BPZ (66)	inaktiv	0,17	11,8
Biphenyl-4-ol	inaktiv	0,19	13,2
Bisphenol FL	inaktiv	0,14	9,7
DMT	inaktiv	0,42	29,2
4,4'-Thiodiphenol (TDP)	inaktiv	0,32	22,2
BPS (8)	inaktiv	0,29	20,1
BPC (3)	inaktiv	0,25	17,4
BPF (2)	inaktiv	0,17	11,8
Pergafast (16)	inaktiv	0,14	9,7

5 Beurteilung des endokrinen Gefahrenpotentials der Alternativsubstanzen

Das endokrine Potential wurde aufgrund der durchgeführten *in vitro*-Tests für die ausgewählten Testsubstanzen beurteilt. Dabei wurde ein Augenmerk auf die anti-/östrogene und die anti-/androgene Wirkung gelegt.

Die Ligandenbindungs-Tests zeigen für mehrere BPA-Alternativen eine hohe Affinität zu den drei getesteten Kernrezeptoren, die allerdings in keinem Fall höher war als die des natürlichen Liganden. Verglichen mit BPA zeigten allerdings 14 Substanzen eine höhere Affinität zum Androgenrezeptor. Im Gegensatz dazu konnte für die Östrogenrezeptoren lediglich eine Substanz mit höherer Affinität als BPA (4,4'-Thiodiphenol) gefunden werden. Hinsichtlich der Aussagefähigkeit des Ligandenbindungs-Testsystems ist anzumerken, dass durch diese nur die Bindung der Substanzen in die Ligandenbindetasche quantifiziert werden kann. Eine Aussage hinsichtlich der Bindung an alternative Bindestellen, die auf der Ligandenbindedomäne bekannt sind (Tice and Zheng 2016), kann damit nicht getroffen werden. Da nur Substanzen in den nachfolgenden Testsystemen untersucht wurden, die eine eindeutige Bindung in die Ligandenbindetasche zeigten, besteht die Möglichkeit, dass anti-/androgene, bzw. anti-/östrogene Effekte von BPA-Substitutionskandidaten, die an alternative Bindestellen binden, hier übersehen wurden.

Darüber hinaus ist die Bindung der Substanzen in die Ligandenbindetasche ein notwendiges, aber nicht hinreichendes Kriterium für die endokrine Wirkung einer Substanz. Die Untersuchung der liganden-vermittelten Rekrutierung der Koaktivatoren, sowie der Zielgenexpression zeigte, dass selbst hochaffine Liganden nicht in allen Fällen zu einer Koaktivator-Bindung, bzw. der Expression der Zielgene in den Zellen führen. Lediglich für den Östrogenrezeptor α konnte eine substantielle Aktivierung der Genexpression bei sehr niedrigen Konzentrationen für einen BPA-Substitutionskandidaten (4,4'-Thiodiphenol) nachgewiesen werden. Alle anderen Substitutionskandidaten aktivieren die Genexpression über den Östrogenrezeptor α nur bei deutlich höheren Konzentrationen ($>0,2 \mu\text{M}$).

Für den Östrogenrezeptor β wurden mehrere Substanzen identifiziert, die eine substantielle Rezeptoraktivierung bereits bei bis zu 20-fach geringeren Konzentrationen als BPA induzieren, allerdings liegen die EC_{50} -Werte dieser Substanzen immer noch um mehrere Größenordnungen über dem des natürlichen Liganden.

Von den acht in allen Transaktivierungs-Assays untersuchten Substanzen (4,4'-Thiodiphenol, Bisphe-nyl-4-ol, BPA, BPC, BPF, BPZ, Pergafast® 201) konnte lediglich für Pergafast® 201 keine Aktivierung in allen drei Testsystemen bei physiologisch relevanten Konzentrationen ermittelt werden. Alle anderen Substanzen zeigten entweder in zwei (4,4'-Thiodiphenol, Bisphe-nyl-4-ol, BPS, BPF) oder zumindest einem (BPA, BPZ, PHBB) Testsystem eine Aktivität. Die beiden in zwei Transaktivierungs-Assays getesteten Substanzen (PHBB, BPTMC) wiesen jeweils in einem Test ein östrogenes Potential auf. Die lediglich im AR getestete Substanz DMT zeigte in diesem Test kein androgenes Potential

Ein antiandrogenes, bzw. antiöstrogenes Potential ist aufgrund der Koaktivator-Rekrutierungstests unwahrscheinlich, da die Substanzen entweder keinen Effekt, oder nur bei hohen Konzentrationen ($\geq 100 \mu\text{M}$) einen Effekt zeigten. Allerdings kann ein endokrines Potential erst nach einer Testung der Inhibition der Genexpression ausgeschlossen werden.

Die biochemischen, bzw. zell-basierten Testsysteme wurden in dieser Studie mit Kernrezeptoren des Menschen, bzw. der Ratte durchgeführt. Daher sind Aussagen über die anti-/androgenen, bzw. anti-/östrogenen Effekte auf andere Organismen nicht abzuschätzen. Die Proteinsequenzidentität der Ligandenbindedomäne zwischen dem Östrogenrezeptor α des Menschen und dem Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) liegt beispielsweise bei 84 %, zwischen Mensch und Zebrafisch (*Danio rerio*) bei lediglich noch 64 %. Da es für Amphibien und Fische deutliche Hinweise auf eine höhere Suszeptibilität gegenüber

Chemikalien gibt, ist eine endokrine Wirkung der in dieser Studie getesteten Substanzen nicht auszuschließen und bedarf daher weitergehender Untersuchungen.

Allerdings zeigt der Vergleich der Aktivität von BPA in den hier durchgeführten Tests mit den Daten, die für Fische und Amphibien in der Literatur vorliegen, große Übereinstimmungen. In den hier beschriebenen Tests zeigte BPA sowohl in dem Fluoreszenzpolarisationstest, im Koaktivator-Rekrutierungstest und im Transaktivierungstest für den Östrogenrezeptor α ein hohes agonistisches Potential. Im Review von Mathieu-Denoncourt et al. (2015) sind die Effekte von BPA auf Reproduktion und Geschlechterverhältnis in Fischen und Amphibien detailliert dargestellt. Analog zu den hier erhobenen Daten wird deutlich, dass BPA auch Fisch- und Amphibienspezies hauptsächlich den Östrogenrezeptor aktiviert. So wird zum Beispiel in *Xenopus laevis* die Genexpression von Östrogenrezeptor-regulierten Genen wie dem $ER\alpha$, der Aromatase und des Eidotter-Vorläuferproteins Vitellogenin aktiviert. Einen Anstieg der Vitellogenin-Expression wurde auch in unterschiedlichen Fischarten nachgewiesen, wie zum Beispiel im Schwertfisch, der Regenbogenforelle, dem Zebrafisch und der Dickkopflurche. Mathieu-Denoncourt et al. (2015) beschreibt es als allgemeinen Konsensus, dass die endokrine Aktivität von BPA in Fischen und Amphibien, in Übereinstimmung zu Daten in Säugern, auf der agonistischen Wirkung auf den $ER\alpha$ beruht. Auch ein Einfluss von BPA auf das Geschlechterverhältnis bei Fischen und Amphibien wird der Bindung des BPA an den Östrogenrezeptor und einer daraus resultierenden Steigerung der Östrogenrezeptor-Genexpression zugeschrieben.

6 Annex 1

Tabelle 23: Vollständige Liste der potentiellen BPA-Alternativstoffe

No.	Bisphenol A Alternative Abkürzung	Chemischer Name	Cas-No.	Patentalter (oder Entwickler)	Patent Dokument EP-/WO Dokument	Potentielle Verwendung	Handelsname	Umwelt-Relevanz	Referenz	Kommentare
2	BPF-para	Bisphenol F - para (4,4'-methylenediphenol)	620-92-8			Thermopapier		Ja	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014)	BPA frei
3	BPC	Bisphenol C (2,2-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane)	79-97-0			Substanz mit lebensmittelkontakt (Blechdosen); Entwickler in Thermopapier		Ja	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014; Yamaguchi et al. 2015)	BPA frei
4	MBHA	Methyl bis(4-hydroxyphenyl)acetate	5129-00-0			Thermopapier		Ja	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014)	BPA frei
5	BisOPP-A; Bisphenol PH	Bisphenol PH (2,2-Bis(2-hydroxy-5-biphenyl)propane, 2,2-Bis(4-hydroxy-3-phenylphenyl)propane, 2,2-(5,5'-Bis[1,1'-(biphenyl)-2-ol])propane, 5,5'-(1-Methylethylidene)bis[(1,1'-biphenyl)-2-ol], 5,5'-Isopropylidenedi-2-biphenylol)	24038-68-4			Thermopapier		Ja	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014)	BPA frei
6	BPAP	Bisphenol AP (4,4'-(1-Phenylethylidene)bisphenol)	1571-75-1			Thermopapier		Ja	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014)	BPA frei
7	PHBB	Benzyl 4-hydroxybenzoate	94-18-8			Thermopapier		Ja	(Cheng and Bedford 2011)	Bisphenol frei
8	BPS	4,4'-Sulfonyldiphenol	80-09-1			Thermopapier		Ja	(Danish-EPA 2014; Goldinger et al. 2015; US-EPA 2014)	BPA frei

No.	Bisphenol A Alternative Abkürzung	Chemischer Name	Cas-No.	Patenthalter (oder Entwickler)	Patent Dokument EP-/WO Dokument	Potentielle Verwendung	Handelsname	Umwelt-Relevanz	Referenz	Kommentare
9	2,4-BPS	2,4'-DIHYDROXYDIPHENYL SULFONE	5397-34-2			Thermopapier		Ja	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014; Yang et al. 2017)	BPA frei
10	TGSA	Bis(3-allyl-4-hydroxyphenyl)sulfone	41481-66-7			Thermopapier		Ja	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014; Yang et al. 2017)	BPA frei
11	BPS-MAE	Propenyloxy)phenylsulfonyl]phenol bis(4-hydroxyphenyl)sulfone monoallyl ether	97042-18-7			Thermopapier		Ja	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014; Yang et al. 2017)	Bisphenol frei
12	BPS-MPE	p-[[p-benzyloxyphenyl]sulfonyl]phenol	63134-33-8			Thermopapier		Ja	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014; Yang et al. 2017)	Bisphenol frei
13	D-8	4-(4-isopropoxyphenylsulfonyl)phenol	95235-30-6			Thermopapier		Ja	(Danish-EPA 2014; Goldinger et al. 2015; US-EPA 2014)	Bisphenol frei
14	D-90; BPSIP	4-hydroxyphenyl 4-isopropoxyphenylsulfone	19168-0-83-8			Thermopapier		Ja	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014)	BPA frei
15	DD-70	oxybis[2-chloroethane)	93589-69-6			Thermopapier		Ja	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014)	BPA frei
16	Pergafast 201	Benzenesulfonamide 4-methyl-N-[[[3-[[[4-methylphenyl]sulfonyl]oxy]phenyl]amino]carbonyl]-	23293-8-43-1			Thermopapier		Ja	(Danish-EPA 2014; Goldinger et al. 2015; US-EPA 2014)	Phenol frei

No.	Bisphenol A Alternative Abkürzung	Chemischer Name	Cas-No.	Patenthalter (oder Entwickler)	Patent Dokument EP-/WO Dokument	Potentielle Verwendung	Handelsname	Umwelt-Relevanz	Referenz	Kommentare
17	BTUM	4,4'-bis(N-carbamoyl-4-methylbenzenesulfonamide)diphenylmethane	15188 2-81-4			Thermopapier		Ja	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014)	Phenol frei
18	UU	Urea-urethane Compound	32186 0-75-7			Thermopapier		Ja	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014)	Phenol frei
19	BPF - ortho	2,2'-Methylenediphenol (Bisphenol F - ortho)	2467-02-9			Thermopapier		Ja	(ECHA 2016)	BPA frei
20	Biphenyl-4-ol	4-phenylphenol	92-69-3			Thermopapier		Ja	(ECHA 2016; Sun et al. 2008)	BPA frei
21	TDP	4,4'-Thiodiphenol	2664-63-3	The Dow Chemical Company	US5532331 (Polycarbonat)	Polycarbonat		In Polycarbonaten nicht relevant	(ECHA 2016)	BPA frei
22	4-tert-Butylphenol	4-tert-Butylphenol	98-54-4			Plastikrohre		Ja, wenn für Wasserleitungen genutzt	(ECHA 2016; Sun et al. 2008)	BPA frei
23	Ethylparaben	Dimethyl 4-hydroxybenzoate; Ethyl 4-hydroxybenzoate	120-47-8	PPG Industries Ohio, Inc	US 20070281179 A1	Polyester aus dem Produkt eines Polyols und eines Bis-Epoxys, Blechdosen		Eher nein	(ECHA 2016)	Phenol frei
24	DMP-OH	Dimethyl 4-hydroxyphthalate	22479-95-4	Mitsubishi Paper Mills, Ltd.	US4507671 A	Thermopapier (eher weniger geeignet)		Ja	(ECHA 2016)	Phenol frei
25	3,5-di-ter-butylsalicylic acid	3,5-di-ter-butylsalicylic acid	19715-19-6			Thermopapier (weniger geeignet aufgrund der chemischen Eigenschaften)		Ja	(ECHA 2016)	Phenol frei
26	Zinc 3,5-bis(α-methylbenzyl)salicylate	Zinc 3,5-bis(α-methylbenzyl)salicylate	53770-52-8			Thermopapier (eher weniger geeignet)		Ja	(ECHA 2016)	Phenol frei
27	CHDM (1,4-cyclohexanedimethanol)					Plastik, Harze		Eher nein	Kyunghee et al., (SETAC Nantes)	Phenol frei
28	Isosorbid		652-67-5	Michael Jaffe; New Jersey Institute of Technology		Blechdosen /Konservendosen		Eher nein	INERIS	Naturstoff

No.	Bisphenol A Alternative Abkürzung	Chemischer Name	Cas-No.	Patenthalter (oder Entwickler)	Patent Dokument EP-/WO Dokument	Potentielle Verwendung	Handelsname	Umwelt-Relevanz	Referenz	Kommentare
29	Eastman Tritan Copolyester					Blechdosen		Eher nein		Phenol frei
30	Octamethylcyclotetrasiloxane (D4); Decamethylcyclopentasiloxane (D5)					Epoxidharze		Für Außenanwendungen ja		Phenol frei
31	2-Phenyl-1,3-propanediol-Diglycidylether-derivate			BASF SE, 67056 Ludwigshafen	WO0020140722 16A1	Epoxidharze für Blechdosenbeschichtungen		Eher nein	Patentdatenbank	Bisphenol frei
32	Glycidylether von Divinylbenzol-Derivaten und weitere Oligomere von Glycidylether			BASF SE, 67056 Ludwigshafen	WO0020150222 53A1	Epoxidharz-Alternativen für BADGE für Dosenbeschichtungen		Eher nein	Patentdatenbank	Bisphenol frei
33	CBDO	2,2,4,4-Tetramethyl-1,3-cyclobutanediol	3010-96-6	Eastman		Tritan™ Copolyester		Als inertes Polymer eher nein	INERIS	Phenol frei, Diol für Polyester
34	CBDO	2,2,4,4-Tetramethyl-1,3-cyclobutanediol	3010-96-6			Anwendungen für Epoxidharze zusätzlich zu Blechdosen		Ja, wenn für Außenanwendungen genutzt	INERIS	Phenol frei, Diol für Polyester
35	Isosorbid		652-67-5			Alternative für BPA für Polykarbonate und Polyester-Synthese	DURABIO	Möglich	INERIS, Techn. Inst. New Jersey, ANSES report	Phenol frei
36	Polyester extrahiert von Tomatenhaut	Extraktion aus Cutin von Tomatenhaut und Produktion von Polyester-Harzen aus diesen biologischen Polymeren		2 Patente, Biocopac project		Lebensmittelverpackung		Eher nein	INERIS: European projet BIOCOPAC	Naturstoff
37	TDHA	Tetradecahydroanthracene (Anthracene, tetradecahydro)	6596-35-6	Zwei patente in 2012.		Alternative zu BPA-basierten Polymeren oder Polykarbonaten		Als inertes Polymer eher nein	INERIS	Phenol frei

No.	Bisphenol A Alternative Abkürzung	Chemischer Name	Cas-No.	Patenthalter (oder Entwickler)	Patent Dokument EP-/WO Dokument	Potentielle Verwendung	Handelsname	Umwelt-Relevanz	Referenz	Kommentare
				16.11.2016 (Dr. Brenden Carlson and Dr. Gregory Phelan. EMPIRE TECHNOLOGY DEVELOPMENT (LLC))						
38	Tannin, biobasiert					Epoxidharze, Dosen, Luftfahrt, Abwehr, Isolierung, acrylischer Klebstoff		Ja (für Außenanwendungen)	INERIS, I-NEA/ENSCM	Naturstoff
39	Leinsamenöl			DRAGON-KRAFT		Bootsbau	UVL-Eco Resin	Ja	INERIS, DRAGONKRAFT	Naturstoff
40	Marine Braunalgen					Sonnenbrillen, Polykarbonate		?	INERIS	Naturstoff
41	BPS Alternative	Hydroxy-benzene-Disulfonsäurepolymer		EURODYECTC		Textil: Fisierungsmittel für Polyamin-Fasern = Produkt basiert auf Hydroxy benzene disulfonsäure-Polymer mit Formaldehyd, Phenol und Harnstoff	Croscolor NRF	Ja, für Kläranlagen	INERIS	BPA frei
42	A® free (Vitamin C)	Vitamin C (Ascorbinsäure)		APPVION Company		Thermopapier, Farbentwickler		Ja	INERIS	Phenol frei
43	Marine Braunalgen			ALGOPACK		"ALGOBLEND", Lebensmittelbehälter: Bioplastik basierend auf marinen Braunalgen	ALGOBLEND	Nein	INERIS	Naturstoff
44	Polyurethan-Harz			KEMICA		Polyurethan-Harz, Heißwasserzylinder, Warmwasserrohre (Heizsysteme)	Souplethane WP	Ja	INERIS, ANSES Report 2013	Phenol frei
45	Polyurethan-Harz			KEMICA		Polyurethan-Harz Waschmaschinen Abwasser, industrielle Wasserleitungen, Seewasserleitungen.	Souplethane WP	Ja	INERIS, ANSES Report 2013	Phenol frei

No.	Bisphenol A Alternative Abkürzung	Chemischer Name	Cas-No.	Patenthalter (oder Entwickler)	Patent Dokument EP-/WO Dokument	Potentielle Verwendung	Handelsname	Umwelt-Relevanz	Referenz	Kommentare
46	Polyamid			EMS-GRI-VORY		Polyamid: Lebensmittelbehälter, Sanitärbedarf, elektronische Geräte	GRIMALID TR 55 / GRIMALID TR 90	Ja ?	INERIS	Phenol frei
47				Equipolymer		Hitzeflexible Materialien, PETs ohne BPA für Flaschen (Wasser), große Getränkeverpackungen	BISNOEX	Eher nein	INERIS	BPA frei
48	?	?		Société Inventive Solutions		Keine Information	SPR resin		INERIS, ANSES Report 2013	
49	Copolymer basierend auf Styren und Butadien Monomeren	Styren Butadien	100-42-5 106-99-0	CVI MODERN TECHNOLOGY DEVELOPMENT LTD		Haushaltsanwendungen, Teile von Gefriertruhen	TSC-M copolymer	Eher nein	INERIS	Bisphenol frei
50	Copolyester (DMT und CHDM und TMCD = CBDO))	Dimethylterephthalat, Cyclohexanedimethanol 2,2,4,4-Tetramethyl-1,3-cyclobutanediol	120-61-6 105-08-8 3010-96-6	EASTMAN		Haushaltsanwendungen, Behälter für kleine Anwendungen (z.B. Mixer, etc.), Wasserkanister	TRITAN	Eher nein	INERIS	Phenol frei
51	Copolyester (PTA+CHDM+Ethylenglycol + Iso-sorbid)			SK CHEMICALS		Kosmetikflaschen, Polykarbonate	ECOZEN	Eher nein	INERIS	Phenol frei
52	Polypropylen	??		BOREALIS		Kosmetikflaschen, Polykarbonate	BORCLEAR RC737MO	Eher nein	INERIS	Phenol frei
53	Hydrogeniertes BPA (Zykloaliphatischer Typ)			MATOX TECHNOLOGIES		Alternative zu BPA-basierten Polykarbonaten		Eher nein	INERIS	BPA frei
54	Alkylierte BPA-basierte Polykarbonate			MATOX TECHNOLOGIES		Alternative zu BPA-basierten Polykarbonaten		Eher nein	INERIS	BPA frei

No.	Bisphenol A Alternative Abkürzung	Chemischer Name	Cas-No.	Patenthalter (oder Entwickler)	Patent Dokument EP-/WO Dokument	Potentielle Verwendung	Handelsname	Umwelt-Relevanz	Referenz	Kommentare
55	Bisphenol F (Novolac glycidyl ether (NOGE) Harze basierend auf BPF)	Bisphenol F - para (4,4'-methylenediphenol)	620-92-8	Hempel		Agrarlebensmittel-Produktion; Beschichtungen für Container, Tanks zur Produktion und Aufbewahrung von Lebensmittelverarbeitungsprodukten, Silos und LKW zur Aufbewahrung von Lebensmittels (Zucker, Trocken- oder Feuchtprodukten) oder Plastikgranulaten	HEMPEL BPA FREI 37301			BPA frei
56	Polyester Harze	?		CRODA COATINGS		Agrarlebensmittel-Produktion, metallische Teile der Produktion	PRYPOL F®			Phenol frei
57	Hydrochinon	1,4-dihydroxybenzene	123-31-9			Blechdosen		Als inertes Polymer eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	Bisphenol frei
58	2,2-BPF	2,2-bisphenol F				Tin cans		Eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	BPA frei
59	2-phenyl-1,3-propanediol	2-phenyl-1,3-propanediol		BASF SE, 67056 Ludwigshafen	US02014012850 3A1 CN00010476899 9A MX0020150058 66A	2-Phenyl-1,3-propanediol diglycidyl ether-Derivate und härtbare Epoxidharz-Zusammensetzungen, als Alternative zu BPA und BPF Diglycidyl-Ether und deren Epoxid-Harz Kompositionen		Als inertes Polymer eher nein	Patentdatenbank	
60	Acrylsäure	prop-2-enoic acid	79-10-7			Acryle			(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	Phenol frei
61	Acrylonitril		107-13-1			Polyacrylonitril			(Ng et al. 2015)	Phenol frei

No.	Bisphenol A Alternative Abkürzung	Chemischer Name	Cas-No.	Patenthalter (oder Entwickler)	Patent Dokument EP-/WO Dokument	Potentielle Verwendung	Handelsname	Umwelt-Relevanz	Referenz	Kommentare
62	BPAF (Bisphenol AF)	4-[1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-(4-hydroxyphenyl)propan-2-yl]phenol	1478-61-1			Plastikprodukte, Lebensmittel und Medikamentenverpackungen		Eher nein	Begleitende Informationen (Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	BPA frei
63	BPB (Bisphenol B)	2,2-bis(4-hydroxyphenyl)butane	77-40-7			Lebensmittel- und Getränkebehälter-Beschichtungen		Eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	BPA frei
64	BPE (Bisphenol E)	1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)ethane	2081-08-5			Lebensmittel- und Getränkebehälter-Beschichtungen		Eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	BPA frei
65	BPP (Bisphenol P)	4,4'-[1,3-Phenylbis(1-methylethyliden)]bisphenol	2167-51-3			Lebensmittel- und Getränkebehälter-Beschichtungen		Eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	BPA frei
66	BPZ (Bisphenol Z)	4,4'-Cyclohexyldienbisphenol	843-55-0	Bayer AG; Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.	EP0413190 A2; DE60207611 T2	Polykarbonate; Thermoplast-Harze		Ja, wenn für Thermopapier genutzt	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	BPA frei
67	cis-CHDM	cis-1,4-Cyclohexanedimethanol	3236-47-3			Eastman's Tritan, Copolyester/polyethylene, Terephthalatglycol		Als inertes Polymer eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	Phenol frei
68	cis-TMCD	cis-2,2,4,4-Tetramethyl-1,3-cyclobutanediol	3010-96-6			Eastman's Tritan Copolyester		Als inertes Polymer eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	Phenol frei

No.	Bisphenol A Alternative Abkürzung	Chemischer Name	Cas-No.	Patenthalter (oder Entwickler)	Patent Dokument EP-/WO Dokument	Potentielle Verwendung	Handelsname	Umwelt-Relevanz	Referenz	Kommentare
69	Diamino phthalocyanin	Diaminophthalocyanin		RANK XEROX LTD, GB	GB00000115265 5A	Härtung und Vernetzung von Epoxidharzen		Eher nein	Patentdatenbank	Phenol frei
70	Divinylbenzen	Divinylbenzen		BASF SE, 67056 Ludwigshafen	US02016019443 6A1 TW0002015099 24A	Divinylbenzen-basierte Diole und Polyole, und basierende härtbare Epoxidharze als Alternativen zu BPA Diglycidyl-Ether oder BPF Diglycidyl-Ether		Eher nein	Patentdatenbank	Phenol frei
71	D(-)-Laktatsäure	2-Hydroxypropanonsäure	10326-41-7			Polylaktatsäure			(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	Phenol frei
72	DMT	dimethyl terephthalate	120-61-6			Eastman's Tritan, Copolyester/Polyethylen, Terephthalate/Polyethylen, Terephthalate Glycol		Eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	Bisphenol frei
73	HPP	4-Cumylphenol	599-64-4			Chain terminator and molecular weight modifier in polycarbonates; Thermopapier		Ja, wenn für Thermopapier genutzt	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	BPA frei
74	„Isophthalic...“	Isophthalsäure/ester ?		OSMA PLASTICS LTD	GB00000121445 3A	...ein isophtalisches oder BPA Polyester-Harz-Gemisch...		Eher nein	Patentdatenbank	Phenol frei
75	Lignocellulose Material aus Zeder, Eukalyptus, Bambus		9005-53-2			Biobasierte Epoxidharze		Ja (für Aussenanwendungen)	(Asada et al. 2015)	Phenol frei
76	Limonen	Limonen		BASF SE, 67056 Ludwigshafen	US02016019429 7A1 TW0002015099 36A	Glycidyl-Ether aus Limonen-basierten Diolen und/oder Polyolen und darauf basierenden härtbaren Epoxidharzen als Alternativen zu BPA Diglycidyl-Ether oder BPF-Diglycidyl-Ether			Patentdatenbank	Naturstoff

No.	Bisphenol A Alternative Abkürzung	Chemischer Name	Cas-No.	Patenthalter (oder Entwickler)	Patent Dokument EP-/WO Dokument	Potentielle Verwendung	Handelsname	Umwelt-Relevanz	Referenz	Kommentare
77	L(+)-Laktatsäure	2-Hydroxypropanonsäure	79-33-4			Polylactat-Säure		Als inertes Polymer eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	Phenol frei
78	Methacryl-Säure	2-Methylprop-2-enonsäure	79-41-4			Poly(methyl methacrylat)		Als inertes Polymer eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	Phenol frei
79	Methylmethacrylat		80-62-6			Poly(methyl methacrylat)		Als inertes Polymer eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	Phenol frei
80	n-Alkyl Diphenolate Diglycidyl Ether					Diphenyl-Säure (DPA) basierte Harze		Ja (für Außenanwendungen)	(Maiorana et al. 2015)	Bisphenol frei
81	Norbornen	Bicyclo[2.2.1]hept-2-ene	498-66-8			Zyklisches Olefin-Polymer, Zyklisches Olefin-Copolymer		Als inertes Polymer eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	Phenol frei
82	Styren	Ethenylbenzen	100-42-5			Polystyrene		Als inertes Polymer eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	Bisphenol frei

No.	Bisphenol A Alternative Abkürzung	Chemischer Name	Cas-No.	Patenthalter (oder Entwickler)	Patent Dokument EP-/WO Dokument	Potentielle Verwendung	Handelsname	Umwelt-Relevanz	Referenz	Kommentare
83	Substanzen wie rechts beschrieben oder Mischungen daraus	Resorcinol, 4-Chlororesorcinol, 4-Ethylresorcinol, phenol phthalein, 2,21-, 3,31- or 4,41-Dihydroxydiphenyl sulphon, 2,2-bis-(3,5-Dichloro-4-hydroxy phenyl) propane or 1,5-Dihydroxynaphthalene (oder Bisphenol A muss aber nicht)		MONSANTO CHEMICALS	GB00000131927 5A	“The polyester may be one prepared by the reaction of resorcinol, bisphenol A, 4-chlororesorcinol, 4-ethylresorcinol, phenol phthalein, 2,21-, 3,31- or 4,41-dihydroxydiphenyl sulphone, 2,2-bis-(3,5-dichloro-4-hydroxy phenyl) propane or 1,5-dihydroxy naphthalene or a mixture thereof with isophthaloyl or terephthaloyl chloride or a mixture thereof.”		Als inertes Polymer eher nein	Patentdatenbank	
84	TCBBPA	Tetrachlorobisphenol A	79-95-8	Eastman Kodak Co	US3038874 A	Flammenschutzmittel, Polykarbonat		Als inertes Polymer eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	BPA frei
85	TMBPA	Tetramethylbisphenol A	5613-46-7			Polymer, Polykarbonat/Polystyren		?	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	BPA frei
86	TPA	Terephthalsäure; Benzene-1,4-dicarboxylsäure	100-21-0			Gängiges Monomer für Polyester (incl. Eastman's Tritan Copolyester), auch als gängiger Säuger-Metabolit aus DMT		Als inertes Polymer eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	Phenol frei
87	trans-CHDM	trans-1,4-Cyclohexanedimethanol	3226-48-4			Eastman's Tritan, Copolyester/Polyethylen, Terephthalat-Glycol		Als inertes Polymer eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	Phenol frei
88	trans-TMCD	trans-2,2,4,4-Tetramethyl-1,3-cyclobutanediol	3010-96-6			Eastman's Tritan Copolyester		Als inertes Polymer eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	Phenol frei

No.	Bisphenol A Alternative Abkürzung	Chemischer Name	Cas-No.	Patenthalter (oder Entwickler)	Patent Dokument EP-/WO Dokument	Potentielle Verwendung	Handelsname	Umwelt-Relevanz	Referenz	Kommentare
89		1,4-bis(chlorophenyl)sulfon				Polyethersulfon		Als inertes Polymer eher nein	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen	Phenol frei
	?	?		AKTSO NOBEL KOTATINGS INTERNESHNL B V, NL	RU00000259843 9C2	Lebensmittelindustrie, Beschichtungen aus Film-bildenden Harzen nicht basierend auf BPA		Eher nein	Patentdatenbank	
	?	?		AKTSO NOBEL KOTATINGS INTERNESHNL B V, NL	MX0020130075 30A	Beschichtungen aus Film-bildenden Harzen nicht basierend auf BPA		Eher nein	Patentdatenbank	
	?	?		XEROX CORP	JP00201313449 6A	Komplett abbaubare Harze ohne BPA		Ja (für Außenanwendungen)	Patentdatenbank	
90	Cardanol	3-[(8Z,11Z)-Pentadeca-8,11,14-trienyl]phenol	37330-39-5			Epoxidharze für Beschichtungen		Ja (für Außenanwendungen)		Naturstoff
91	BPTMC	1,1-Bis(4-hydroxyphenyl)-3,3,5-trimethylcyclohexan	12918-8-99-4			Polycarbonate, Alternativen für BPA; auch in Polyestern und Epoxidharzen			Chemiebuch	BPA frei
92	THPE	1,1,1-Tris(4-hydroxyphenyl)-ethan	27955-94-8	e.g. Bayer AG	CA2384428 C, PCT/EP2000/00 8471 (1 August 2006). 2. Patent PCT/EP2000/00 8251 (auch DE19942396A1, EP1228129B1, US6680350, WO2001018101 A1, 2002)	Polykarbonat Container,				Bisphenol frei

No.	Bisphenol A Alternative Abkürzung	Chemischer Name	Cas-No.	Patenthalter (oder Entwickler)	Patent Dokument EP-/WO Dokument	Potentielle Verwendung	Handelsname	Umwelt-Relevanz	Referenz	Kommentare
93	IBK (Isatin biscesol)	3,3-bis(3-methyl-4-hydroxyphenyl)-2-oxo-2,3-dihydroindol	47465-97-4	Bayer AG	CA2384428 C, PCT/EP2000/00 8471 (1 August 2006). 2. Patent PCT/EP2000/00 8251 (auch DE19942396A1, EP1228129B1, US6680350, WO2001018101 A1, 2002)	Polykarbonat Container,				Phenol frei
94	BPFL, Bisphenol FL	4,4'-(9H-Fluoren-9-yliden)bisphenol fluorene-9-bisphenol 9,9-bis(4-hydroxyphenyl)-fluorene BHPF	3236-71-3	<u>Teijin Limited</u>	US5478518 A	Polykarbonat-Film für optische Anwendungen (Eastman)				BPA frei

Tabelle 24: Liste der umweltrelevanten BPA-Alternativen

No.	Bisphenol A Alternativen Abkürzungen	Cas-No.	Testsystem	<i>In vitro</i> Daten/ Ergebnisse	ER	Anti-ER	AR	Anti-AR	TR	Anti-TR	ED Potential	Referenz
2	BPF - para	620-92-8	H295R Steroidogenese Assay (OECD TG 456); VirtualToxLab	Steroidogenese Assay: Anstieg der 17β-Östradiol-Spiegel; kein Effekt auf den Testosteron-Spiegel VirtualToxLab: moderates Risiko der Bindung an 10 Rezeptoren (Androgen, Östrogen α, Östrogen β, Glukokortikoid, LeberX, Mineralokortikoid, Progesteron, Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor c (PPARc), Thyroid α, Thyroid β), 4 Mitglieder der Cytochrom P450 Enzymfamilie (1A2, 2C9, 2D6 und 3A4), ein Transkriptionsfaktor (Aryl-Hydrokarbonrezeptor) und ein Kaliumionenkanal (hERG)	ja	nein	nein	nein	n.d.	n.d.	ja	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014)
3	BPC	79-97-0	Genexpressionsanalysen in adulten männlichen Medaka (vtg1, vtg2, ChgH, ChgL, ERα)	Signifikante Hochregulation von vtg1, vtg2, ChgH, ChgL und ERα; im Vergleich zu BPA potenter; östrogenes Potential bestimmt von Yamaguchi et al., 2015: BPC = BPAF > BPB > BPA >>> BPP	ja	nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	ja	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014; Yamaguchi et al. 2015)
4	MBHA	5129-00-0	Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014)
5	BisOPP-A; Bisphenol PH	24038-68-4	Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014)
6	BPAP	1571-75-1	Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014)
7	PHBB	94-18-8	<i>In vitro</i> Methylierungsassay in spezifischer Zelllinie	Identifiziert als Xenoöstrogen, da es die Aktivität der Arginin Methyltransferase blockiert, die als Koaktivatoren der Östrogen- und Androgenrezeptoren bekannt sind	nein	ja	nein	ja	n.d.	n.d.	ja	(Cheng and Bedford 2011)
8	BPS	80-09-1	Diverse Studien, z.B. H295R Steroidogenese Assay (OECD TG 456); VirtualToxLab	Steroidogenese Assay: kein Effekt auf 17β-Östradiol-Spiegel; Abfall der Testosteron-Spiegel	nein	nein	nein	ja	n.d.	n.d.	ja	(Danish-EPA 2014; Goldinger et al. 2015; US-EPA 2014)

No.	Bisphenol A Alternativen Abkürzungen	Cas-No.	Testsystem	In vitro Daten/ Ergebnisse	ER	Anti-ER	AR	Anti-AR	TR	Anti-TR	ED Potential	Referenz
				VirtualToxLab: moderates Risiko der Bindung an 10 Rezeptoren (Androgen, Östrogen α , Östrogen β , Glukokortikoid, LeberX, Mineralokortikoid, Progesteron, Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor c (PPARc), Thyroid α , Thyroid β), 4 Mitglieder der Cytochrom P450 Enzymfamilie (1A2, 2C9, 2D6 und 3A4), ein Transkriptionsfaktor (Aryl-Hydrokarbonrezeptor) und ein Kaliumionenkanal (hERG)								
9	2,4-BPS	5397-34-2	QSAR Studie	Bestimmung der antagonistischen Mechanismen der Bisphenole auf den humanen Androgenrezeptor	n.d.	n.d.	n.d.	ja	n.d.	n.d.	Keine schlüssigen Informationen	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014; Yang et al. 2017)
10	TGSA	41481-66-7	QSAR Studie	Bestimmung der antagonistischen Mechanismen der Bisphenole auf den humanen Androgenrezeptor	n.d.	n.d.	n.d.	ja	n.d.	n.d.	Keine schlüssigen Informationen	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014; Yang et al. 2017)
11	BPS-MAE	97042-18-7	QSAR Studie	Bestimmung der antagonistischen Mechanismen der Bisphenole auf den humanen Androgenrezeptor	n.d.	n.d.	n.d.	ja	n.d.	n.d.	Keine schlüssigen Informationen	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014; Yang et al. 2017)
12	BPS-MPE	63134-33-8	QSAR Studie	Bestimmung der antagonistischen Mechanismen der Bisphenole auf den humanen Androgenrezeptor	n.d.	n.d.	n.d.	ja	n.d.	n.d.	Keine schlüssigen Informationen	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014; Yang et al. 2017)
13	D-8	95235-30-6	H295R Steroidogenese Assay (OECD TG 456); VirtualToxLab	Steroidogenese Assay: kein Effekt auf 17 β -Östradiol-Spiegel; kein Effekt auf Testosteron-Spiegel VirtualToxLab: moderates Risiko der Bindung an 10 Rezeptoren (Androgen, Östrogen α , Östrogen β , Glukokortikoid, LeberX, Mineralokortikoid, Progesteron, Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor c (PPARc), Thyroid α , Thyroid β), 4 Mitglieder der Cytochrom P450 Enzymfamilie (1A2, 2C9, 2D6 und 3A4), ein Transkriptionsfaktor (Aryl-Hydrokarbonrezeptor) und ein Kaliumionenkanal (hERG)	nein	nein	nein	nein	n.d.	n.d.	Unvollständige Informationen	(Danish-EPA 2014; Goldinger et al. 2015; US-EPA 2014)
14	D-90; BPSIP	191680-83-8	Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014)

No.	Bisphenol A Alternativen Abkürzungen	Cas-No.	Testsystem	In vitro Daten/ Ergebnisse	ER	Anti-ER	AR	Anti-AR	TR	Anti-TR	ED Potential	Referenz
15	DD-70	93589-69-6	Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014)
16	Pergafast 201	232938-43-1	H295R Steroidogenese Assay (OECD TG 456); VirtualToxLab	Steroidogenese Assay: kein Effekt auf 17 β -Östradiol-Spiegel; kein Effekt auf Testosteron-Spiegel VirtualToxLab: moderates Risiko der Bindung an 10 Rezeptoren (Androgen, Östrogen α , Östrogen β , Glukokortikoid, LeberX, Mineralokortikoid, Progesteron, Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor c (PPARc), Thyroid α , Thyroid β), 4 Mitglieder der Cytochrom P450 Enzymfamilie (1A2, 2C9, 2D6 und 3A4), ein Transkriptionsfaktor (Aryl-Hydrokarbonrezeptor) und ein Kaliumionenkanal (hERG)	no	no	no	no	n.d.	n.d.	Unvollständige Informationen	(Danish-EPA 2014; Goldinger et al. 2015; US-EPA 2014)
17	BTUM	151882-81-4	Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014)
18	UU	321860-75-7	Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	(Danish-EPA 2014; US-EPA 2014)
19	BPF - ortho	2467-02-9	s. BPF-para									(ECHA 2016)
20	Biphenyl-4-ol	92-69-3	Diverse Studien, z.B. hER α und hER β Genassays; MCF-7 Zellassay	Stärkstes östrogenes Potential, mit Aktivität nah an BPA (Routledge and Sumpter, 1997; Paris et al., 2002); hohe östrogene Aktivität sowohl im MCF-7 Zellassay und Reporterassay, im gleichen Konzentrationsbereich wie BPA	ja	nein	nein	nein	n.d.	n.d.	ja	(ECHA 2016; Sun et al. 2008)
21	TDP; THIO	2664-63-3	Humane Brustkrebszelllinien MDA-kb2 Reporterassay, Zelllinie exprimiert Androgenrezeptor-abhängigen Reporter Two hybrid yeast Assay; östrogene und thyroideale Effekte größer als bei BPA	inhibits transcriptional activity of androgen-receptor mediated reporter gene by 50 % (compared to control activity (only DHT))	ja	nein	nein	ja	ja	nein	ja	(Kolsek et al. 2015; Lei et al. 2017)
22	4-tert-Butylphenol	98-54-4	hER α und hER β Genassays; MCF-7 Zellassay	Mittlere östrogenes Potential sowohl im MCF-7 Zellassay und im Reporterassay, Faktor 100 unter BPA	ja	nein	nein	nein	n.d.	n.d.	mittel	(ECHA 2016; Sun et al. 2008)
24	DMP-OH	22479-95-4	Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	(ECHA 2016)

No.	Bisphenol A Alternativen Abkürzungen	Cas-No.	Testsystem	In vitro Daten/ Ergebnisse	ER	Anti-ER	AR	Anti-AR	TR	Anti-TR	ED Potential	Referenz
25	3,5-di-ter-Butylsalicylsäure	19715-19-6	Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	(ECHA 2016)
26	Zinc 3,5-bis(α-methylbenzyl)salicylat	53770-52-8	Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	(ECHA 2016)
	Octamethylcyclotetrasiloxan (D4)		Rezeptorbindungsexperimente und Luciferase Reporterassays; Ratten Uterotrophie-Assay (RUA) für östrogene Aktivität; Hershberger Assay für androgene Aktivität	Bindet an ERα, aber nicht an ERβ; aktiviert Luciferase Reporterassay; leichte, aber signifikante Aktivität im RUA (östrogene, keine antiöstrogene Aktivität); negativ im Hershberger Assay	ja	nein	nein	K.I.	K.I.	K.I.	ja	Dow Corning silanes; (Quinn et al. 2007)
30	Decamethylcyclopentasiloxane (D5)		Rezeptorbindungsexperimente und Luciferase Reporterassays; Ratten Uterotrophie-Assay (RUA) für östrogene Aktivität; Hershberger Assay für androgene Aktivität	Keine Aktivität	nein	nein	nein	n.d.	n.d.	n.d.	unvollständig	Dow Corning silanes; (Quinn et al. 2007)
34	CBDO	3010-96-6	in vitro Östrogenrezeptor α Bindestudie; in vitro Östrogenrezeptor β Bindestudie	keine Aktivität in ER Bindungsstudien	nein	nein	nein	nein	n.d.	n.d.	gering	INERIS; (Osimitz et al. 2012)
35	Isosorbid	652-67-5	Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	INERIS, Techn. Inst. New Jersey, ANSES report
38	Tannin, biobased		Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	INERIS, I-NEA/ENSCM
39	Linseed oil		Diverse Fütterungsstudien mit Ratten, Hennen, Kühen, keine Studien zur Feststellung östrogenen Effekte, eher Studien zur Untersuchung des Gesundheitsstatus durch ungesättigte Fettsäuren		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	gering	INERIS, DRAGONKRAFT
41	BPS Alternative:		Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	INERIS
42	A® frei (Vitamin C)		Review	Review schlägt einen Futterzusatz von Ascorbinsäure während der Reproduktion von Fischen vor. Die Funktion scheint aber eher protektiv zu sein aufgrund der antioxidativen Wirkung.	nein	nein	nein	nein	n.d.	n.d.	gering	INERIS; (Dabrowski and Ciereszko 2001)

No.	Bisphenol A Alternativen Abkürzungen	Cas-No.	Testsystem	In vitro Daten/ Ergebnisse	ER	Anti-ER	AR	Anti-AR	TR	Anti-TR	ED Potential	Referenz
44	Polyurethan Harz		Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	INERIS, ANSES Report 2013
45	Polyurethananer Harz		Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	INERIS, ANSES Report 2013
46	Polyamide		Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	INERIS
66	BPZ (Bisphenol Z)	843-55-0	Diverse Studien, z. B. Hefe-basierter Lac-Z Reporterassay zur Untersuchen der östrogenität	Identifiziert als höchstpotentes Bisphenol	ja	nein	nein	nein	n.d.	n.d.	ja	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen; (Schultz et al. 2002)
73	HPP	599-64-4	ER-Bindungsstudien, Östrogenrezeptor Reporterassay und Antiandrogenassay	Positiv für ER Bindung und im Östrogenrezeptor Reporterassay	ja	nein	nein	nein	n.d.	n.d.	ja	(Ng et al. 2015) Begleitende Informationen; (Rosenmai et al. 2014)
75	Lignocellulosic material from cedar, eucalyptus, bamboo	9005-53-2	Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	(Asada et al. 2015)
80	n-Alkyl Diphenolate (DPA) Diglycidyl Ethers	126-00-1	Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	(Maiorana et al. 2015)
85	TMBPA	5613-46-7	Bindungsassay für Thyroidrezeptor; Thyroidhormon-abhängiger Reporterassay mit CHO-K1 Zelllinie; Östrogene Aktivität durch MCF-7 ERE Reporterassay; Androgene Aktivität durch NIH3T3 ARE Reporterassay; Thyroidale Aktivität durch GH3 Zellwachstumshormonproduktions-Induktion	Östrogene Aktivität im Bereich von BPA	ja	ja	nein	ja	ja	n.d.	ja	(Kitamura et al. 2005)
	?		Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	Patent data base
90	Cardanol	37330-39-5	Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	

No.	Bisphenol A Alternativen Abkürzungen	Cas-No.	Testsystem	<i>In vitro</i> Daten/ Ergebnisse	ER	Anti-ER	AR	Anti-AR	TR	Anti-TR	ED Potential	Referenz
91	BPTMC	129188-99-4	Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	Chemical book
92	THPE	27955-94-8	Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	
93	IBK (isatin bis-cresol)	47465-97-4	Keine Information	Keine Information	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	
94	BPFL, Bisphenol FL (BHPF)	3236-71-3	Yeast two-hybrid Assay und dualer Luciferase Reporter Assay	Kein östrogener Effekt im Yeast two-hybrid Assay, aber ein anti-östrogener Effekt; gleiche Ergebnisse im Luciferase-Assay	nein	ja	K.I.	K.I.	K.I.	K.I.	ja	(Zhang et al. 2017)

Tabelle 25: Liste der getesteten Substanzen

No.	Bisphenol A Alternative	Vertreiber	Artikelnummer	Reinheit	Cas-No.
2	BPF - para	SIGMA-ALDRICH	51453	≥98	620-92-8
3	BPC	SIGMA-ALDRICH	68118	≥99.9	79-97-0
5	BisOPP-A; Bisphenol PH	SIGMA-ALDRICH	56528	≥99.0	24038-68-4
6	BPAP	SIGMA-ALDRICH	38753	≥99.0	1571-75-1
7	PHBB	SIGMA-ALDRICH	07389	≥98	94-18-8
8	BPS	SIGMA-ALDRICH	43034	≥98	80-09-1
9	2,4-BPS	Ark Pharm	AK122332	>95	5397-34-2
10	TGSA	Toronto Research Chemicals	T337970	98%	41481-66-7
11	BPS-MAE	Ark Pharm	AK122865	96	97042-18-7
12	BPS-MPE	Vitas-M-Laboratory	STK036562	>95	63134-33-8
13	D-8	Ark Pharm	AK122331	97	95235-30-6
15	DD-70	Toronto Research Chemicals	B447430	99.64	93589-69-6
16	Pergafast 201	Santa Cruz Biotechnology			
19	BPF - ortho	SIGMA-ALDRICH	B46808	98	2467-02-9
20	Biphenyl-4-ol	ENAMINE	MFCD00002347	>90	92-69-3
21	TDP	SIGMA-ALDRICH	216178-100G	99	2664-63-3
22	4-tert-Butylphenol	ENAMINE	MFCD00002367	>90	98-54-4
24	DMP-OH	Ark Pharm		98	22479-95-4
25	3,5-di-ter-Butylsalicylsäure	ENAMINE	MFCD00059058	95	19715-19-6
30	Octamethylcyclotetrasiloxane	SIGMA-ALDRICH	43883-100MG	97	
	Decamethylcyclopentasiloxane	SIGMA-ALDRICH	43217-250MG	97	
34	CBDO; TMCD	AK Scientific		98	3010-96-6
35	Isosorbid	ENAMINE	MFCD00064827	95	652-67-5
42	A® free (Vitamin C)	Ark Pharm		>98	
66	BPZ (Bisphenol Z)	SIGMA-ALDRICH	77923	≥99	843-55-0
73	HPP	ENAMINE	MFCD00002365	>90	599-64-4
80	n-Alkyl Diphenolate Diglycidyl Ether	AK Scientific		98	126-00-1
85	TMBPA	SIGMA-ALDRICH	450502-25G	98	5613-46-7

No.	Bisphenol A Alternative	Vertreiber	Artikelnummer	Reinheit	Cas-No.
91	BPTMC	SIGMA-ALDRICH	61923-25MG	97	37330-39-5
92	THPE	AK Scientific		99	129188-99-4
94	BPFL, Bisphenol FL	SIGMA-ALDRICH	97009-100MG	99	3236-71-3
UBA	DMT	SIGMA-ALDRICH	31298-250MG	99	120-61-6
UBA	CHDM	SIGMA-ALDRICH	125598-100G	99	105-08-8
UBA	DOPO	TCI Deutschland			

7 Quellenverzeichnis

- Asada C, Sasaki C, Takamatsu T, Nakamura Y. 2015. Conversion of steam-exploded cedar into ethanol using simultaneous saccharification, fermentation and detoxification process. *Bioresour Technol* 176:203-9.
- Bjornsdotter MK, Jonker W, Legradi J, Kool J, Ballesteros-Gomez A. 2017. Bisphenol A alternatives in thermal paper from the Netherlands, Spain, Sweden and Norway. Screening and potential toxicity. *Sci Total Environ* 601-602:210-221.
- Canada. 2010. Canada Consumer Product Safety Act. In: Justice Mo, editor. Canada.
- Chen D, Kannan K, Tan H, Zheng Z, Feng YL, Wu Y, Widelka M. 2016. Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity-A Review. *Environ Sci Technol* 50(11):5438-53.
- Cheng D, Bedford MT. 2011. Xenoestrogens regulate the activity of arginine methyltransferases. *Chembiochem* 12(2):323-9.
- Dabrowski K, Ciereszko A. 2001. Ascorbic acid and reproduction in fish: endocrine regulation and gamete quality. *Aquaculture Research* 32(8):623-638.
- Danish-EPA. 2014. Alternative technologies and substances to bisphenol A (BPA) in thermal paper receipts. The Danish Environmental Protection Agency.
- Dasgupta S, Lonard DM, O'Malley BW. 2014. Nuclear receptor coactivators: master regulators of human health and disease. *Annu Rev Med* 65:279-92.
- ECHA. 2016. Annex XV Report: PROPOSAL FOR IDENTIFICATION OF A SUBSTANCE OF VERY HIGH CONCERN ON THE BASIS OF THE CRITERIA SET OUT IN REACH ARTICLE 57.
- EFSA. 2015. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Executive summary. *EFSA Journal* 2015 13(1).
- EU. 2011. COMMISSION DIRECTIVE 2011/8/EU of 28 January 2011 amending Directive 2002/72/EC as regards the restriction of use of Bisphenol A in plastic infant feeding bottles. *Official Journal of the European Union* 11(26).
- Filgueira CS, Benod C, Lou X, Gunamalai PS, Villagomez RA, Strom A, Gustafsson JA, Berkenstam AL, Webb P. 2014. A screening cascade to identify ERbeta ligands. *Nucl Recept Signal* 12:e003.
- Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, Maghuin-Rogister G, Pironnet AM, Pussemier L, Scippo ML and others. 2012. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food Chem Toxicol* 50(10):3725-40.
- Goldinger DM, Demierre AL, Zoller O, Rupp H, Reinhard H, Magnin R, Becker TW, Bourqui-Pittet M. 2015. Endocrine activity of alternatives to BPA found in thermal paper in Switzerland. *Regul Toxicol Pharmacol* 71(3):453-62.
- Hilal T, Puetter V, Otto C, Parczyk K, Bader B. 2010. A dual estrogen receptor TR-FRET assay for simultaneous measurement of steroid site binding and coactivator recruitment. *J Biomol Screen* 15(3):268-78.
- Jameson DM, Croney JC. 2003. Fluorescence polarization: past, present and future. *Comb Chem High Throughput Screen* 6(3):167-73.
- Kitamura S, Suzuki T, Sanoh S, Kohta R, Jinno N, Sugihara K, Yoshihara S, Fujimoto N, Watanabe H, Ohta S. 2005. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicol Sci* 84(2):249-59.
- Kolsek K, Gobec M, Mlinaric Rascan I, Sollner Dolenc M. 2015. Screening of bisphenol A, triclosan and paraben analogues as modulators of the glucocorticoid and androgen receptor activities. *Toxicol In Vitro* 29(1):8-15.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138(3):863-70.
- Lea WA, Simeonov A. 2011. Fluorescence polarization assays in small molecule screening. *Expert Opin Drug Discov* 6(1):17-32.
- Lei B, Peng W, Xu G, Wu M, Wen Y, Xu J, Yu Z, Wang Y. 2017. Activation of G protein-coupled receptor 30 by thiodiphenol promotes proliferation of estrogen receptor alpha-positive breast cancer cells. *Chemosphere* 169:204-211.
- Liao C, Kannan K. 2014. A survey of alkylphenols, bisphenols, and triclosan in personal care products from China and the United States. *Arch Environ Contam Toxicol* 67(1):50-9.
- Liao C, Liu F, Guo Y, Moon HB, Nakata H, Wu Q, Kannan K. 2012. Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the United States and several Asian countries: implications for human exposure. *Environ Sci Technol* 46(16):9138-45.
- LifeTechnologies (2014): PolarScreen™ Nuclear Receptor Competitor Assays - Universal Protoco. MAN0007703, Revision A.0. Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, CA USA.
- LifeTechnologies (2014b): LanthaScreen® TR -FRET AR Coactivator Assay. MAN0009996, Revision A.0. Thermo Fisher Scientific Inc., Carlsbad, CA USA.

- Maiorana A, Spinella S, Gross RA. 2015. Bio-based alternative to the diglycidyl ether of bisphenol A with controlled materials properties. *Biomacromolecules* 16(3):1021-31.
- Mathieu-Denoncourt J, Wallace SJ, de Solla SR, Langlois VS. 2015. Plasticizer endocrine disruption: Highlighting developmental and reproductive effects in mammals and non-mammalian aquatic species. *Gen Comp Endocrinol* 219:74-88.
- Mendum T, Stoler E, VanBenschoten H, Warner JC. 2011. Concentration of bisphenol A in thermal paper. *Green Chemistry Letters and Reviews* 4(1):81-86.
- Molina-Molina JM, Amaya E, Grimaldi M, Saenz JM, Real M, Fernandez MF, Balaguer P, Olea N. 2013. In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol Appl Pharmacol* 272(1):127-36.
- Naderi M, Wong MY, Gholami F. 2014. Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquat Toxicol* 148:195-203.
- Ng HW, Shu M, Luo H, Ye H, Ge W, Perkins R, Tong W, Hong H. 2015. Estrogenic activity data extraction and in silico prediction show the endocrine disruption potential of bisphenol A replacement compounds. *Chem Res Toxicol* 28(9):1784-95.
- Ohno K, Fukushima T, Santa T, Waizumi N, Tokuyama H, Maeda M, Imai K. 2002. Estrogen receptor binding assay method for endocrine disruptors using fluorescence polarization. *Anal Chem* 74(17):4391-6.
- Osimitz TG, Eldridge ML, Slotter E, Welsh W, Ai N, Sayler GS, Menn F, Toole C. 2012. Lack of androgenicity and estrogenicity of the three monomers used in Eastman's Tritan copolyesters. *Food Chem Toxicol* 50(6):2196-205.
- Parker MS, Wang JJ, Fournier A, Parker SL. 2000. Upregulation of pancreatic polypeptide-sensitive neuropeptide Y (NPY) receptors in estrogen-induced hypertrophy of the anterior pituitary gland in the Fischer-344 rat. *Mol Cell Endocrinol* 164(1-2):239-49.
- Quinn AL, Regan JM, Tobin JM, Marinik BJ, McMahan JM, McNett DA, Sushynski CM, Crofoot SD, Jean PA, Plotzke KP. 2007. In vitro and in vivo evaluation of the estrogenic, androgenic, and progestagenic potential of two cyclic siloxanes. *Toxicol Sci* 96(1):145-53.
- Rochester JR. 2013. Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod Toxicol* 42:132-55.
- Rosenmai AK, Dybdahl M, Pedersen M, Alice van Vugt-Lussenburg BM, Wedeby EB, Taxvig C, Vinggaard AM. 2014. Are structural analogues to bisphenol a safe alternatives? *Toxicol Sci* 139(1):35-47.
- Rouleau N, Hurskainen P, Bossé R, Hemmilä I. 2006. Development of Nuclear Receptor Homogeneous Assay Using the LANCETM Technology. *Handbook of Assay Development in Drug Discovery*:209.
- Schultz TW, Sinks GD, Cronin MT. 2002. Structure-activity relationships for gene activation oestrogenicity: evaluation of a diverse set of aromatic chemicals. *Environ Toxicol* 17(1):14-23.
- Sun H, Xu XL, Qu JH, Hong X, Wang YB, Xu LC, Wang XR. 2008. 4-Alkylphenols and related chemicals show similar effect on the function of human and rat estrogen receptor alpha in reporter gene assay. *Chemosphere* 71(3):582-8.
- ThermoFisher Scientific (2104): GeneBLAzer Technology Overview - Reliable, integrated tools for drug discovery. How GeneBLAzer Technology works. Online Information, Thermo Fisher Scientific Inc. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/industrial/pharma-biopharma/drug-discovery-development/target-and-lead-identification-and-validation/g-protein-coupled/gpcr-cell-based-assays/geneblazer-theory.html>
- Tice CM, Zheng YJ. 2016. Non-canonical modulators of nuclear receptors. *Bioorg Med Chem Lett* 26(17):4157-64.
- US-EPA. 2014. BISPENOL A ALTERNATIVES IN THERMAL PAPER.
- Wu LH, Zhang XM, Wang F, Gao CJ, Chen D, Palumbo JR, Guo Y, Zeng EY. 2017. Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: A short review. *Sci Total Environ* 615:87-98.
- Yamaguchi A, Ishibashi H, Arizono K, Tominaga N. 2015. In vivo and in silico analyses of estrogenic potential of bisphenol analogs in medaka (*Oryzias latipes*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol Environ Saf* 120:198-205.
- Yang H, Hou G, Zhang L, Ju L, Liu C. 2017. Exploring the effect of bisphenol S on sludge hydrolysis and mechanism of the interaction between bisphenol S and alpha-Amylase through spectrophotometric methods. *J Photochem Photobiol B* 167:128-135.
- Yiu KW, Lee CK, Kwok KC, Cheung NH. 2014. Measuring the kinetics of the binding of xenoestrogens and estrogen receptor alpha by fluorescence polarization. *Environ Sci Technol* 48(19):11591-9.
- Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. 1999. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* 4(2):67-73.
- Zhang Z, Hu Y, Guo J, Yu T, Sun L, Xiao X, Zhu D, Nakanishi T, Hiromori Y, Li J and others. 2017. Fluorene-9-bisphenol is anti-oestrogenic and may cause adverse pregnancy outcomes in mice. *Nat Commun* 8:14585.

