

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg

Lehrstuhl für Toxikologie

Vorstand: Professor Dr. sc. techn. W. Lutz

**Erhöhung des Genomschadens
in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7
durch die Induktion vermehrter Zellproliferation**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Adriana Roman

aus Stuttgart

Würzburg, November 2006

Referentin: Professor Dr. rer. nat. H. Stopper

Koreferent: Privatdozent Dr. med. M. Eck

Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2007

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Karzinogenese	1
1.2	Zellproliferation und Karzinogenese	4
1.3	Zellteilungszyklus	6
1.4	Kernteilung (Mitose)	8
1.5	Zellzykluskontrollpunkte und Reparaturmechanismen	9
1.6	Mikrokerne	12
1.7	Sexualhormone und Karzinogenese	15
1.8	MCF-7 Zellproliferationstest (E-SCREEN)	18
1.9	Fragestellung dieser Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Zellkulturen	20
2.1.1	Allgemeines zur Zellkultur	20
2.1.2	Beurteilung der Zellkulturen	21
2.1.3	Verwendete Zellarten	21
2.1.4	Medien und Puffer für die Zellkultur	22
2.1.5	Einfrieren der Zellen	23
2.1.6	Auftauen der Zellen	24
2.1.7	Zellkultur von MCF-7 und MDA-MB231	24
2.2	Zellzahlbestimmung	25
2.2.1	Bestimmung der Zelldichte mithilfe einer Zählkammer	25
2.2.2	Bestimmung der Zelldichte mittels Coulter-Counter	26
2.3	Verwendete Färbungen	27
2.3.1	Bisbenzimid Färbung	27
2.3.2	Acridin-Orange Färbung	27
2.4	Durchführung der Experimente	28
2.4.1	Zellkulturen für Proliferationsversuche mit MCF-7 Zellen	28
2.4.2	Zellkulturen für Proliferationsversuche mit MDA-MB231	28
2.4.3	Zellkulturen unter Zugabe von Cytochalasin B	29
2.4.4	Vorbereitung der Objektträger	29

2.4.5	Herstellung der Präparate	29
2.4.6	Auswertung der Präparate	30
2.4.7	Beurteilungskriterien für Mikrokerne	30
3	Ergebnisse	32
3.1	MDA-MB231 und MCF-7 mit Östradiol behandelt	32
3.1.1	Proliferationsversuch mit MCF-7 Zellen unter Zugabe von Östradiol	32
3.1.2	Kontrollexperiment mit MDA-MB231 unter Zugabe von Östradiol	34
3.1.3	Konzentrationsabhängige Proliferationssteigerung in den MCF-7 Zellen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen Östradiol	36
3.1.4	Wiederholungsexperiment mit MCF-7 Zellen und verschiedenen Konzentrationen Östradiol	38
3.1.5	Kontrollexperiment mit MDA-MB231 Zellen unter Zugabe von Östradiol	40
3.2	MCF-7 und MDA-MB231 mit Östradiol und Tamoxifen	42
3.2.1	MCF-7 Zellen und der Östrogenrezeptorantagonist Tamoxifen	42
3.2.2	MCF-7 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol und Tamoxifen	44
3.2.3	Wiederholungsexperiment mit MCF-Zellen unter kombinierter Zugabe von Östradiol und Tamoxifen	46
3.2.4	MCF-7 Zellen und der Östrogenrezeptorantagonist Tamoxifen	48
3.2.5	MDA-MB231 und der Östrogenrezeptorantagonist Tamoxifen	50
3.3	MCF-7 mit Cytochalasin B und Östradiol behandelt	52
4	Diskussion	54
5	Zusammenfassung	67
6	Literaturliste	68
7	Anhang	81

1 Einleitung

1.1 Karzinogenese

Krebserkrankungen stehen in industrialisierten Ländern nach den Herz- und Kreislaufkrankungen auf Rang zwei der Todesursachen. Nahezu jeder Dritte erkrankt, nahezu jeder Fünfte stirbt an den Folgen von Krebs. Die Entstehung von Krebs ist ein sehr komplexer Prozess und kann nicht auf ein einzelnes Ereignis oder eine einzige Ursache zurückgeführt werden. Es müssen mehrere, voneinander unabhängige Ereignisse zufällig zusammenkommen. Dies geschieht normalerweise im Laufe von Jahren und Jahrzehnten. Frühe tierexperimentelle Studien belegen die Hypothese, dass sich normale Körperzellen nicht unmittelbar in maligne Zellen umwandeln (Berenblum und Shubik, 1949; Friedewald und Rous, 1950). Vielmehr ist ein mehrstufiger und multifaktorieller Prozess an der Tumorentstehung beteiligt, der sich über einen Großteil der Lebenszeit eines Individuums erstreckt.

Aufgrund biologischer und epidemiologischer Erkenntnisse entwickelten Armitage und Doll (1957) ein erstes mathematisches Mehrstufenmodell der Karzinogenese, welches wichtige Überlegungen zur Tumorinzidenz und Progression ermöglichte, lange bevor molekularbiologische Daten vorlagen (Frank, 2004). Anhand dieses Modells konnten nun frühere Beobachtungen, wie z.B. die Latenzzeit ab Einwirkung eines Karzinogens bis zur Tumorentstehung oder synergistische Effekte von kanzerogenen Faktoren, nachvollzogen werden (Ritter et al., 2003). Weitere Faktoren wie die Zellproliferationskinetik (Moolgavkar und Knudson, 1981; Moolgavkar und Luebeck, 1992) oder Abnahme der Tumorinzidenz in hohem Alter (Ritter et al., 2003) wurden in die stochastischen Modelle mit einbezogen. Trotzdem blieben viele Fragen zur Karzinogenese offen.

Anhand weiterer experimenteller Befunde und der unterschiedlichen Wirkungsweise verschiedener Faktoren wurde ein Dreistufenkonzept der Krebsentstehung entwickelt (Hecker, 1978; Hecker et al., 1983; Hecker, 1984; Stenback et al., 1981). Hierbei werden im Wesentlichen folgende, in der zeitlichen Abfolge festgelegte Schritte angenommen, die Initiation, die Promotion und die Progression. Zur Karzinogenese tragen genotoxische und epigenetische oder nichtgenotoxische Mechanismen bei. Die Ersten verursachen DNA-Schäden, die Zweiten keine. Initiation erfolgt über Genotoxizität. Der Effekt ist irreversi-

bel. Initiierte Zellen können dauernd inaktiv bleiben, durch Apoptose eliminiert werden oder zum Tumor heranwachsen. Tumorpromotoren können nach vorausgegangener Initiation die Inzidenz für einen Tumor deutlich erhöhen. Sie sind jedoch nur bedingt kanzerogen. Eine kontinuierliche Einwirkung über längere Zeit ist erforderlich und der Effekt ist am Anfang reversibel. Für Stoffe mit tumorpromovierenden Eigenschaften ist kaum ein einheitlicher Wirkmechanismus vorstellbar. Ein gemeinsamer Aspekt ist jedoch, dass sie das Wachstum initiiertter Zellen und präneoplastischer Veränderungen beschleunigen. Sie verkürzen somit die Latenzzeit bis zum Auftreten der Tumore. Im Verlauf der Progression entwickelt sich eine anfangs nur leichte Störung des Zellverhaltens nach und nach zu einem voll ausgebildeten Tumor. Es kommt zur Konversion des benignen Tumors in einen malignen, welcher fähig ist, in umgrenzendes Gewebe einzudringen und zu metastasieren. Obwohl das Dreistufenmodell der Karzinogenese die chronologische Abfolge der Krebsentstehung ganz gut skizzieren kann, vermag es doch nicht hinreichend das sehr komplexe Geschehen der Tumorentstehung wiederzugeben, mit initialem DNA-Schaden und den folgenden oft nichtgenotoxischen Promotions- und Progressionsphasen (Barret, 1993).

Ein wesentliches Element der Karzinogenese ist, dass der sich schrittweise entwickelnde maligne Tumor aus einer entarteten Zelle entsteht („klonale Genese“ der Tumoren) (Nowell, 1976), welche durch eine Mutation einen Selektionsvorteil gegenüber den anderen Zellen erlangt hat und diesen durch Vererbung an die folgenden Generationen weitergibt (Cahill et al., 1999). Folglich hängt die Entstehung eines Malignoms von einer Vielzahl von Mutationen ab, die während der Zellteilung zustande kommen (Henderson und Feigelson, 2000). Tumorspezifische Eigenschaften sind auch in Tochterzellen vorhanden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine Störung in der DNA vorliegt.

Kanzerogene sowie spontane Mutationen können für diese Veränderungen in der DNA verantwortlich sein. Es konnte für drei Arten von Agentien eine deutliche Korrelation zwischen Mutagenese und Karzinogenese festgestellt werden. Chemische Karzinogene, welche normalerweise einfache, lokal begrenzte Veränderungen in der Nucleotidsequenz verursachen, ionisierende Strahlung, wie z.B. Röntgenstrahlen, die zu Chromosomenbrüchen und Translokationen führen und Viren, die fremde DNA in die Zelle einschleusen. Es gibt aber auch Krebs erregende Substanzen, welche nicht mutagen wirken. Selbst wenn es in der Umgebung von Zellen keine mutagenen Substanzen gäbe, käme es zu spontanen Mu-

tationen, und zwar mit einer Häufigkeit von 10^{-6} Mutationen je Gen und Zellteilung. Demnach stellt sich eher die Frage, warum Krebs so selten entsteht, nicht wieso es überhaupt entsteht (Alberts et al., 1995). Reparaturmechanismen spielen dabei eine wesentliche Rolle. Falls diese versagen oder nicht genügend Zeit zur Reparatur verbleibt, entstehen bleibende DNA-Schäden (Elledge, 1996). Jeder Mechanismus, der das Überleben DNA-geschädigter Zellen erhöht, trägt zum karzinogenen Prozess bei (Schmoll et al., 2006).

Genetische Veränderungen von Tumorzellen können unterschiedlichen Typus sein, z. B. Punktmutationen (Einzelbasenveränderungen), Deletionen (Verlust größerer DNA-Segmente), Insertion (Integration von Fremd-DNA), Amplifikation (Vervielfachung einzelner DNA-Segmente), Rekombination oder viraler Befall. Genmutationen haben verschiedene Konsequenzen auf die Genaktivität oder Proteinfunktion in einer Zelle, z.B. Zerstörung eines Gens und des hier kodierten Proteins, Erzeugung eines funktionell veränderten Proteins, Fehlregulation eines Gens und dadurch Herstellung unphysiologischer Mengen des korrespondierenden Proteins (Schmoll et al., 2006). Durch die genaue Untersuchung genetischer Veränderungen in Krebszellen wurde eine große Anzahl von Genen entdeckt, die für Proteine kodieren, die in die Kontrolle der Zellproliferation eingreifen. Diese Gene kann man grob in Proliferations- und Antiproliferations-Gene einteilen (Alberts et al., 1995).

Die Produkte der Proliferations-Gene unterstützen das Zellwachstum, die der Antiproliferations-Gene die Bremsmechanismen. Das normale Proliferations-Gen heißt Protoonkogen. Ein mutiertes Proliferations-Gen wird Onkogen genannt, das bedeutet krebsverursachendes Gen. Als Genprodukte zellulärer Onkogene werden u.a. Wachstumsfaktoren gebildet, die es der transformierten Zelle ermöglichen ihr eigenes Wachstum aufrechtzuerhalten (Weinberg, 1989). Die Antiproliferations-Gene werden Tumorsuppressorgene genannt. Wenn in einem Antiproliferations-Gen eine Mutation stattfindet, welche zur Inaktivierung dieses Gens führt, dann kann die Zelle die normalen Proliferationsbeschränkungen umgehen und sich uneingeschränkt weiter teilen (Marshall, 1991). Neben den oben genannten Tumorsuppressorgene und Protoonkogene gibt es noch weitere Gene, die der Aufrechterhaltung genetischer Stabilität dienen und die Genreparatur garantieren. In allen

Genklassen können genomische und somatische Mutationen auftreten (Bodmer, 1998; Warwzyn und Hesch, 1999).

Mutationen in der Gensubstanz der Zellen, welche einerseits die Krebsentstehung begünstigen, führen jedoch auf der anderen Seite zur Evolution der Lebewesen und sorgen somit langfristig für das Überleben der Spezies. Da Krebs das Ergebnis mehrerer zufälliger genetischer Veränderungen ist, die der natürlichen Auslese unterworfen sind, wird es wahrscheinlich, selbst bei demselben Krebstyp, nie zwei Fälle geben, die genetisch identisch sind (Alberts et al., 1995). Trotzdem ist allen Krebszellen gemeinsam, dass sie sich unabhängig von den üblichen Einschränkungen vermehren und in Bereiche eindringen, die normalerweise anderen Zellen vorbehalten sind. Während gesunde Zellen nach Erreichen einer bestimmten Dichte und Oberflächenkontakt ihre Proliferation einstellen, verlieren Malignomzellen diese wichtige Eigenschaft.

1.2 Zellproliferation und Karzinogenese

Die Zellen eines jeden Individuums existieren in einem exakt geregelten homöostatischen Gleichgewicht von Proliferation, Differenzierung, Zellalterung (Seneszenz) und Zelltod (Apoptose bzw. Nekrose). Krebs entsteht, wenn das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod gestört ist (Bodmer, 1999). Normale Säugerzellen zeigen eine Abneigung dagegen, sich unbegrenzt zu teilen. Sie können sich nur eine begrenzte Anzahl von Zyklen teilen, so z.B. menschliche Zellen etwa 50-mal (Hayflick und Moorhead, 1961). Danach stellen sie ihr Wachstum ein. Nur wenige Zellen entkommen der Alterung und teilen sich auf unbegrenzte Zeit, diese werden Zelllinien genannt. Da in einem gesamten Organismus die einzelnen Zellen und deren Wachstumsverhalten nicht der Beobachtung zugänglich sind, werden die meisten Untersuchungen zur Proliferation von Säugerzellen in Zellkultur vorgenommen (Alberts et al., 1995).

Krebszellen sind „unsterblich“ geworden. Sie zeigen nicht die üblichen Begrenzungen der Zellteilungszyklen, wie oben erwähnt. Eine Population von Krebszellen befindet sich in einem offenen Austauschsystem von Energie und Nährstoffen mit dem menschlichen Organismus, als ihren Wirt. Energetisch gesehen müssten Krebszellen, wie jede andere Zell-

population auch, altern und sterben. Sie besitzen jedoch die Fähigkeit, unaufhörlich Energie vom Wirt für ihr Wachstum zu benutzen. Erst wenn die Energiezufuhr dadurch gestoppt wird, dass der menschliche Organismus stirbt, sterben Krebszellen auch (Chapekar, 2001).

Normale Säugerzellen reagieren auf die Abwesenheit von Serum mit einem Wachstumsstopp. Es konnte gezeigt werden, dass die wesentlichen Faktoren, die durch das Serum geliefert werden, hochspezifische Proteine - die Wachstumsfaktoren - sind. Einer der ersten Wachstumsfaktoren, die identifiziert wurden, ist das Blutplättchen-Wachstumsfaktor oder PDGF (engl.: platelet derived growth factor). Dieser wird von den Blutplättchen an das Serum abgegeben. Im Körper spielt PDGF vermutlich eine wichtige Rolle bei der Stimulierung der Zellteilung während der Wundheilung (Antoniades, 1991). Es gibt inzwischen viele bekannte Proteine, die als Wachstumsfaktoren fungieren. Für jeden Wachstumsfaktor gibt es spezifische Rezeptoren, die auf der Oberfläche bestimmter Zellen ausgebildet werden. Steroide können auch als Wachstumsfaktoren dienen. Wachstumsfaktoren liefern wichtige extrazelluläre Signale für die Zellvermehrung. Sie sind in niedrigen Konzentrationen vorhanden. Die Zellen konkurrieren normalerweise um winzige Mengen Wachstumsfaktoren. Neben der dichteabhängigen Hemmung der Zellteilung ist das ein weiteres wichtiges Phänomen, welches von einer gewissen Populationsdichte an die weitere Zellvermehrung verhindert.

Tumorzellen können sich der normalen Wachstumsregulation dadurch entziehen, dass sie von der Stimulation durch solche Faktoren weitgehend unabhängig werden, indem sie solche Wachstumsfaktoren selbst produzieren. Man fand heraus, dass mehrere menschliche Tumore, wie z.B. das Osteosarkom, das Gliom und das Rhabdomyosarkom in Kultur PDGF abgeben (Heldin et al., 1986). Es wurde beschrieben, dass die östrogenrezeptorpositive Brustkrebszelllinie MCF-7, welche ursprünglich aus dem Pleuraerguss einer an Brustkrebs erkrankten Patientin gewonnen wurde, PDGF in Kultur abgab, während die östrogenrezeptornegative Brustkrebszelllinie MDA-MB231 das nicht tat (Camez et al., 1986). In anderen Tumoren ließ sich eine ektopische Hormonproduktion nachweisen. Wachstumsfaktoren lösen ihre Wirkung in der Zelle wie Hormone aus, indem sie über Rezeptoren in der Zellmembran wirken. Stoffe mit promovierenden Eigenschaften haben Affinität zu Rezeptoren für Wachstumsfaktoren oder Hormone.

Es gibt Hinweise für die Beeinflussung der normalen Proliferationskontrolle durch Promotoren über eine Stimulation von Wachstum und Hemmung von Apoptosen. Wenn die Haut einem Initiator ausgesetzt war, kann schon nach einer einfachen Verletzung aus einigen Zellen am Wundrand ein Tumor entstehen (Alberts et al., 1995). Nach einer Verletzung sind die Zellen am Wundrand dazu angehalten sich zu teilen, um den entstandenen Schaden zu reparieren. Walaszek et al., (2004) führen aus, dass Tumorpromotoren im Allgemeinen zur gesteigerten Zellproliferation führen. Chronische Entzündungen, anhaltende Hyperplasie, Veränderungen in der Zelldifferenzierung und genetische Instabilität sind ihrerseits an der selektiven Vermehrung initiiertes Zellen hin zu malignen Tumoren beteiligt (DiGiovanni, 1994). Histologische Untersuchungen an Mäusen, welche lokal mit promovierenden Substanzen behandelt wurden belegen, dass anhaltende zelluläre Hyperplasie eine Schlüsselrolle in der Tumorpromotion und -progression spielt (Walaszek et al., 2005).

Zellproliferation wird allgemein als ein Risikofaktor in der Karzinogenese angesehen (Preston-Martin et al., 1990; Cohen et al., 1991). Der Mechanismus, der dazu führt, ist jedoch unbekannt. Laut Kaufmann und Paules, (1996) ist es unumstößlich, dass proliferierende Zellen die Zielscheiben der Induktion von Krebs sind. Diese besondere Vulnerabilität scheint aus verschiedenen Eigenschaften proliferierender Zellen heraus zu entspringen. Unter anderem müssen proliferierende Zellen eine große Menge Proteine synthetisieren, die während des Zellteilungszyklus für die dort erforderlichen Prozesse des Zellwachstums und der DNA-Synthese zur Verfügung stehen müssen (Kaufmann und Paules, 1996).

1.3 Zellteilungszyklus

Die Zellen vermehren sich, indem sie zunächst ihren Inhalt verdoppeln und sich anschließend zweiteilen. Damit sich ein Mensch vom Embryo bis hin zum Erwachsenen entwickelt, sind zahlreiche Zellteilungen notwendig. Auch wenn die Organismen das Erwachsenenstadium erreicht haben, sind Zellteilungen weiterhin notwendig, um die durch natürlichen Verschleiß oder programmierten Zelltod verloren gegangenen Zellen zu ersetzen. In einem erwachsenen Menschen müssen jede Sekunde viele Millionen neuer Zellen ent-

stehen, um einen Gleichgewichtszustand zu erhalten. Während der Lebenszeit eines Menschen finden etwa 10^{17} Zellteilungen statt (Strachan und Read, 2005).

Es gibt vier aufeinander folgende Stadien im Standardzellzyklus einer Eukaryontenzelle: die M-Phase, die G1-Phase, die S-Phase und die G2-Phase. Die M-Phase umfasst die verschiedenen Stadien der Kernteilung und die Zellteilung, die mit den Endphasen der Mitose überlappt. Die anderen drei bilden zusammen die Interphase. Während der Synthesephase wird die DNA im Zellkern der Zelle repliziert. Wäre die Interphase, die Zeit von einer Mitose zur anderen, genau so lange wie die DNA-Replikation während der S-Phase, dann hätte die Zelle nicht genügend Zeit, um ihre Masse vor der Teilung zu verdoppeln. G1- und G2-Phase geben der Zelle zusätzliche Zeit zum Wachstum (G = engl.: gap, Lücke). Die G1-Phase befindet sich zwischen dem Ende der M-Phase und dem Beginn der DNA-Synthese. Die G2-Phase befindet sich zwischen dem Ende der DNA-Synthese und dem Beginn der nächsten Mitose. Die G2-Phase stellt eine Sicherheitspause dar, in der die Zelle sich vergewissert, ob die DNA-Replikation vollständig abgeschlossen wurde, bevor sie in die Mitose eintritt. Die Zellen, die sich nicht teilen, verbleiben in einer etwas modifizierten G1-Phase, der G0-Phase. Eine Zelle verbringt die meiste Zeit ihres Lebens in der G0- oder G1-Phase. In dieser Phase leistet das Genom den größten Teil seiner Arbeit (Strachan und Read, 2005).

Die Dauer eines Zellzyklus ist von Zelltyp zu Zelltyp sehr verschieden. Dies variiert von wenigen Minuten bis hin zu vielen Monaten. Embryonen von Fliegen haben den kürzesten bekannten Zellzyklus, von achtminütiger Dauer, während Leberzellen eines Säugers für ihren Zellteilungszyklus ein Jahr benötigen. Auch innerhalb der verschiedenen Zelltypen im menschlichen Organismus gibt es Schwankungen. Neuronen vermehren sich überhaupt nicht mehr, Leberzellen teilen sich ein bis zwei Mal im Jahr, während sich Darmepithelzellen zwei Mal am Tag verdoppeln und so für eine ständige Erneuerung des Darmepithels sorgen. Die Schwankungen in der Zellzyklusdauer menschlicher Zellen beruhen auf deren Fähigkeit, in die G0-Phase einzutreten. Zellen, die sich langsam teilen, werden in der G0-Phase für Wochen oder sogar Jahre festgehalten. Dagegen ist die Zeit die eine Zelle von Beginn der S-Phase bis zur Mitose benötigt ziemlich kurz und konstant (Alberts et al., 1995).

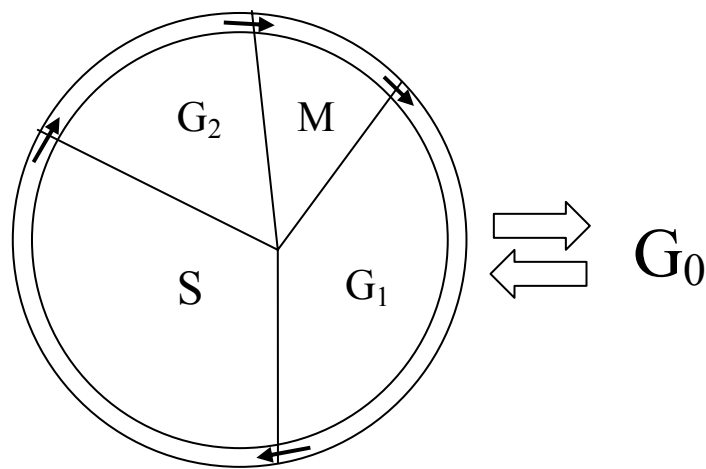


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zellteilungszyklus mit den vier aufeinanderfolgenden Stadien, der Synthese-Phase, der G₁- und G₂-Phase, die der Zelle Zeit zum Wachstum geben (diese drei bilden zusammen die Interphase) und der M-Phase, die die Kernteilung und die Zellteilung umfasst. Die G₀-Phase stellt eine etwas modifizierte G₁-Phase dar.

1.4 Kernteilung (Mitose)

Die Mitose verläuft in verschiedene aufeinander folgende Phasen: die Prophase, die Prometaphase, die Metaphase, die Anaphase und die Telophase. Diesen Phasen schließt sich letztendlich die Cytokinese (Abb.12F) an, in der sich die Zelle in zwei Tochterzellen teilt. Diese beginnt während der Anaphase und setzt sich bis zum Ende der Mitose fort. Während der Interphase ist die Kernhülle intakt und die Chromosomen sind nicht sichtbar. Während der Prophase (Abb.2A) und der Prometaphase (Abb.2B) zerfällt die Kernmembran. Der Inhalt des Zellkerns kondensiert zu sichtbaren Chromosomen und zelluläre Mikrotubuli bilden die Mitosespindel, die später die Chromosomen trennen. In dem als Metaphase (Abb.12C) bezeichneten darauf folgenden Stadium sind die bereits verdoppelten Chromosomen an die Mitosespindel aufgereiht und warten auf ihre Trennung. Die Trennung der verdoppelten Chromosomen findet während der Anaphase (Abb.12D) statt. Dabei wandern die Schwesterchromatiden jeweils zum entgegengesetzten Pol, wo sie während der Telophase (Abb.12E) decondensieren und neue Zellkerne bilden.

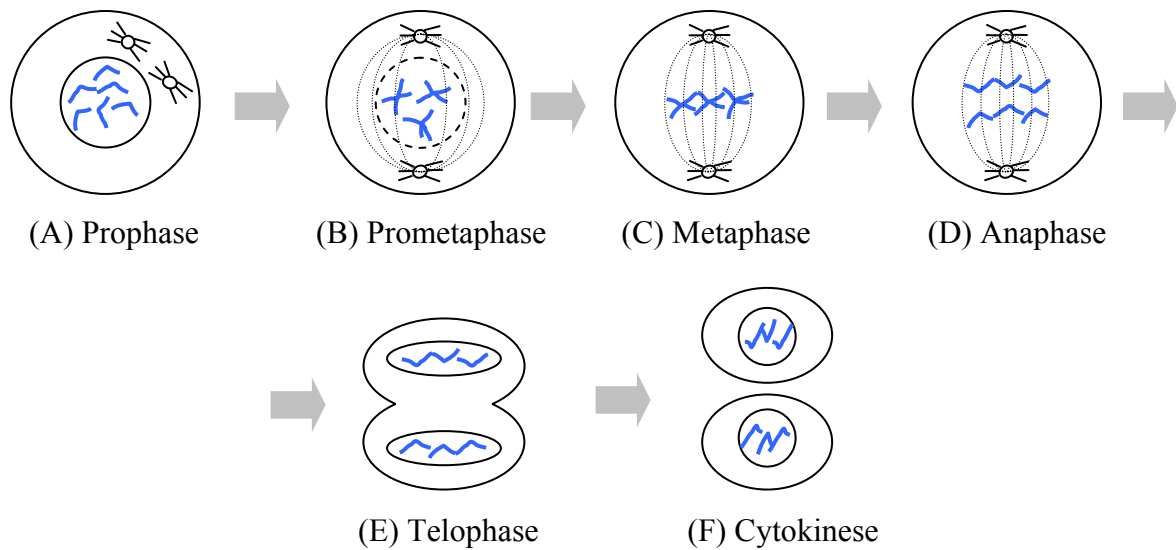


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Zellteilung durch Mitose (nach Strachan und Read, 2005)

1.5 Zellzykluskontrollpunkte und Reparaturmechanismen

Eine proliferierende Zelle durchläuft den Zellteilungszyklus unter extrem stringenter Kontrolle. Die vielfältigen Kontrollmechanismen gewährleisten im Normalfall, dass die Erbinformation einer Zelle identisch, fehlerfrei und ungeschädigt auf die Tochterzelle weitervererbt wird. Bei Versagen dieser Kontrollmechanismen kann unregelmäßiges Wachstum entstehen. Zellzyklus-Kontrollpunkte sind regulierende Bahnen, die sicherstellen, dass die entscheidenden Ereignisse im Zellzyklus, wie DNA-Replikation und Chromosomensegregation, mit hoher Genauigkeit ablaufen. Durch Ankopplung der Kontrollpunkte an die Reparaturereignisse erhöht das System die Wahrscheinlichkeit, dass der Zellzyklus erst dann fortfährt, nachdem die DNA-Reparatur abgeschlossen ist (Kaufmann und Paules, 1996). DNA-Schaden und Zellzykluskontrolle sind untrennbar verbunden mit DNA-Reparatur. Kontrollpunkte reagieren auf DNA-Schäden indem sie den Zellzyklus anhalten, um mehr Zeit bereitzustellen für die DNA-Reparatur. Kontrollpunktverlust hat genomische Instabilität und somit die Umwandlung normaler Zellen in Krebszellen zur Folge (Elledge, 1996). Neuere Untersuchungen (Übersicht in Zhou und Elledge, 2000; Smith et al., 2002; Nyberg et al., 2002; Li und Zou, 2005) gewähren Einblicke auf molekularer

Ebene in die Komplexität der Mechanismen, welche DNA-Schäden, Zellzykluskontrolle und DNA-Reparatur miteinander verbinden.

Im normalen Zellzyklus wird das Kontrollsystem durch bestimmte Bremsen reguliert, die den Zellteilungszyklus an bestimmten Stellen (=Restriktionspunkte) anhalten können. Rückkopplungssignale können Informationen über die nachgeordneten Prozesse geben und diese verzögern, bis die vorherigen beendet sind. Die beiden wichtigsten Restriktionspunkte des Zellzyklus liegen in der G1-Phase, vor dem Übergang in die S-Phase und in der G2-Phase, vor der Einleitung der Mitose. Am G1-Restriktionspunkt überprüft die Zelle die mutationsfreie Integrität der eigenen genomischen DNA. Die Zelle kann am Restriktionspunkt verharren, um notwendige Reparaturen durchzuführen bzw. wichtige physiologische Vorbereitungen zu treffen. Verbieten die Umstände eine Zellteilung, so kommt es bei vielen Zellen an dieser Stelle zum Stillstand des Zellzyklus. Ausgedehnter DNA-Schaden, welcher nicht repariert werden kann, führt dazu, dass Zelltod durch Apoptose eingeleitet wird. Es gibt Hinweise darauf, dass Zellzykluskontrolle und Apoptose aufeinander abgestimmte Prozesse sind (Nyberg et al., 2002).

Nach Überschreiten des G1-Restriktionspunktes durchläuft die Zelle grundsätzlich einen vollständigen Zellzyklus in die nächste G1-Phase hinein. Der Übergang von G2- zur M-Phase scheint mehrere Kontrollpunkte zu beinhalten, der S-Phase und der Topoisomerase-II-abhängige Kontrollpunkt gehören dazu. Der S-Phase-Kontrollpunkt sorgt dafür, dass der Beginn der Mitose von der Beendigung der DNA-Replikation abhängig ist. Der Topo-II-Kontrollpunkt trifft bereits während der G2-Phase Vorbereitungen, damit Chromosomenkondensation und -trennung während der Mitose fehlerfrei ablaufen können (Smith et al., 2002). Olivieri und Micheli, (1983) haben gezeigt, dass umso länger die Zellen nach Bestrahlung den Eintritt in die Mitose verzögert haben, desto geringer die Anzahl der induzierten chromosomalen Aberrationen war (Olivieri und Micheli, 1983). Der G2-Kontrollpunkt scheint also vor allem mehr Zeit für die Reparatur von DNA-Schäden vor dem Eintritt in die Mitose bereitzustellen. Ein weiterer Kontrollpunkt, der Spindelkontrollpunkt, soll eine Segregation der Chromosomen vermeiden, bevor sie alle korrekt an den Spindelfasern befestigt sind (Elledge, 1996). Es gibt Hinweise darauf, dass Defekte im Spindelkontrollpunkt zu einer erhöhten genomischen Instabilität führen (Yoon et al., 2002).

Neben der Beschaffung von Zeit für die DNA-Reparatur und der Koordination aufeinander folgender Schritte im Zellzyklus (Kaufmann und Paules, 1996) können Kontrollpunkte auch als komplexe Signalübertragungswege fungieren, welche die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen, die Bewegung von DNA-Reparaturproteine an Stellen mit DNA-Schaden und in manchen Zelltypen die Einleitung von Zelltod durch Apoptose bei irreparablen Schaden kontrollieren (Zhou und Elledge, 2000).

Beispiele für die ausgefeilten Reparaturmechanismen, mit deren Hilfe sich unser Organismus dagegen wehrt, dass die DNA-Schäden zu bleibenden Veränderungen unserer Erbinformation und damit zu Mutationen führen, sind die direkte Reparatur des DNA-Schadens, welche allerdings selten vorkommt, die Basen-Exzisionsreparatur, die Nucleotid-Exzisionsreparatur und die postreplikativen Mismatchreparatur. DNA-Schaden kann zwar meistens durch spezielle Enzyme repariert werden, jedoch ist der Reparaturvorgang zeitabhängig und erzielt nie ganz vollständige Resultate. Wiederholte Expositionen gegenüber genotoxischen Stoffen führen zu einer Akkumulation von DNA-Schäden, die in Abhängigkeit von Höhe und Dauer der Exposition, sowie der Lebensdauer der betroffenen Zellen, Mutationen oder Kanzerogenität verursachen können. Eine Vielzahl neuerer Untersuchungen unterstützt die Hypothese, nach der die genetische Instabilität von Tumorzellen durch den Ausfall eines oder mehrerer Reparatur- und Kontrollsysteme bedingt ist (Strachan und Read, 2005).

Viele Erkrankungen des Menschen, bei denen eine Überempfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Faktoren vorliegt, werden jedoch nicht direkt durch Defekte der DNA-Reparatursysteme verursacht, sondern durch eine gestörte zelluläre Reaktion auf solche Schäden. Die Zellen von Menschen, die an Ataxia teleangiectasia leiden reagieren zum Beispiel überempfindlich auf Strahlung, ihre Chromosomen sind instabil und die Betroffenen haben ein erhöhtes Risiko an bösartigen Tumoren zu erkranken, wobei aber die DNA-Reparatursysteme intakt sind (Strachan und Read, 2005). Obwohl die AT-Zellen scheinbar die Fähigkeit besitzen die meisten DNA-Schäden normal zu reparieren, haben sie weniger Zeit für die Reparatur, bevor DNA-Replikation oder Mitose stattfinden (Kaufmann und Paules, 1996).

1.6 Mikrokerne

Mikrokerne stellen separierte Teile des Kernmaterials dar, die eine eigenständige Kernhülle besitzen, in der Mitose in Erscheinung treten können und nach erfolgter Cytokinese vom Zellkern getrennt vorliegen. Mikrokernbildung ist zu einem wichtigen Indikator von Genotoxizität geworden (Miller et al., 1998).

Mikrokerne entstehen durch Ausschluss ganzer Chromosomen oder chromatinhaltiger Fragmente während der Zellteilung. Wheeler et al., (1986) haben festgestellt, dass die meisten deplatzierten Chromosomen während der Metaphase wieder integriert wurden (Wheeler et al., 1986). Eckert und Stopper, (1996) haben mithilfe der supravitalen UV-Mikroskopie (Schiffmann und DeBoni, 1991) 22 solcher Metaphasen, welche deplatzierte Chromosomen enthielten, verfolgt. Nur aus einer dieser Metaphasen ist ein Mikrokern hervorgegangen, indem die Mitose weiterhin mit disloziertem Chromosom verlief, alle anderen wurden wieder integriert (Eckert und Stopper, 1996).

Das Schicksal mikrokernhaltiger Zellen ist noch nicht vollständig geklärt. Mikrokerne haben die Fähigkeit zur DNA-Synthese. Falls eine Reintegration dieser DNA in das Genom der Zelle während der darauf folgenden Mitose erfolgt, könnte daraus eine normale Zelle resultieren. Je nachdem für welche Gene die DNA, die in den Mikrokernen eingeschlossen ist, kodiert, kann der Verlust des Mikrokernes zu einer Mutation führen. Wenn z.B. ein Tumorsuppressorgen im Mikrokern enthalten ist, könnte dessen Verlust ein Schritt in Richtung Karzinogenese bedeuten. Mikrokernbildung könnte aber auch ein Weg für die Elimination genetischer Schäden sein (Stopper und Müller, 1997).

Mikrokerne kommen in den Zellen verschiedenster Gewebe und Organismen spontan vor. Ihre Häufigkeit ist unter bestimmten Umständen jedoch erhöht, z.B. bei Präkanzerosen, bei Tumoren, nach Kontakt mit bestimmten Xenobiotika. Die Steigerung der Mikrokernrate bei Präkanzerosen und die bestehende Korrelation zwischen der Mikrokernrate und dem Malignitätsgrad der Zellen sind Hinweise darauf, dass die Mikrokernbildung ein wichtiger Prozess in der Karzinogenese darstellt.

Mikrokerntests können *in vitro* oder *in vivo* durchgeführt werden. Die Untersuchung der Mikrokerne *in vivo* basiert ursprünglich auf der Auswertung von Mikrokerneln in unreifen Erythrozyten aus dem Knochenmark von Nagetieren, eine recht aufwendige Methode. MacGregor et al., (1980) haben den Mikrokerntest *in vivo* im peripheren Blut, an unreifen Erythrozyten von Mäusen, durchgeführt. Jedoch war es zum damaligen Zeitpunkt noch schwierig diesen Test zuverlässig auszuwerten, wegen dem geringen Anteil unreifer Erythrozyten im peripheren Blut. Nach der Einführung der Acridin-Orange Färbemethode durch Hayashi et al., (1990) wurde es einfacher die unreifen Erythrozyten im peripheren Blut zu unterscheiden. Seitdem kann die von MacGregor entwickelte Methode problemlos angewendet werden, um im peripheren Blut von z.B. Insekten, Fischen oder Menschen die Mikrokernelrate zu untersuchen (Sato und Tomita, 2001).

Die Einführung der Cytochalasin B Methode hat den Mikrokerntest weiterhin optimiert. Cytochalasin B hemmt die Cytokinese aber nicht die Mitose dadurch, dass es die Bildung kontraktile Mikrofilamente, welche für die Zellteilung notwendig sind, stört. Es entstehen mehrkernige Zellen (Fenech, 1993). Wenn man nur die doppelkernigen Zellen nach Mikrokerneln auswertet, kann man genau die Anzahl der Mikrokerne, die während eines einzigen Zellzyklus entstanden sind, bestimmen. Da Mikrokerne nur in proliferierenden Zellen entstehen können, erhöht die Zugabe von Cytochalasin B die Genauigkeit des Tests und schützt vor Verwechslung mit anderen Effekten (Fenech et al., 2003).

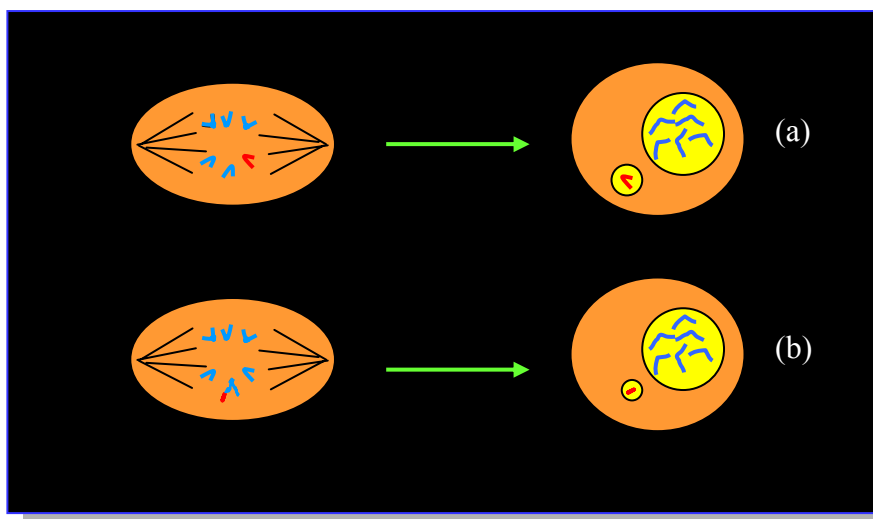


Abbildung 3: Mit Hilfe des Mikrokerntestes können sowohl aneugen, als auch klastogen wirkende Agentien detektiert und differenziert werden, da sowohl fehlverteilte ganze Chromosomen (a), als auch Chromosomenfragmente (b) nach der Zellteilung Mikrokerne bilden.

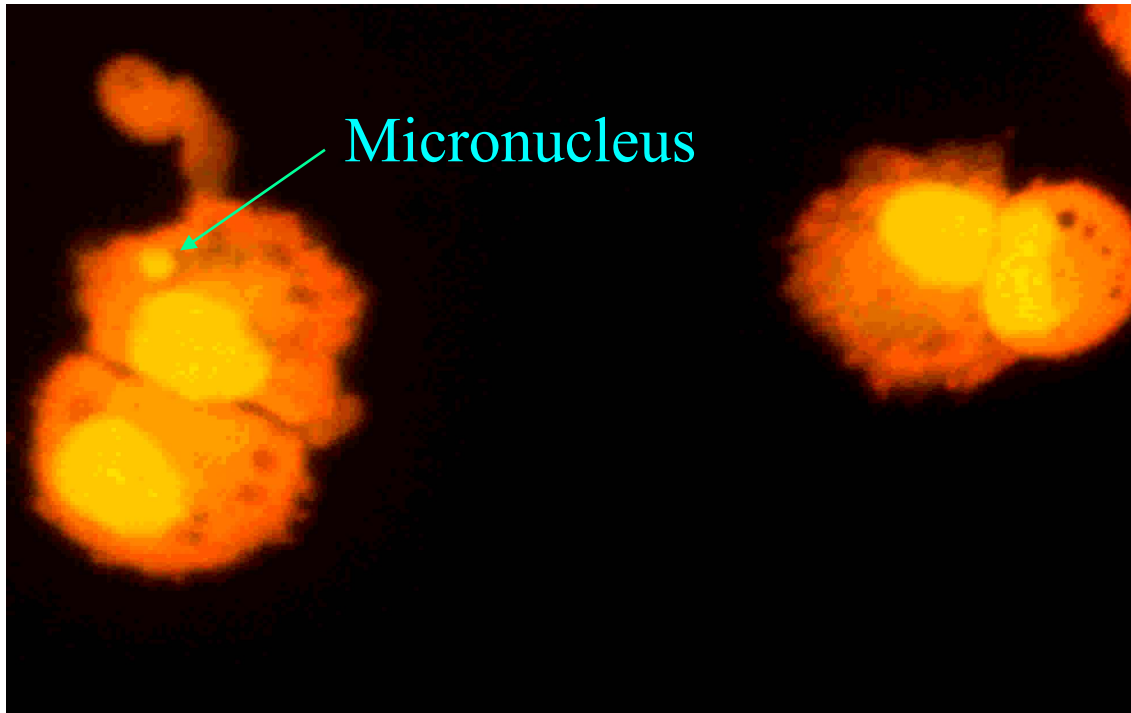


Abbildung 4: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung eines Mikrokerns nach Behandlung der MCF-7 Zellen mit Östradiol und anschließender Acridin-Orange-Färbung

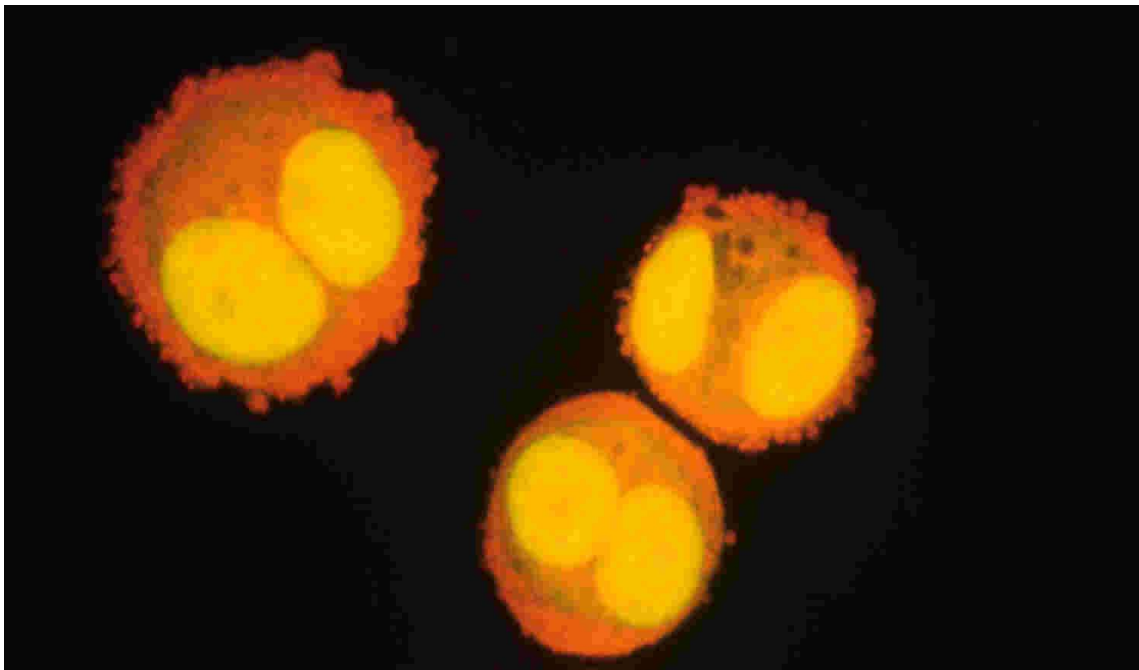


Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung doppelkerniger Zellen nach Behandlung der Zellen mit Cythochalasin B und anschließender Acridin-Orange-Färbung

1.7 Sexualhormone und Karzinogenese

Bösartige Neubildungen in hormonempfindlichem Gewebe kommen in den USA in 35% aller neudiagnostizierten Tumoren bei Männern und 40% bei Frauen vor (Wingo et al., 1995). Tumore, welche im Zusammenhang mit hormoneller Aktivität entstehen, speziell das Brust-, Endometrium-, Ovarial-, Prostata-, Hoden-, Schilddrüsenkarzinom und das Osteosarkom, teilen einen besonderen Entstehungsmechanismus. In diesen Geweben können sowohl endogene als auch exogene Hormone die Anzahl der Zellteilungen und somit die Chance für die Entstehung und Akkumulation von zufälligen Genomschäden durch die Beschleunigung der Zellproliferation erhöhen (Henderson und Feigelson, 2000). Gemeinsam mit anderen Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren, beeinflussen Sexualhormone das Wachstum von Zellen und deren Funktion.

Die Sexualhormone (Östrogene und Androgene) sind Steroidhormone, sie leiten sich vom Cholesterin ab. Steroidhormone sind biochemische Stoffe, die im Körper gebildet werden und wegen ihrer hohen Wirksamkeit bereits in kleinsten Dosen Stoffwechselforgänge, sowie das Zusammenspiel der Zellen und Organe beeinflussen. Die verschiedenen Sexualhormone (Androgene und Östrogene) werden von beiden Geschlechtern synthetisiert, lediglich die Mengenverhältnisse sind verschieden. Östrogene werden vor allem im Ovar und in der Plazenta (während der Schwangerschaft) gebildet, in geringen Mengen auch in den Nebennieren und den Hoden. Außerdem können Östrogene durch Aromatisierung von Androgenen im Fettgewebe entstehen.

Östrogene und Gestagene regulieren nahezu alle Fortpflanzungsvorgänge bei der Frau. Sie entfalten sexualspezifische Wirkungen am Uterus, der Cervix, der Vagina und am Brustgewebe. Am Uterus bewirken Östrogene ein Wachstum aller Schichten. Das Endometrium proliferiert, die Muskelfasern nehmen an Zahl und Größe zu, die Durchblutung ist vermehrt. Auch das Wachstum der Brustdrüse wird stimuliert (Pike et al., 1993). Im Zusammenhang mit Progesteron erhalten Östrogene die Schwangerschaft. Beim Mann fördern Östrogene das Wachstum des Prostatamittellappens. Es gibt aber auch eine ganze Reihe sexualunspezifischer Wirkungen im Körper. So werden durch hormonelle Schwankungen im Blut z.B. die Proteinsynthese in der Leber, die Gehirn- und Hypophysenfunktion und auch die Gefäßreagibilität beeinflusst. Im Knochen gibt es spezifische Steroidrezeptoren,

welche die hormonelle Wirkung erklären. In erster Linie werden die genannten hormonellen Wirkungen durch das Vorhandensein spezifischer Hormonrezeptoren bedingt, es gibt aber auch von Steroidrezeptoren unabhängige Wirkungen (Warwzyn und Hesch, 1999). Drei verschiedene Östrogenrezeptoren am Zellkern (alpha, beta und gamma), sowie verschiedene Membranrezeptoren und ein mitochondrialer Rezeptor wurden beschrieben (McLachlan, 2001). Dies legt eine zuvor unbekannte Vielfalt an Übertragungswegen nahe, über die östrogenhaltige Substanzen verfügen. Die karzinogene Aktivität von Östradiol wurde bereits in vielen Studien nachgewiesen. Bei Mäusen wurde nach Gabe von Östradiol eine erhöhte Inzidenz an Brustkrebs, Gebärmutterkrebs und anderen Arten von Karzinomen festgestellt (Highman et al., 1981; Nagasawa et al., 1980).

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung und Krebstodesursache bei Frauen in der westlichen Welt. Die Inzidenz für Brustkrebs nimmt außerdem kontinuierlich zu (Key et al., 2001). Anhand von Untersuchungen an Brustkrebszellen, welche sowohl in vitro als auch in Zellbiopsien durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass unter dem Einfluss von Östrogenen eine vermehrte mitotische Wirkung nachzuweisen ist, welche eine wesentliche Voraussetzung für die Akquirierung somatischer Mutationen ist (Longman et al., 1987; Vogel et al., 1981). Da nur für einen kleinen Anteil an Mammakarzinomen genomische (also ererbte) Mutationen verantwortlich sind (Chang-Claude et al., 1995), ist das Verständnis der Entstehung von somatischen (also erworbenen) Mutationen sehr bedeutend.

Epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Familienanamnese für Brustkrebs, eine benigne Mastopathie, eine frühe Menarche, regelmäßige ovulatorische Menstruationszyklen, eine späte Menopause, eine späte erste Schwangerschaft oder Nulliparität und postmenopausale Adipositas zu einem erhöhten Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, führen (Henderson und Feigelson, 2000). Diesen Risikofaktoren ist der Zusammenhang mit den Sexualhormonen gemeinsam (Wawrzyn und Hesch, 1999). Sie können als Maß für die kumulative Dosis Östrogen, welcher das Brustgewebe über Jahre ausgesetzt ist, angesehen werden. Junges Alter bei der ersten Schwangerschaft führt zu einer frühen Differenzierung von Brustzellen und somit zu einer geringeren Zellteilungsrate. Prolongiertes Stillen und physische Aktivität können die Anzahl ovulatorischer Zyklen senken und somit einen protektiven Effekt haben (Henderson und Feigelson, 2000). Der

protektive Effekt des prolongierten Stillens wird auch dadurch erklärt, dass die karzinogenen Substanzen aus der Brust mit der Milch abgegeben werden (Freund et al., 2005). Während das Endometrium und somit auch die während der hormonellen Stimulation aufgetretenen Genschäden abgestoßen werden, hat das Brustepithel außerhalb des Stillvorganges nicht die Möglichkeit der Abstoßung genetisch defekter Zellen, die daher akkumulieren können (Wawrzyn und Hesch, 1999). Das höchste Risiko an einem Endometriumkarzinom zu erkranken haben Frauen die Nullipara sind. Das Risiko sinkt mit jeder Schwangerschaft. Das wird dadurch erklärt, dass während der Schwangerschaft, wegen den anhaltend hohen Progesteron Konzentrationen, keine Mitoseaktivität stattfindet (Henderson und Feigelson, 2000).

Eine ständige oder zyklische hormonelle Stimulation der Brust kann zu einer Akkumulation von somatischen Mutationen führen. Dieser Umstand kann in einer malignen Transformation münden (Wawrzyn und Hesch, 1999). Tekmal et al., (1996) konnten an transgenen Mäusen mit einer erhöhten Aromataseaktivität, die also lokal aus Steroidvorstufen Östrogen synthetisieren, einen direkten Einfluss der endogenen Östrogenproduktion auf präneoplastische Veränderungen der Brust nachweisen.

Die Wirkung des Östrogens ist jedoch nicht alleine auf die endogene Produktion beschränkt. Sie kann auch durch eine exogene Applikation, z.B. von Kontrazeptiva oder Hormonersatztherapie und epigenetischen Faktoren, z.B. Umwelteinflüsse und Toxine erfolgen. Es wird angenommen, dass die durch Östradiol verursachte Karzinogenität das Ergebnis einer Kombination von hormonellen und genotoxischen Mechanismen ist (Roy und Liehr, 1999). Östrogene fördern zudem in Tumorzellen die Sekretion lysosomaler Proteine, die das maligne Wachstum und die Ausbreitung von Metastasen begünstigen. Entsprechend lassen sich hormonsensible Tumoren durch die Entfernung hormonproduzierender Drüsen günstig beeinflussen. Experimente mit Nagetieren haben gezeigt, dass die Entfernung der Ovarien oder die Zugabe von Antiöstrogenen einen protektiven Effekt haben kann (Henderson und Feigelson, 2000). Tamoxifen und sein aktiverer Metabolit 4-Hydroxytamoxifen üben eine antiöstrogene Wirkung durch kompetitive Hemmung am Östrogenrezeptor aus, induzieren aber auch andere zelluläre Effekte wie eine antioxidative Wirkung (Custodio et al., 1994). Eine Indikation für Tamoxifen stellt das hormonsensible metastasierende Mammakarzinom.

1.8 MCF-7 Zellproliferationstest (E-SCREEN)

Der MCF-7 Zellproliferationstest (E-SCREEN) hat an Popularität gewonnen als ein schneller und einfacher Test, mit dessen Hilfe man schwach östrogenwirksame chemische Verbindungen ausfindig machen kann. Der „E-SCREEN“ (Payne et al., 2000) ist ein viel benutztes System mit dessen Hilfe man die Fähigkeit der Substanzen, eine hormonelle Antwort zu induzieren, überprüft. Dieser Test basiert auf die Zellproliferation der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7. Ein dosisabhängiger Zuwachs der Zellzahlen in den behandelten Kulturen wird als Nachweis für die östrogene Wirkung der Testsubstanzen angesehen (Soto et al., 1995).

Dieser Test wird zunehmend genutzt, da seit Beginn der 60er Jahre die Sorge gewachsen ist, dass eine Menge Substanzen welche vermehrt in die Umwelt freigesetzt wurden, schwach östrogen wirksam sind. In letzter Zeit haben Wissenschaftler diese „endokrinen Störfaktoren“ mit dem Zuwachs von Fertilitätsstörungen und der Zunahme von Tumoren in hormonsensitiven Geweben im Zusammenhang gebracht und das Interesse, endokrin wirksame Faktoren in unserer Umwelt ausfindig zu machen, ist gewachsen. Dazu eignet sich der MCF-7 Zellproliferationstest.

Payne et al., (2000) haben diesen viel benutzten Test standardisiert und optimiert. Bei der Durchführung des E-Screens wurden ursprünglich eine Vielzahl verschiedener MCF-7 Zellsublinien, welche im Laufe der Zeit durch Mutationen entstanden sind, verwendet. Es gab eine Reihe weiterer inhomogener Faktoren, wie z.B. Anfangszellzahl, Dauer der Kulturen, Zeitpunkt der Zugabe der Testsubstanzen, welche zu einer hohen Variabilität in den Testergebnissen geführt haben. Payne et al., (2000) fanden heraus, dass eine Inkubation der Zellen für 72 h in östrogenfreiem Medium vor Zugabe der Testsubstanzen zu einer sensitiveren Antwort führt durch Hochregulierung der Östrogenrezeptoren in den verwendeten MCF-7 Zellen. Sie verwendeten außerdem für die weiteren Experimente die Zellsublinie MCF-7 SOP, da diese der ursprünglichen, aus dem Pleuraerguss eines metastasierenden Mammakarzinoms entnommenen Zelllinie, am nächsten kam.

1.9 Fragestellung dieser Arbeit

Wenn man die Hintergründe der Krebsentstehung betrachtet, dann stößt man auf viele Daten, Mechanismen und Hypothesen, die wie die Teile eines Puzzles auch nebeneinander Gültigkeit haben und ineinander greifen können. Trotz der reichhaltigen Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der Karzinogenese sind noch viele Fragen zur Entstehung und Behandlung von Tumoren offen. Wir haben uns in der vorliegenden Arbeit einem Puzzleteilchen zugewandt, welches bei besserem Verständnis in Zukunft dazu beitragen könnte, das Bild über die Tumorentstehung zu vervollständigen.

Wir sind der Hypothese nachgegangen, dass die Stimulation der Zellproliferation an sich, ein erhöhtes Risiko in der Karzinogenese bedeuten könnte, und zwar dadurch, dass die Zellen beschleunigt und gedrängt den Zellzyklus durchlaufen müssen und dadurch nicht genügend Zeit für die sehr wichtigen Reparaturmechanismen verbleibt. Die Zellen würden somit eine erniedrigte Kapazität besitzen, um vorhandene Fehler zu korrigieren und aufgetretene DNA-Schäden würden eher zum Tragen kommen als in Zellen, die in Ruhe den Zellteilungszyklus und die dazugehörigen Reparaturmechanismen durchlaufen können.

Es stellte sich somit die Frage nach dem kausalen Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Zellproliferation und einer erhöhten genomischen Instabilität im menschlichen Organismus. Da die einzelnen Zellen im gesamten Organismus der genauen Beobachtung von Zellproliferation und Zellzykluskinetik kaum zugänglich sind, wurde in dieser Arbeit ein Modellsystem bestehend aus der östrogenrezeptorpositiven Brustkrebszelllinie MCF-7 und der östrogenrezeptornegativen Brustkrebszelllinie MDA-MB231 ausgewählt. Diese wurden mit verschiedenen Substanzen, darunter 17- β -Östradiol und 4-Hydroxytamoxifen behandelt und hinsichtlich Zellproliferationsverhalten und genomischer Instabilität untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturen

2.1.1 Allgemeines zur Zellkultur

Aus dem Tier oder Menschen entnommene Zellen lassen sich für bestimmte Zeit in geeignete Medien kultivieren. Diese so genannten Primärzellen können nur eine begrenzte Anzahl von Zellteilungen durchlaufen. Die Anzahl von Zellteilungen ist abhängig von der Zellart, der Tierspezies und dem Lebensalter des Spendertieres. Embryonalzellen können sich am häufigsten teilen.

Durch bestimmte (z. B. mutagene) Behandlung der Zellen entstehen manchmal Kulturen, die veränderte Charakteristika aufweisen und sich unbegrenzt zu teilen vermögen. Diese werden als Permanentzelllinien bezeichnet.

Auch aus Tumoren lassen sich Zellkulturen etablieren, die unbegrenzt teilungsfähig sind. Permanente Zelllinien und Tumorzelllinien, aber auch Primärkulturen können sich im Verlauf der Kulturzeit verändern. So werden Umlagerungen im Karyotyp (Chromosomengröße, -form und -zahl) und Verlust bestimmter für die Zelle in Kultur nicht lebenswichtiger Funktionen (z. B. Stoffwechsellzyme) beobachtet.

Zelllinien lassen sich in zwei Kategorien einteilen: adhärente Zellen, d. h. in Monolayern wachsende Zellen und nicht adhärente Zellen, die als Suspension kultiviert werden. Da sich adhärente Zellen an die Oberfläche der Kulturflasche oder -schale anheften, müssen sie vor Gebrauch erst von diesem Substrat abgelöst werden. Dagegen binden sich Zellen in Suspensionskulturen normalerweise nicht an die Oberfläche des Kulturgefäßes. Die Wachstumseigenschaften der Zellen in Kultur (in vitro) sind gewöhnlich mit dem Herkunftsort dieser Zellen im intakten Organismus (in vivo) korreliert. Zum Beispiel stammen fast alle Zellen, die in Suspensionskulturen gedeihen, von Zellen des Immunsystems oder deren Vorläufer ab. In vivo zirkulieren diese Zellen im Blutstrom und neigen nicht dazu, sich an den verschiedenen ihnen zugänglichen Substraten anzuheften. Adhärente Zellen dagegen leiten sich von bestimmten Geweben oder Organen ab, beispielsweise von

der Muskulatur, den Nerven, der Leber oder den Nieren und sind im intakten Organismus nicht beweglich.

2.1.2 Beurteilung der Zellkulturen

Schon die Farbe des Kulturmediums kann Hinweise auf den Zustand der Zellen liefern. Eine Gelbfärbung des Mediums kann eine zu hohe CO₂-Konzentration oder eine überalterte Kultur anzeigen (d. h. die Zellen haben alle Nährstoffe aufgebraucht und das Medium vollständig ausgeschöpft). Ein trübes Medium kann zusätzlich bedeuten, dass die Kultur kontaminiert ist. Dagegen ist eine dunkelrote oder violette Färbung des Mediums ein Indiz dafür, dass die Kulturen nicht richtig begast werden, entweder weil die Verschlüsse der Kulturgefäße nur unzureichend geöffnet sind, oder weil der CO₂-Vorrat erschöpft ist.

Adhärente Zellen sollten normalerweise als Monolayer auf der Oberfläche des Kulturgefäßes verteilt sein. Dabei kann ein kleiner Teil der Zellen sich auch in Suspension befinden oder an der Unterlage angeheftet, aber nicht ausgebreitet sein. Die freischwimmenden Zellen sind gerade aus einer Zellteilung hervorgegangen und haben noch keinen Platz gefunden, um sich anzuheften. Man bezeichnet die Kultur als konfluent, wenn zwischen den Zellen keine freie Oberfläche mehr zu erkennen ist und sie sich gegenseitig berühren. Normalerweise unterliegen Zellen einer Kontaktinhibition und stellen das Wachstum ein, sobald sie die Konfluenz erreicht haben. In subkonfluenten Kulturen dagegen stehen sie nicht unmittelbar miteinander in Kontakt und zwischen ihnen ist genügend Freiraum, auf dem sich die durch Teilung neu entstandenen Zellen anheften können. Im Regelfall sollte man die Zellen subkultivieren (passagieren oder aufteilen), bevor die Kultur vollständig konfluent ist.

2.1.3 Verwendete Zellarten

Um die Hypothese zu unterstützen, dass genetische Schäden entstehen können, wenn man die Zellen unter Proliferationsdruck setzt, verwendeten wir eine gut charakterisierte, stimulierbare Zelllinie, i.e. MCF-7 Zellen: Brustkrebszelllinie mit Östrogenrezeptor. Bei den

MCF-7 Zellen konnte ein sehr schönes konzentrationsabhängiges Wachstum nach Zugabe von Östradiol gezeigt werden. Und die MDA-MB231 Zellen: Brustkrebszelllinie ohne Östrogenrezeptor. Ein Vorteil dieses Zellsystems ist, dass man mit den MDA-MB231 Zellen eine sehr gute Kontrollgruppe hat, da MDA-MB231 durch Zugabe von Östradiol nicht stimulierbar sind.

2.1.4 Medien und Puffer für die Zellkultur

MCF-7 und MDA-MB231 Zellen wurde in RPMI 1640 Medium mit NaHCO_3 ohne Glutamin und Phenolrot (Sigma Chemie GmbH, Diesenhofen) kultiviert.

Zusätze auf 500 ml RPMI 1640:

- 25 ml fötales Kälberserum (FBS; eventuell DCC behandelt)
- 5 ml Glutamin (Sigma)
- 2 ml Penicillium/Streptomycin-Lösung
- 0,2 ng/ml Insulin (Sigma)

Ansetzen der Stammlösung des Insulins:

- 1 mg Insulin wird auf 1 ml PBS/CMF-Puffer gegeben. Der zehnte Teil der Lösung (100 μl) wird mit 900 μl PBS/CMF-Puffer verdünnt, wodurch nun eine Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ vorliegt.
- 1/10 dieser Lösung wird nun wiederum mit 900 μl des PBS/CMF-Puffers versetzt. Nun hat die Lösung eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$.
- 1/10 dieser Lösung wird nun mit 900 μl Puffer auf eine Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt.
- Eine weitere Verdünnung ergibt dann eine Konzentration von 100 ng/ml.
- Die nun vorliegende konzentrierte Insulinlösung von 100 ng/ml wird nun auf 500 ml PBS/CMF-Puffer gegeben und man erhält die gewünschte Konzentration von 0,2 ng/ml an Insulin im Medium.

Herstellung von PBS/CMF-Puffer:

- NaCl 8000 mg
- KCl 200 mg
- Na₂HPO₄ * 2H₂O 572 mg
- KH₂PO₄ 200 mg

Es wird mit hochgereinigtem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert (7,0) des Puffers wird anschließend kontrolliert. Danach wird der Puffer autoklaviert.

Herstellung von Sörensen-Puffer:

- 5,84 g Na₂HPO₄ pro 492 ml H₂O
- 4,61 g KH₂PO₄ pro 508 ml H₂O

Diese Substanzen werden miteinander gemischt. Der pH-Wert (6,8) des Puffers wird anschließend kontrolliert.

Herstellung von 0,002% Trypsin-Lösung:

- 2 mg Trypsin werden in 100 ml PBS/CMF-Puffer gelöst
- danach erfolgt die Zugabe von 0,02% EDTA (1 ml auf 100 ml)
- die Lösung wird im Anschluss sterilfiltriert

2.1.5 Einfrieren der Zellen

Um bei eventuellen Misserfolgen in der Kultivierung der Zellen auf ausreichenden Ersatz zurückgreifen zu können, werden von den zugesandten Zelllinien unter sterilen Bedingungen mehrere kleine Ampullen eingefroren.

Zur Vorbereitung werden PBS/CMF-Puffer, Trypsinlösung und das Medium auf 37°C temperiert. Nach Waschen mit 5 ml PBS/CMF-Puffer werden die Zellen mit Hilfe von 2 ml Trypsinlösung (EDTA-Gehalt 0,002%) abgelöst. Nach ca. 30 sec wird die Trypsinlösung entfernt und die Zellkultur ungefähr 1-2 min in den Brutschrank gestellt. Durch leichtes Klopfen des Zellkulturgefäßes auf die innere Handfläche kann das Ablösen beschleunigt werden. Mit dem Lichtmikroskop wird die Ablösung verfolgt. Nun wird mit Medium resuspendiert und die Zellsuspension nach Einbringen in ein Zentrifugenglas bei 1000 rpm und 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der Zellkuchen („pellets“) wird mit 1,7 ml Einfriermedium aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und in ein vorgekühltes Cap gefüllt. Das Cap wird zunächst zwei Stunden bei –20°C belassen und anschließend bei –70°C mindestens sechs Stunden zwischengelagert, bevor es bei –196°C (flüssiger Stickstoff) deponiert wird.

2.1.6 Auftauen der Zellen

Ein Cap mit den aufzutauenden Zellen wird in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C gestellt. Der Inhalt des Caps wird unter sterilen Bedingungen in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt und mit 9 ml Medium aufgefüllt. Nach dem Zentrifugieren (5 min bei 1000 rpm) wird die überstehende Lösung verworfen, die Zellen in 5 ml neuem Medium resuspendiert und auf die bereitgestellten Kulturflaschen aufgeteilt (z. B.: 5 Flaschen mit je 1 ml Zellsuspension und 4 ml Medium).

Da durch die zahlreichen mechanischen und chemischen Belastungen während des Einfrierens bzw. Auftauens die empfindlichen Zellen sehr in Mitleidenschaft gezogen werden, empfiehlt es sich, am nächsten Tag einen Mediumwechsel vorzunehmen, um im Medium schwimmende lose Zelltrümmer zu entfernen.

2.1.7 Zellkultur von MCF-7 und MDA-MB231

- Überstand abnehmen
- Mit 10 ml bei 250 ml Kulturflaschen (oder 5 ml bei 50 ml Flasche)

30 sec lang mit PBS/CMF-Puffer waschen

- Abnehmen und verwerfen des PBS/CMF-Puffers und Zugabe von 1,5 ml (bzw. 0,5 ml) Trypsin/EDTA-Lösung
- Trypsin/EDTA-Lösung nach 30 sec abnehmen und Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ für 2-3 min
- Nach 2-3 min kann das Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop beobachtet werden (die Zellen lösen sich ab und sehen kugelförmig aus)
- Danach werden die Zellen mit 10 ml (oder 5 ml) Zellmedium resuspendiert
- Daraufhin werden die Zellen in neuen Kulturgefäßen zur Rekultivierung ausgesät:
 - 2,5 ml zur Subkultur
 - 7,5 ml für das Experiment
- Der einzige Unterschied bei der Kultur von MDA-MB231 ist ein Waschen der Zellkultur mit PBS/CMF-Puffer nur 10 sec lang (im Gegensatz zu 30 sec bei MCF-7) und das Abnehmen der Trypsin/EDTA-Lösung ebenfalls nach 10 sec

2.2 Zellzahlbestimmung

Bevor man die Zellen subkultiviert oder für ein Experiment verwendet, muss ihre Zahl bestimmt werden. Dies kann entweder mithilfe der Neubauerzählkammer oder mithilfe des automatischen Zellzählers („Coulter-Counter“) geschehen.

Die Vitalität der Zellen kann mithilfe der Trypanblaufärbung bestimmt werden. Dieser Farbstoff kann die Plasmamembran lebender Zellen nicht durchdringen, aber das Zytoplasma toter Zellen färbt sich blau, selbst wenn sie ansonsten völlig intakt erscheinen.

2.2.1 Bestimmung der Zelldichte mithilfe einer Zählkammer

Bei der Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer wird ein spezielles Deckglas benutzt. Der Objektträger wird durch leichtes Anhauchen angefeuchtet und dann auf den Objektträger aufgebracht. Wenn man durch leichtes Schräghalten Newton'sche Ringe sieht, hat man den Objektträger richtig aufgebracht. Mittels einer Pasteurpipette wird eine Zellsus-

pension an den oberen bzw. unteren Rand des Deckglases aufgetragen. Durch Kapillarkräfte wird die Suspension unter das Deckglas gezogen. Unter dem Mikroskop werden die Zellen im zentralen und in den Eckfeldern ausgezählt (Volumen: $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0,1\text{mm} = 0,1\text{mm}^3 = 1\text{ml}$). Der Mittelwert wird gebildet und diese Zahl mit dem Faktor 10^4 multipliziert. Dieser Wert gibt die Anzahl der Zellen in einem Milliliter Zellsuspension wieder.

2.2.2 Bestimmung der Zelldichte mittels Coulter-Counter

Der „Coulter-Counter“ (US-Patent) dient der automatischen Zählung von Zellen in Suspension. Ein definiertes Volumen der mit einer isotonischen Lösung (Isoton II) verdünnten Zellen wird über ein Unterdrucksystem durch eine sehr kleine Öffnung (Durchmesser 0,1 mm) gesaugt. Jede Zelle verursacht dabei eine Änderung des Potentials zwischen zwei Elektroden, die sich vor sowie hinter der Öffnung befinden. Die Potentialänderungen werden automatisch gezählt. Die Summe der Potentialänderungen bezogen auf das durchgesaugte Volumen der Zellsuspension gibt somit die Konzentration der Zellen in der Messlösung an. Bei anliegendem Unterdruck wird ständig Messlösung durch die Öffnung gesaugt. Start und Ende der Zählung werden durch das Öffnen und Schließen eines Stromkreises durch eine Quecksilbersäule geschaltet. Das Quecksilber ist am gleichen Unterdrucksystem angeschlossen und durchläuft während des Messvorganges ein bekanntes Volumen, das mit dem Volumen der Messlösung, die in dieser Zeit die Öffnung passiert, identisch ist.

Bei dieser Art der Zellzählung ist eine vorausgehende vollständige Vereinzelung der Zellen von großer Bedeutung, da auch zusammengeballte Zellen nur als eine einzige Zelle gezählt werden. Zellen, die in Suspension wachsen, lassen sich problemlos zählen. Die Zellzahl von Zellen, die als Monolayer kultiviert werden, wird oft aufgrund von nicht vollständiger Vereinzelung eher unterbestimmt.

Die Zellzahl pro ml errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellen / ml} = \frac{Z \times F_{\text{verd}}}{V}$$

- Z: in der Digitalanzeige des Coulter-Counters ausgegebene Zellzahl. Dieser Wert sollte mindestens 1000 und höchstens 50.000 betragen, um eine ausreichende Genauigkeit der Messung zu gewährleisten. Liegt der Messwert außerhalb dieses Bereiches, so muss die Suspension vor der Zählung entweder schwächer oder stärker mit Isoton II verdünnt werden.
- V: Volumen der während des Zählvorganges durch die Öffnung gesaugten Lösung in ml (meist 0,5 ml)
- F_{verd} : Faktor, der sich aus der Verdünnung der Zellzählung errechnet. Meist werden 0,2 ml Zellsuspension mit Isoton II auf 10 ml aufgefüllt. Daraus errechnet sich ein Verdünnungsfaktor von $10 / 0,2 = 50$

2.3 Verwendete Färbungen

2.3.1 Bisbenzimid Färbung

Die Präparate wurden nachdem sie mindestens eine Stunde in Methanol (-20°C) fixiert wurden, mit PBS/CMF-Puffer für eine Minute gewaschen. Danach wurden sie für drei Minuten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid 33258 (Konzentration: 5 µg/ml in PBS/CMF) gefärbt. Anschließend wurde eine Minute in PBS/CMF-Puffer gewaschen. Danach wurden die Präparate mit Eindecklösung und mit einem Deckgläschen versehen.

2.3.2 Acridin-Orange Färbung

Acridin-Orange wurde als 0,1% Stammlösung angesetzt.

Zur Färbung der Präparate wurden 4,5 ml Stammlösung und 67,5 ml Sörensen-Puffer gemischt. Die Präparate wurden vier Minuten in eine Küvette mit Acridin-Orange gegeben und anschließend zweimal eine Minute in Sörensen-Puffer gewaschen. Die pufferbedeckten Präparate wurden sofort mit einem Deckglas eingedeckt und bald ausgewertet (wichtig die so gefärbten Präparate auszuwerten, bevor das Sörensen-Puffer austrocknet, da danach die Zellen kaputt gehen).

2.4 Durchführung der Experimente

2.4.1 Zellkulturen für Proliferationsversuche mit MCF-7 Zellen

Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit NaHCO_3 ohne Glutamin und Phenolrot (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) mit einer Zelldichte von $0,8-1,0 \times 10^5$ in 25 ml Zellkulturflaschen ausgesät. Vierundzwanzig Stunden später wurde das Medium erneuert und die in Ethanol gelösten Testsubstanzen dazugegeben. Die Endkonzentration an Ethanol überschritt nicht 0,1%. Nach 96 h wurde das Medium erneut gewechselt und eine erneute Zugabe von Testsubstanzen unternommen. Nach 138 h bis 144 h wurden die so behandelten Zellen geerntet und aufgearbeitet.

Zur Aufarbeitung wurde:

- Der Überstand abgenommen
- Die Zellen mit 2,5 ml PBS/CMF-Puffer gewaschen
- Zur Ablösung der Zellen 0,4 ml Trypsin/EDTA-Lösung dazugegeben und die Zellen für 2-3 min bei 37°C inkubiert
- Anschließend mit 4,5 ml Medium resuspendiert

Die Auswertung der Proliferationsrate erfolgte durch Messung der Zellzahl im Coulter-Counter, wie oben beschrieben, dafür wurden 200 μl Zellsuspension mit 9,8 ml Isoton vermischt.

2.4.2 Zellkulturen für Proliferationsversuche mit MDA-MB231

Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit einer Zelldichte von $0,8-1,0 \times 10^5$ in 25 ml Zellkulturflaschen ausgesät. Vierundzwanzig Stunden später wurde das Medium erneuert und die in Ethanol gelösten Testsubstanzen dazugegeben. Die Endkonzentration an Ethanol überschritt nicht 0,1%. Nach 96 h wurde das Medium erneut gewechselt und eine erneute Zugabe von Testsubstanzen unternommen. Die Ernte erfolgte nach 115 h bis 120 h. Die Aufarbeitung und Auswertung erfolgte, wie oben für die MCF-7 Zellen beschrieben.

2.4.3 Zellkulturen unter Zugabe von Cytochalasin B

In den Experimenten mit Cytochalasin B wurden die Zellen unter Zusatz von 2,5 µg/ml Cytochalasin B für 120 h inkubiert. Der Zytokinaseinhibitor Cytochalasin B hemmt die Zellteilung aber nicht die Kernteilung. Dies führt zur Ausbildung doppelkerniger Zellen. Dadurch werden eine Analyse der Zellproliferation im Test sowie eine Beschränkung der Mikrokernauswertung auf mitotisch aktive Zellen möglich.

2.4.4 Vorbereitung der Objektträger

Zunächst wurden die Objektträger 60 Minuten mit Diethyläther/Methanol (Verhältnis 1:1) in einem Schüttelbad gewaschen. Anschließend werden sie für 30 Minuten unter fließendes Leitungswasser, danach jeweils 30 Minuten in deionisiertes Wasser und in hochgereinigtes Wasser (Millipore) gestellt. Die Objektträger wurden dann erneut für 30 Minuten in absolutes Ethanol überführt und anschließend luftgetrocknet.

2.4.5 Herstellung der Präparate

Nach der Versuchsdurchführung wurden die Zellen präpariert. Die gereinigten Objektträger wurden mit einem Lochfilter und einem Tropfentrichter in die dafür vorgesehenen Einsätze eingespannt. Die Zellsuspension wurde mehrmals resuspendiert, um die Zellen gut zu vereinzeln. Mit einer Pasteurpipette wurden einige Tropfen Zellsuspension entnommen und in den Tropfentrichter überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation in der Zytocentrifuge (Cytospin) bei 1000 rpm für die Dauer von 5 Minuten. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die Präparate aus der Halterung entnommen und für einige Sekunden an der Luft trocknen gelassen. Es wurde darauf geachtet, dass die Präparate nicht austrocknen, jedoch auch nicht zu feucht sind, da sich sonst die Zellen vom Objektträger lösen können. Die Zellpräparate wurden anschließend in einer Küvette mit Methanol (bei -20°C) mindestens eine Stunde fixiert.

Die Lagerung erfolgt bei -20°C in Methanol.

2.4.6 Auswertung der Präparate

Nachdem die Präparate hergestellt und in Methanolbad (-20°C) fixiert wurden, wurden sie wie oben beschrieben (unter 2.3.) gefärbt. Anschließend wurden die Mikrokerne mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie bei einer Vergrößerung von 500x bestimmt.

In den Experimenten mit Cytochalasin B wurden nur die doppelkernigen Zellen ausgewertet.

Pro Versuchsansatz wurden drei Objektträger mit je 1000 Zellen ausgewertet und der Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

Die Objektträger wurden vor der Auswertung kodiert und so unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.4.7 Beurteilungskriterien für Mikrokerne

Mikrokerne stellen separierte Teile des Kernmaterials dar, die eine eigenständige Kernhülle besitzen, in der Mitose in Erscheinung treten können und nach erfolgter Zytokinese vom Zellkern getrennt vorliegen. Haupt- und Mikrokern müssen die gleiche Färbung aufweisen. Die Größe der Mikrokerne ist sehr variabel, jedoch sollte die Fläche eines Mikrokernes nicht mehr als ein Drittel der Fläche des Hauptkernes ausmachen. Haupt- und Mikrokern müssen klar voneinander getrennt im Zytoplasma liegen. Die Form der Mikrokerne kann rund bis oval sein.

Untersuchungen zur Mikrokernfrequenz lassen sich in jeder Zellart durchführen, in der die Morphologie des Kerns eine Unterscheidung zwischen einer Kerndeformation und einem Mikrokern zulässt und in der nicht übermäßig häufig fragmentierte oder apoptotische Kerne vorhanden sind.

Bei der Auswertung nach Bisbenzimid-Färbung muss darauf geachtet werden, dass die Mikrokerne deutlich einer Zelle zuzuordnen sind, da in diesem Fall das Zytoplasma nicht angefärbt ist.

Bei der Acridin-Orange-Färbung (Kerne orange, Zytoplasma gelb; v.a. nach Behandlung mit Cytochalasin B wichtig, um doppelkernige Zellen bestimmen zu können) wurden nur die Mikrokerne in den doppelkernigen Zellen gezählt, weiter wurde das Verhältnis der doppelkernigen Zellen zu den Einkernigen ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 MDA-MB231 und MCF-7 mit Östradiol behandelt

In einer ersten Versuchsreihe haben wir die östrogenrezeptorpositive Zelllinie MCF-7 mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol behandelt und die Induktion von Zellproliferation, sowie von chromosomalen Schäden in diesem System untersucht. Parallel dazu haben wir die östrogenrezeptornegative Zelllinie MDA-MB231 nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol untersucht.

3.1.1 Proliferationsversuch mit MCF-7 Zellen unter Zugabe von Östradiol

Zunächst haben wir die östrogenrezeptorpositive Brustkrebszelllinie MCF-7 mit 17- β -Östradiol in einer Konzentration von 100 pM behandelt.

Zum Zeitpunkt 0 haben wir die Zellkulturflaschen mit einer Dichte von $D = 0,77 \pm 0,03 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Nach 22 h fanden ein Mediumwechsel und die Zugabe der Testsubstanzen statt. Nach 96 h ein erneuter Mediumwechsel und erneute Zugabe von Testsubstanzen (100 pM Östradiol in Ethanol gelöst, die Endkonzentration an Ethanol überschritt nicht 0,1%). Nach 142 h fanden Ernte und Aufarbeitung der Zellen statt. Der Überstand wurde verworfen, die Zellkulturen mit PBS/CMF-Puffer gewaschen und durch spülen mit Trypsin/EDTA-Lösung von den Zellkulturflaschen abgelöst. Danach wurden die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert. Die Messung der Zellzahlen fand im Coulter-Counter statt, dazu wurden 200 μ l Zellsuspension und 9,8 ml Isoton vermischt. In einem weiteren Schritt wurden die Zellen mittels Cytospin auf Objektträger aufgetragen. Nach Färbung mit Acridin-Orange wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die Anzahl der Mikrokerne ausgewertet. Dazu wurden 3 x 1000 Zellen pro (kodierten) Objektträger, auf Mikrokerne untersucht.

Die mit 100 pM Östradiol stimulierte Probe zeigte einen deutlichen Proliferationsanstieg gegenüber der unbehandelten Kontrollprobe und der Lösungsmittelkontrolle (siehe Abb.6a). Das Wachstum war bei Östradiol behandelten Zellen um den Faktor 2,95 gegenüber unbehandelten Zellen erhöht. Parallel dazu ergab die Auswertung der Mikroker-

ne/1000 Zellen eine deutliche Steigerung der Mikrokernzahl (54 Mikrokern/1000 Zellen) in der mit Östradiol behandelten Probe, gegenüber der unbehandelten Kontrollprobe (32 Mikrokern/1000 Zellen) (siehe Abb. 6b).

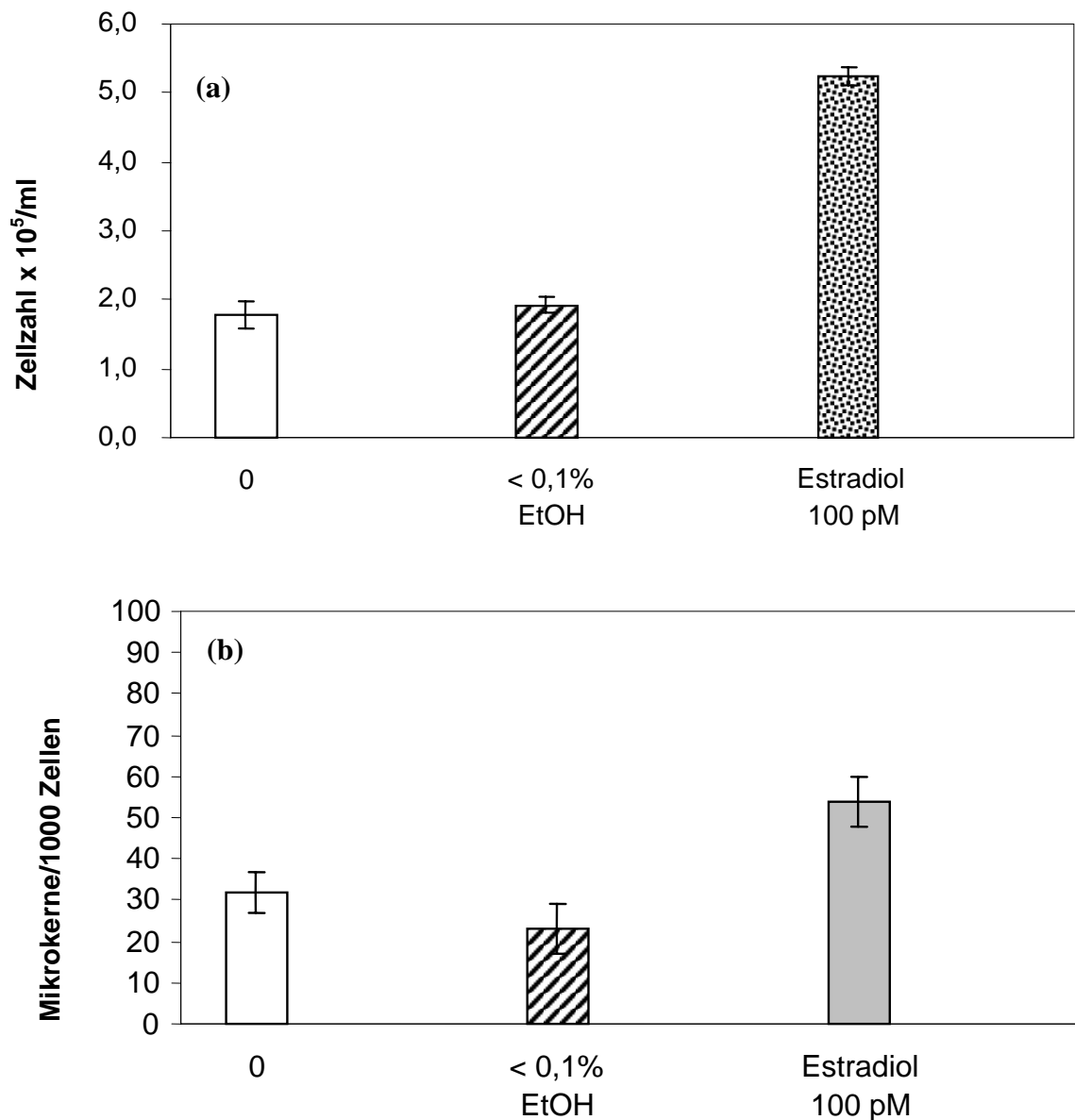


Abbildung 6: (a) Zellproliferation und (b) Mikrokern-Test in der östrogenrezeptor-positiven Brustkrebszelllinie MCF-7 nach Behandlung mit 100 pM Östradiol. K: unbehandelte Kontrolle, LK: Lösungsmittelkontrolle (0,1% Ethanol), E: Östradiol 100 pM. Die Zellen wurden für 142 h mit den Testsubstanzen in RPMI 1640 Medium (phenolrotfrei, kohlebehandelt) inkubiert. Nach der Ernte wurden die Zellzahlen mittels Coulter-Counter bestimmt. Danach wurden die mittels Cytospin auf Objektträgern aufgetragenen und mit Acridin-Orange gefärbten Zellen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Es wurden drei Objektträger mit je 1000 Zellen ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

3.1.2 Kontrollexperiment mit MDA-MB231 unter Zugabe von Östradiol

Um die Induktion der Mikrokerne durch eine direkt genotoxische Wirkung von Östradiol in dieser Konzentration auszuschließen, wurde parallel dazu die östrogenrezeptornegative Brustkrebszelllinie MDA-MB231 mit 17- β -Östradiol in einer Konzentration 100 pM behandelt und anschließend auf Mikrokerne untersucht. Die Experimente mit der MDA-MB231 Zelllinie dienten somit als zusätzliches Kontrollsystem.

Zum Zeitpunkt 0 wurden die Zellkulturflaschen in einer Dichte von $D = 0,99 \pm 0,01 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Nach 21 h fanden ein Mediumwechsel und die Zugabe von Östradiol statt. Nach 96 h folgte ein erneuter Mediumwechsel und erneut die Zugabe von 100 pM Östradiol, in Ethanol gelöst. Die Endkonzentration Ethanol betrug höchstens 0,1%. Nach 118 h wurde geerntet, aufgearbeitet und ausgewertet.

Im Kontrollexperiment mit der östrogenrezeptornegativen Zelllinie MDA-MB231 zeigte die mit 100 pM Östradiol behandelte Probe zum Zeitpunkt der Ernte, gegenüber der unbehandelten Kontrolle und der Lösungsmittelkontrolle, kein vermehrtes Zellwachstum (siehe Abb. 7a). Die Mikrokernzahl (Abb. 7b) in der mit Östradiol behandelten MDA-MB231 Probe zeigt ebenfalls keinen deutlich erhöhten Wert (25 Mikrokerne/1000 Zellen) gegenüber der unbehandelten Kontrolle und der Lösungsmittelkontrolle (19 bzw. 20 Mikrokerne/1000 Zellen).

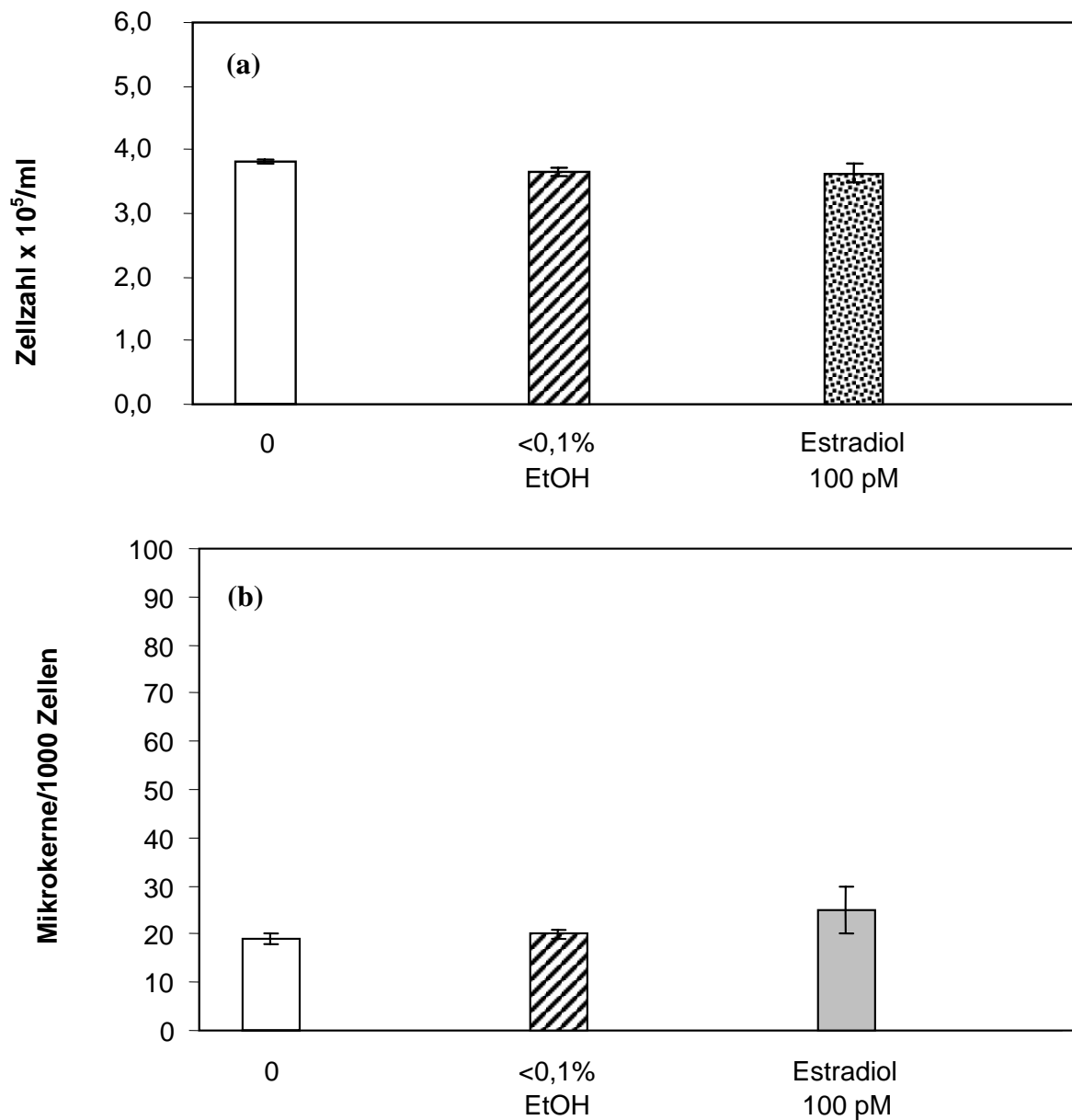


Abbildung 7: (a) Zellproliferation und (b) Mikrokern-Test in der östrogenrezeptornegativen Brustkrebszelllinie MDA-MB231 nach Behandlung mit 100 pM Östradiol. K: unbehandelte Kontrolle, LK: Lösungsmittelkontrolle (0,1% Ethanol), E: Östradiol 100 pM. Die Zellen wurden für 142 h in RPMI 1640 Medium (phenolrotfrei, kohlebehandelt) mit oder ohne Zugabe der Testsubstanzen inkubiert. Nach der Ernte wurden die Zellzahlen mittels Coulter-Counter bestimmt. Nach der Ernte fand die Auswertung der mittels Cytospin auf Objektträgern aufgetragenen und mit Acridin-Orange gefärbten Zellen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Es wurden drei Objektträger mit je 1000 Zellen ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

3.1.3 Konzentrationsabhängige Proliferationssteigerung in den MCF-7 Zellen nach Zugabe verschiedener Konzentrationen Östradiol

In diesem Experiment haben wir die östrogenrezeptorpositive Brustkrebszelllinie MCF-7 mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol (1nM, 500 pM, 200 pM, 50 pM, 25 pM, 5 pM) behandelt.

Zum Zeitpunkt 0 haben wir 24 Zellkulturflaschen mit einer Dichte von $D = 0,7 \pm 0,03 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Nach 24 h fand ein Mediumwechsel statt und die Zugabe der Testsubstanzen, gelöst in Ethanol. Die Endkonzentration Ethanol betrug höchstens 0,1%. Nach 72 h fanden ein Mediumwechsel und die erneute Zugabe der Testsubstanzen statt. Nach 142 h wurden die Zellkulturen geerntet und wie oben beschrieben aufgearbeitet und ausgewertet.

Den deutlichsten Proliferationsschub zeigte die Probe, die mit 1nM Östradiol behandelt wurde (Abb. 8a), mit einem Wachstumsfaktor von 2,73. Die anderen Proben zeigen einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Zellwachstums, je nach Konzentration des zugefügten 17- β -Östradiol (Wachstumsfaktoren siehe Tabelle 3 im Anhang). Die entsprechende Untersuchung der Mikrokerne (Abb.8b) hat ebenfalls einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Mikrokernzahlen, in den mit 17- β -Östradiol behandelten Proben gegenüber der unbehandelten Kontrolle und Lösungsmittelkontrolle ergeben. Die Mikrokernrate (Mikrokerne in 1000 östradiolstimulierten Zellen/Mikrokerne in 1000 unbehandelten Zellen) stieg um den Faktor 1,8 in der mit 1nM 17- β -Östradiol behandelten Probe und nahm stetig ab mit abnehmender Konzentration Östradiol (genaue Werte Tabelle 3 im Anhang).

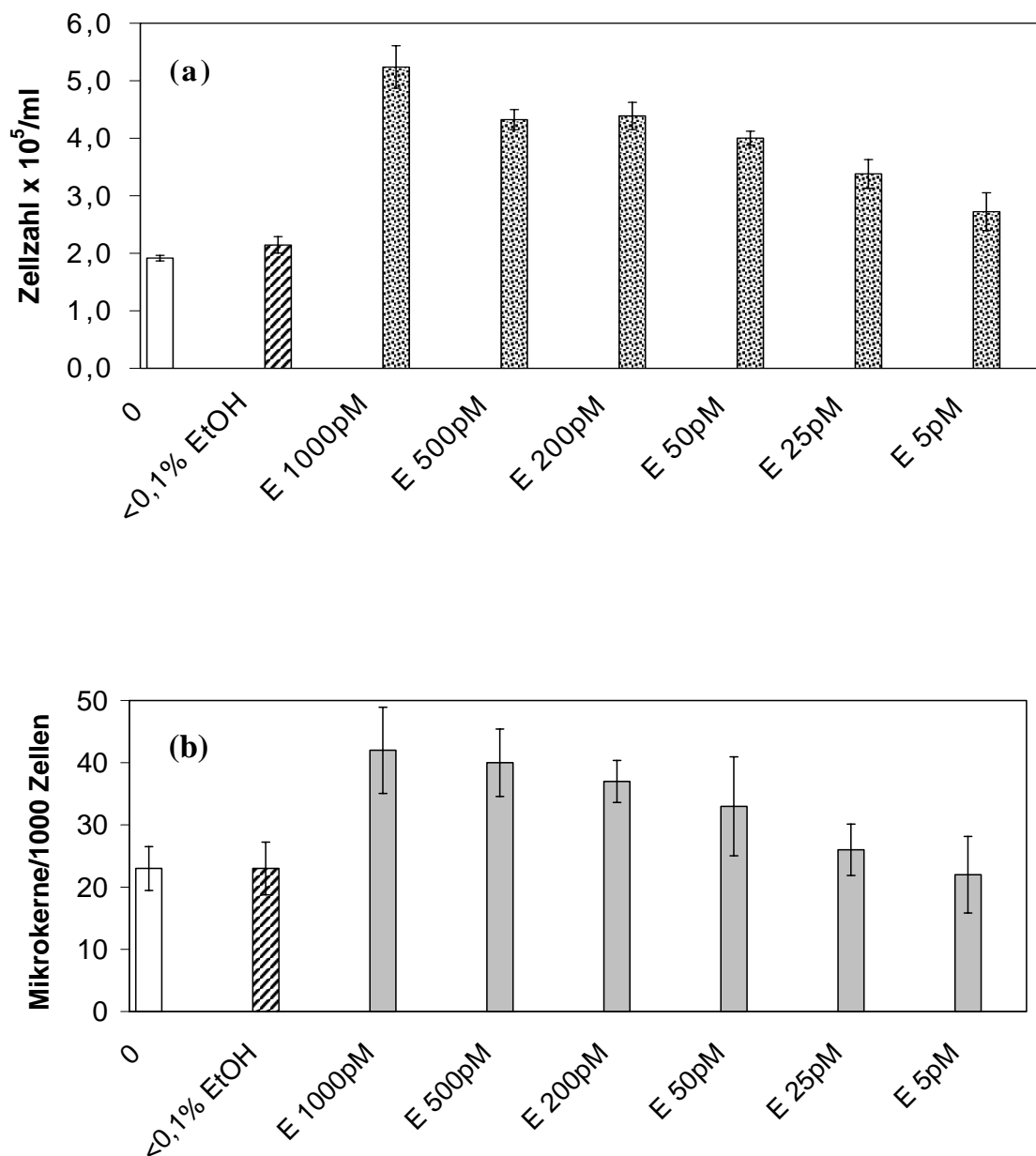


Abbildung 8. (a) Zellproliferation und (b) Mikrokern-Test in der östrogenrezeptorpositiven Brustkrebszelllinie MCF-7 nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol. K: unbehandelte Kontrolle, LK: Lösungsmittelkontrolle (0,1% Ethanol), E: Östradiol in den angegebenen Konzentrationen. Die Zellen wurden für 142 h mit den Testsubstanzen in RPMI 1640 Medium (ohne phenolrot, kohlebehandelt) inkubiert. Nach der Ernte wurden die Zellzahlen mittels Coulter-Counter bestimmt. Daraufhin fand die Auswertung der mittels Cytospin auf Objektträgern aufgetragenen und mit Acridin-Orange gefärbten Zellen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie statt. Es wurden drei Objektträger mit je 1000 Zellen auf Mikrokerne ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

3.1.4 Wiederholungsexperiment mit MCF-7 Zellen und verschiedenen Konzentrationen Östradiol

Es wurden erneut MCF-7 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen 17- β -Östradiol (200 pM, 50 pM, 25 pM, 5 pM) behandelt, wobei diesmal parallel dazu auch die östrogenrezeptornegative Zelllinie MDA-MB-231 mit Östradiol in den gleichen Konzentrationen behandelt wurde, als Kontrollsystem.

Zum Zeitpunkt 0 wurden 21 Zellkulturflaschen mit einer Dichte von $D = 0,9 \pm 0,01 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Nach 24 h fand ein Mediumwechsel statt und die Zugabe von Testsubstanzen, in Ethanol gelöst. Die Endkonzentration Ethanol betrug höchstens 0,1%. Nach 96 h fanden ein erneuter Mediumwechsel und die erneute Zugabe von Testsubstanzen statt. Die Zellkulturen wurden nach 140 h geerntet und wie bereits beschrieben aufgearbeitet und ausgewertet.

Analog zum vorherigen Experiment zeigten, die mit Östradiol behandelten MCF-7 Zellen einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Zellproliferation (siehe Abb. 9a). In der mit Mitomycin C behandelten Probe zeigte sich eine Verringerung der Zellzahl gegenüber der Kontrolle. Die Auswertung der Mikrokerne ergab eine erhöhte Mikrokernzahl in den mit 17- β -Östradiol behandelten Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und zur Lösungsmittelkontrolle (Abb. 9b). Die Positivkontrolle ergab eine ungleich höhere Anzahl an Mikrokernen, infolge der genotoxischen Wirkung von Mitomycin C, welches deswegen in Experimenten als Positivkontrolle zur Induktion von Mikrokernen verwendet wird (genaue Werte siehe Anhang Tabelle 4).

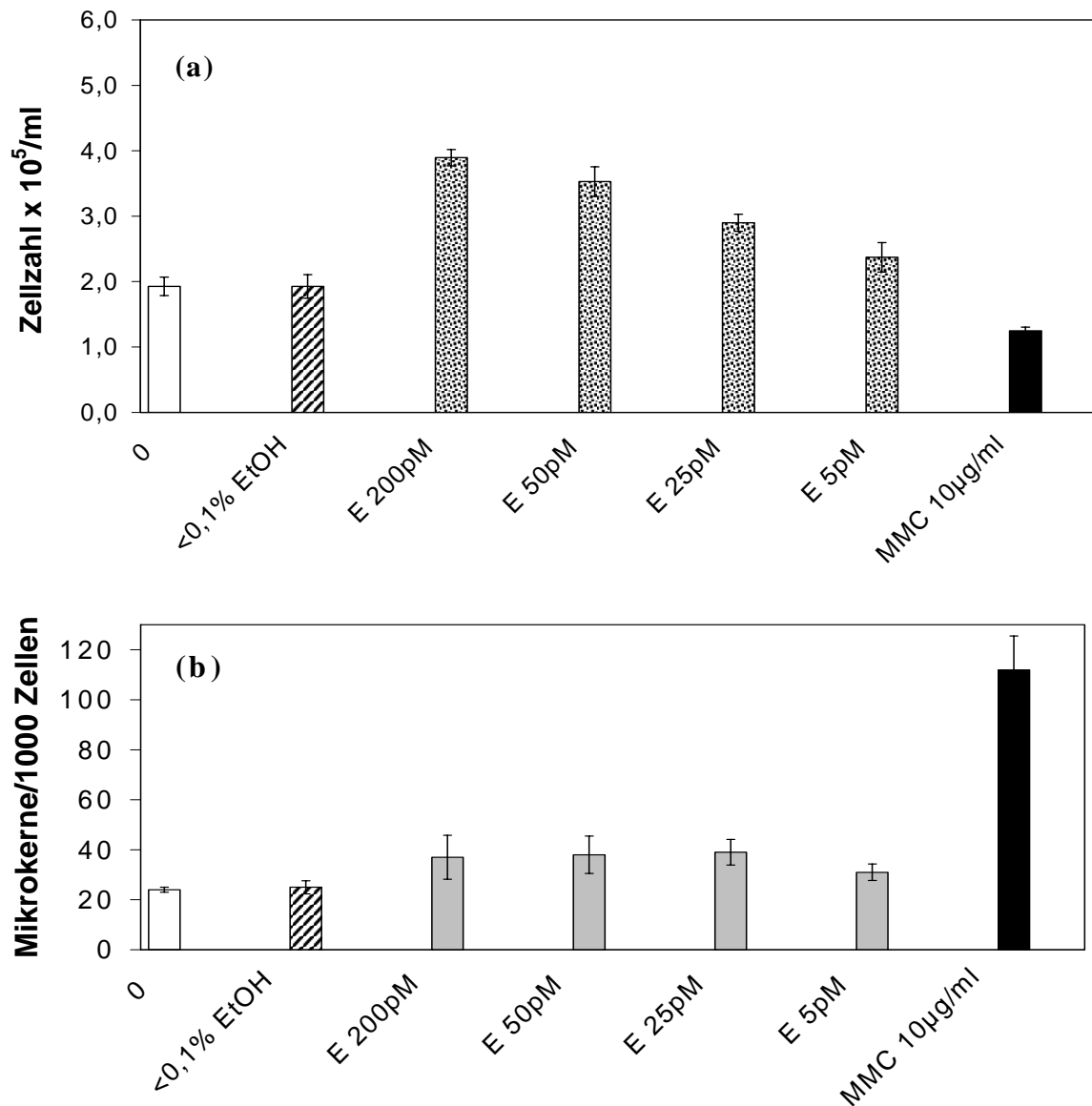


Abbildung 9: (a) Zellproliferation und (b) Mikrokern-Test in der östrogenrezeptorpositiven Brustkrebszelllinie MCF-7 nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol. K: unbehandelte Kontrolle, LK: Lösungsmittelkontrolle (0,1% Ethanol), E: Östradiol in den angegebenen Konzentrationen, MMC: Mitomycin C als Positivkontrolle. Die Zellen wurden für 140 h unter Zugabe der Testsubstanzen (in 0,1% Ethanol) in RPMI 1640 Medium (phenolrotfrei und kohlebehandelt) inkubiert. Nach der Ernte wurden die Zellzahlen mittels Coulter-Counter bestimmt. In der mit Mitomycin C behandelten Probe war die Zellzahl geringer als in der unbehandelten Kontrolle. Zur Auswertung der Mikrokerne wurden die Zellen mittels Cytospin auf Objektträgern aufgetragen und mit Acridin-Orange gefärbt und mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Es wurden drei Objektträger mit je 1000 Zellen ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Die Positivkontrolle zeigte einen steilen Zuwachs der Mikrokerne.

3.1.5 Kontrollexperiment mit MDA-MB231 Zellen unter Zugabe von Östradiol

Um zu überprüfen ob der beobachtete Effekt der gesteigerten Zellproliferation und Mikrokerninduktion durch den Östrogenrezeptor vermittelt ist wurden parallel zur MCF-7 Zellkultur, MDA-MB-231 Zellen zum Zeitpunkt 0, in 21 Zellkulturflaschen, in einer Dichte von $D = 0,7 \pm 0,02 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Nach 26 h wurde eine Mediumwechsel vorgenommen und die Zugabe der in Ethanol gelösten Testsubstanzen (17- β -Östradiol in den Konzentrationen 200 pM, 50 pM, 25 pM, 5 pM). Die Endkonzentration Ethanol betrug höchstens 0,1%. Nach 96 h fanden ein erneuter Mediumwechsel und die erneute Zugabe der Testsubstanzen statt. Nach 117 h wurden die MDA-MB231 Zellkulturen geerntet und wie oben beschrieben aufgearbeitet und ausgewertet.

Die Auswertung der Proben ergab keine gesteigerte Zellproliferation gegenüber der Kontrolle und der Lösungsmittelkontrolle, in den mit 17- β -Östradiol behandelten Zellkulturen der östrogenrezeptornegativen Zellreihe MDA-MB 231 (siehe Abb. 10a). Dies bedeutet, dass die zuvor beobachtete Stimulation des Zellwachstums von MCF-7 aufgrund eines östrogenrezeptorabhängigen Prozesses eingetreten ist. Die mit Mitomycin C behandelte Probe zeigte eine geringere Zellzahl. Wie die Abbildung 10 (b) veranschaulicht, ergab die entsprechende Untersuchung der Mikrokernzahlen in der östrogenrezeptornegativen Zelllinie MDA-MB 231, ebenfalls keine erhöhte Mikrokernrate in den mit 17- β -Östradiol behandelten Proben (genaue Werte siehe Tabelle 5 im Anhang). Nur die mit Mitomycin C behandelte Probe zeigte eine deutlich gesteigerte Mikrokernrate.

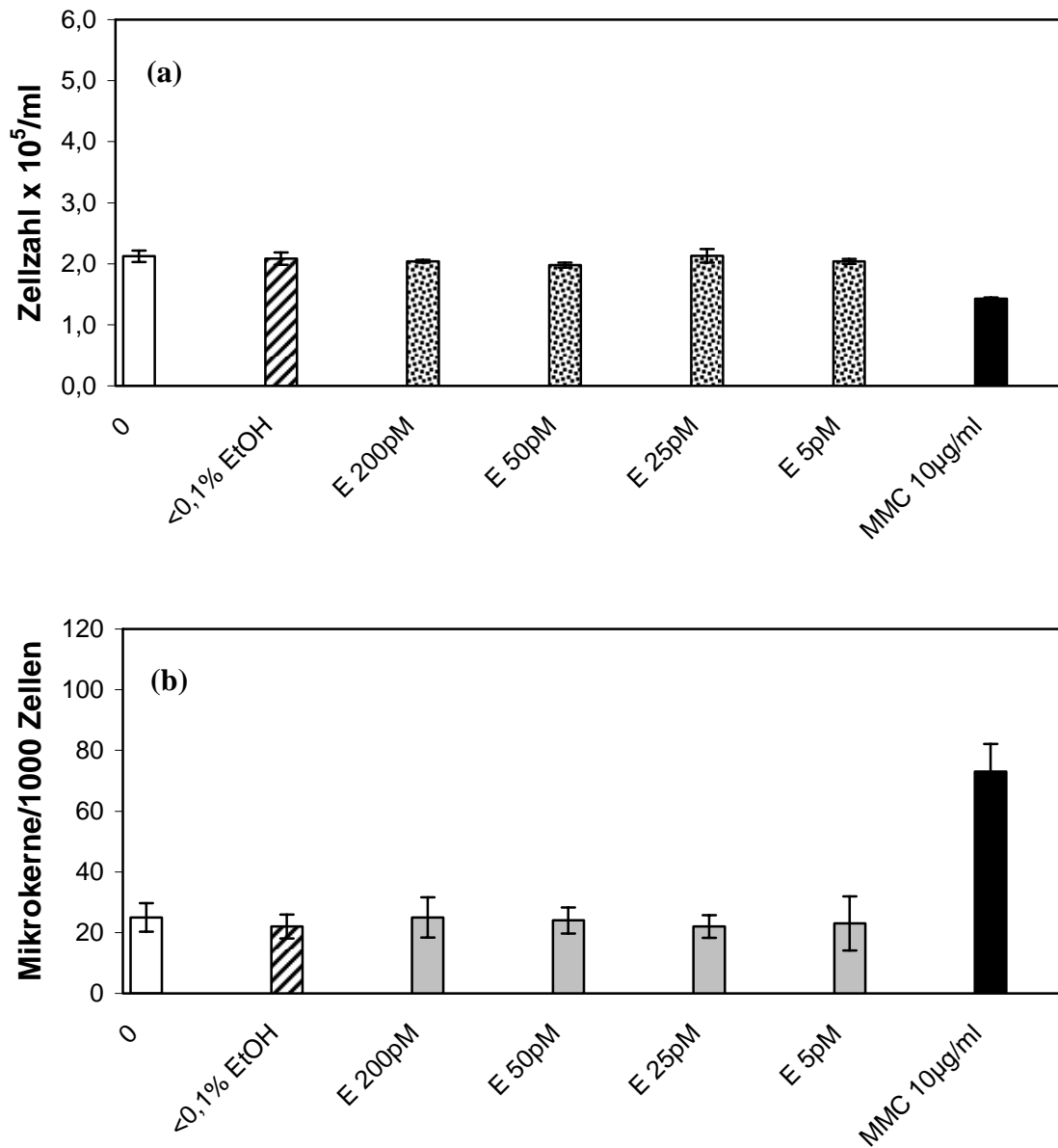


Abbildung 10: (a) Zellproliferation und (b) Mikrokerntest in der östrogenrezeptornegativen Brustkrebszelllinie MDA-MB 231 nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol. K: unbehandelte Kontrolle, LK: Lösungsmittelkontrolle (0,1% Ethanol), E: Östradiol in den angegebenen Konzentrationen, MMC: Mitomycin C als Positivkontrolle. Die Zellen wurden für 140 h unter Zugabe der Testsubstanzen in RPMI 1640 Medium (phenolrotfrei und kohlebehandelt) inkubiert. Nach der Ernte wurden die Zellzahlen mittels Coulter-Counter bestimmt. Nach der Ernte fand die Auswertung der mittels Cytospin auf Objektträgern aufgetragenen und mit Acridin-Orange gefärbten Zellen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie statt. Es wurden drei Objektträger mit je 1000 Zellen ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Die Positivkontrolle zeigt einen Zelluntergang und einen steilen Zuwachs der Mikrokernelrate.

3.2 MCF-7 und MDA-MB231 mit Östradiol und Tamoxifen

In dieser nächsten Versuchsreihe wurden die östrogenrezeptorpositive Zelllinie MCF-7 und die östrogenrezeptornegative Zelllinie MDA-MB231 mit verschiedenen Konzentrationen 17- β -Östradiol und 4-Hydroxytamoxifen behandelt. Bei 4-Hydroxytamoxifen handelt es sich um einen spezifischen Östrogenrezeptorantagonisten. Durch die Zugabe von Tamoxifen konnte festgestellt werden ob die Mikrokernbildung durch direkte Stimulation am Östrogenrezeptor induziert wird und ob dieser Effekt durch kompetitive Hemmung beeinflusst werden kann.

3.2.1 MCF-7 Zellen und der Östrogenrezeptorantagonist Tamoxifen

In diesem Experiment wurden die östrogenrezeptorpositiven Zellen MCF-7 zum Zeitpunkt 0 in 14 Zellkulturflaschen mit einer Dichte von $D = 0,8 \pm 0,008 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Nach 22 h fand ein Mediumwechsel statt und die Zugabe der Testsubstanzen, welche in Ethanol gelöst wurden. Die Endkonzentration Ethanol betrug höchstens 0,1%. Nach 96 h fand ein erneuter Mediumwechsel statt und die erneute Zugabe von Testsubstanzen. Bei den Testsubstanzen handelt es sich um 17- β -Östradiol in zwei verschiedenen Konzentrationen (1nM und 100 pM) und um 4-Hydroxytamoxifen in einer Konzentration von 5 μ M, außerdem um die kombinierte Zugabe von 1 nM Östradiol + 5 μ M Tamoxifen und 100 pM Östradiol + 5 μ M 4-Hydroxytamoxifen. Nach 138 h wurden die Zellkulturen geerntet und wie weiter oben beschrieben, aufgearbeitet und ausgewertet.

Die mit Östradiol behandelten Zellen zeigten einen deutlichen Proliferationsanstieg mit einem Wachstumsfaktor von 2,65 (1 nM) und 2,38 (100 pM). Die mit Tamoxifen behandelte Probe, sowie die mit Östradiol unter Zugabe von Tamoxifen behandelte Probe zeigten keinen Proliferationszuwachs (Abb. 11a). Die Mikrokernzahlen (Abb. 11b) waren in den nur mit Östradiol behandelten Proben gegenüber der unbehandelten Kontrolle und der Lösungsmittelkontrolle gesteigert. Eine geringere Mikrokernrate wiesen die mit Östradiol und Tamoxifen kombiniert behandelten Zellen, entsprechend dem geringeren Zellzuwachs in diesen Proben (genaue Werte Tabelle 7 im Anhang).

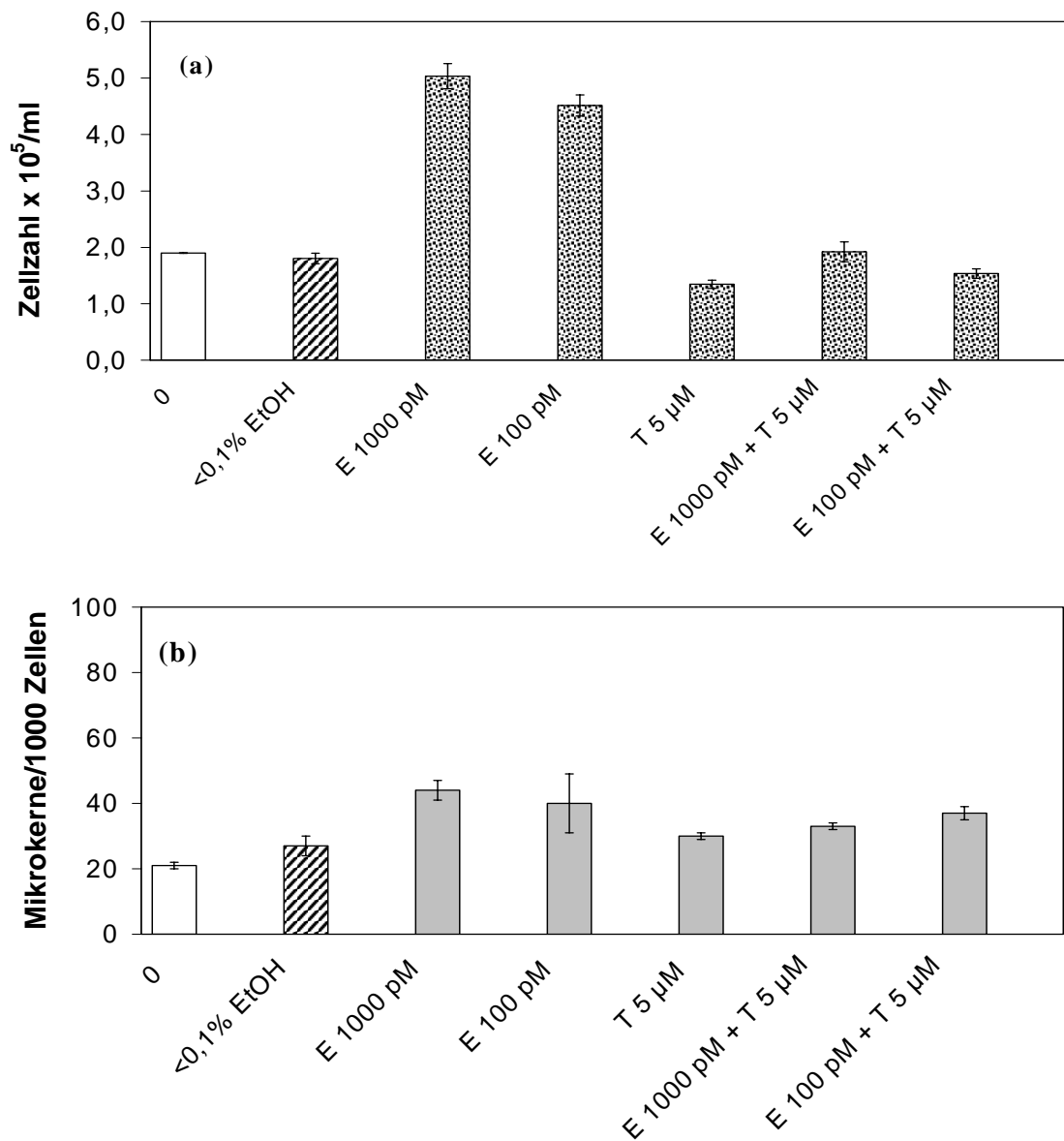


Abbildung 11: (a) Zellproliferation und (b) Mikrokerntest in der östrogenrezeptorpositiven Brustkrebszelllinie MCF-7 nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol, Hydroxytamoxifen oder einer Kombination beider Substanzen. K: unbehandelte Kontrolle, LK: Lösungsmittelkontrolle (0,1% Ethanol), E: Östradiol, T: Hydroxytamoxifen, E+T: Östradiol und Hydroxytamoxifen in Kombination (Konzentrationen wie oben angegeben). Die Zellen wurden für 138 h unter Zugabe der Testsubstanzen in RPMI 1640 Medium (phenolrotfrei und kohlebehandelt) inkubiert. Nach der Ernte wurden die Zellzahlen mittels Coulter-Counter bestimmt. Nach der Ernte fand die Auswertung der mittels Cytospin auf Objektträgern aufgetragenen und mit Acridin-Orange gefärbten Zellen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie statt. Es wurden drei Objektträger mit je 1000 Zellen ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

3.2.2 MCF-7 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol und Tamoxifen

Zum Zeitpunkt 0 wurden 26 Zellkulturflaschen mit der Brustkrebszelllinie MCF-7 in einer Dichte von $D = 0,6 \pm 0,04 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Nach 24 h fanden ein Mediumwechsel und die Zugabe der Testsubstanzen statt. Nach 96 h fanden ein erneuter Mediumwechsel und die erneute Zugabe der Testsubstanzen statt. Bei den Testsubstanzen handelt es sich um 17- β -Östradiol in zwei verschiedenen Konzentrationen (1 nM und 100 pM) und um 4-Hydroxytamoxifen in zwei verschiedenen Konzentrationen (10 nM und 1 nM) sowie um die Kombination dieser Substanzen. Nach 141 h wurden die Zellen geerntet und wie bereits oben beschrieben aufgearbeitet und ausgewertet.

Wie aus Abbildung 12 (a) ersichtlich, zeigen die MCF-7 Zellen wie in früheren Versuchen auch, den höchsten Anstieg der Zellproliferation unter Zugabe von 1 nM Östradiol, mit einem Wachstumsfaktor von 2,86. Der Wachstumsfaktor von 2,13 in der mit 100 pM Östradiol stimulierten Probe deutet erneut auf einen konzentrationsabhängigen Proliferationsanstieg nach Behandlung der Zellen mit Östradiol hin. Es gab keine Steigerung der Zellproliferation gegenüber der Kontrolle unter Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen alleine. Und im Vergleich zur rein mit Östradiol behandelten Probe, einen verringerten Proliferationsanstieg unter Zugabe von Tamoxifen. Der Wachstumsfaktor (Zellzahl behandelte Zellen [Östradiol+Tamoxifen] / unbehandelte Zellen) betrug 1,63, was darauf hinweist, dass 4-Hydroxytamoxifen über eine kompetitive Hemmung am Östrogenrezeptor die Zellproliferation in den mit Östradiol behandelten Zellen verringert. Die mit Mitomycin C behandelte Probe zeigte einen starken Rückgang der Zellzahl gegenüber der Kontrolle. Die höchste Mikrokernzahl von 54 Mikrokernen/1000 Zellen kam in der mit 1 nM Östradiol behandelten Probe vor, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ist das eine Steigerung von 20 Mikrokernen/1000 Zellen (Abb. 12b). In den mit Östradiol und Hydroxytamoxifen kombiniert behandelten Zellen zeigte sich eine Reduktion von ca. 15 Mikrokernen/1000 Zellen, im Vergleich zu den rein mit Östradiol behandelten Kulturen. Somit ließ sich durch den Einsatz von 4-Hydroxytamoxifen nicht nur die Proliferation in den MCF-7 Zellen inhibieren, sondern auch die Induktion der Mikrokerne was auf eine proliferationsassoziierte Steigerung der Mikrokerne und damit der chromosomalen Instabilität hinweist (genaue Werte siehe auch Tabelle 8 im Anhang).

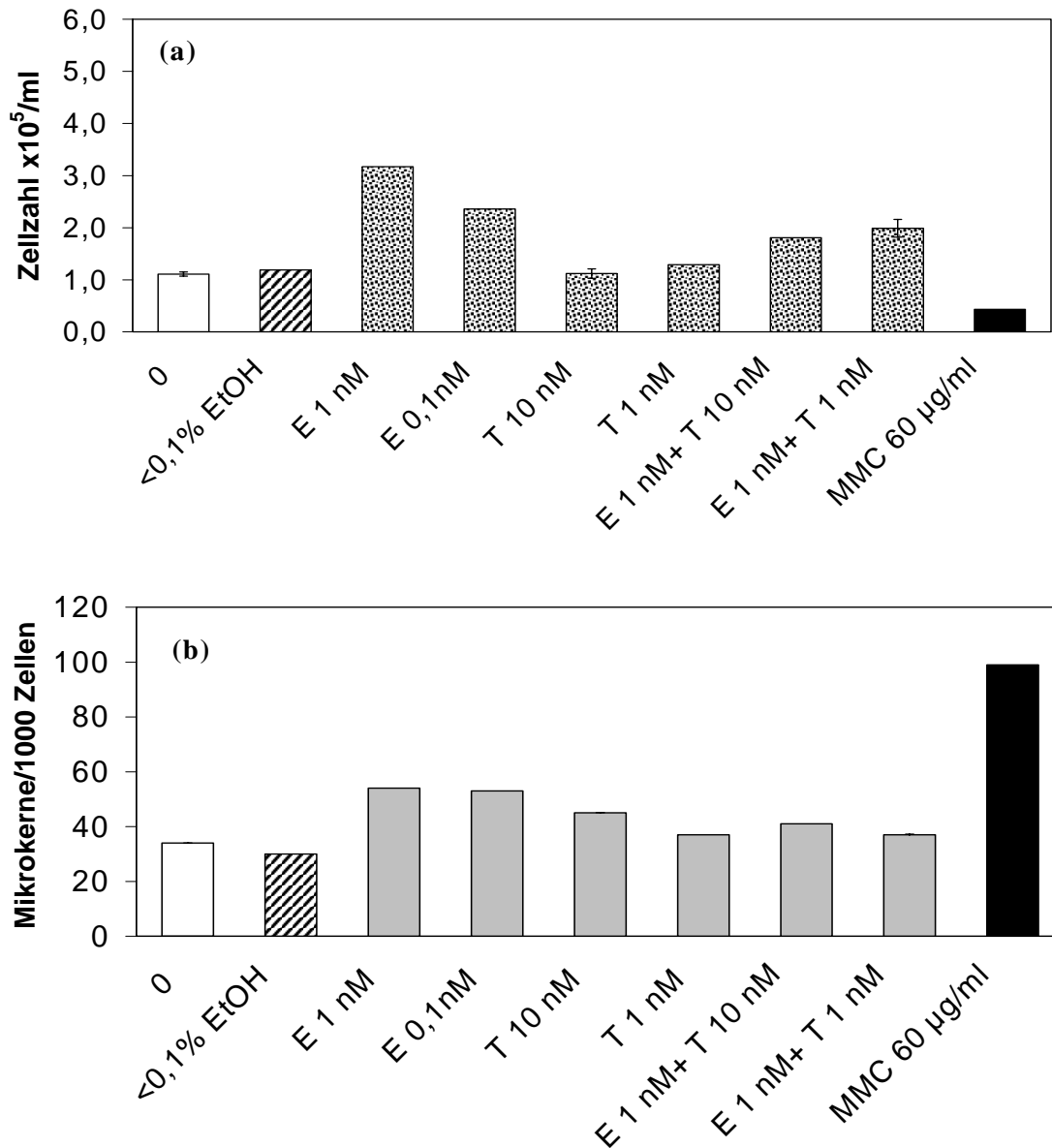


Abbildung 12: (a) Zellproliferation und (b) Mikrokern-Test in der östrogenrezeptorpositiven Brustkrebszelllinie MCF-7 nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol, Hydroxytamoxifen oder einer Kombination beider Substanzen. K: unbehandelte Kontrolle, LK: Lösungsmittelkontrolle (0,1% Ethanol), E: Östradiol, T: Hydroxytamoxifen, E+T: Östradiol und Hydroxytamoxifen in Kombination, MMC: Mitomycin C als Positivkontrolle (Konzentrationen wie oben angegeben). Die Zellen wurden für 141 h unter Zugabe der Testsubstanzen in RPMI 1640 Medium (phenolrotfrei und kohlebehandelt) inkubiert. Nach der Ernte wurden die Zellzahlen mittels Coulter-Counter bestimmt. Nach der Ernte fand die Auswertung der mittels Cytospin auf Objektträgern aufgetragenen und mit Acridin-Orange gefärbten Zellen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie statt. Es wurden drei Objektträger mit je 1000 Zellen ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Die Positivkontrolle weist einen Zellniedergang und einen Anstieg der Mikrokernrate auf.

3.2.3 Wiederholungsexperiment mit MCF-Zellen unter kombinierter Zugabe von Östradiol und Tamoxifen

Für diesen Versuch wurden 33 Zellkulturflaschen mit MCF-7 Zellen in einer Zelldichte von $D = 0,7 \pm 0,05 \times 10^5$ Zellen/ml zum Zeitpunkt 0 ausgesät. Nach 20 h wurden ein Mediumwechsel und die Zugabe der Testsubstanzen vorgenommen. Nach 96 h wurde erneut das Medium gewechselt und die Testsubstanzen dazugegeben. Bei den Testsubstanzen handelt es sich in diesem Versuch um zwei verschiedene Konzentrationen 17- β -Östradiol (1 nM und 200 pM) und drei verschiedene Konzentrationen 4-Hydroxytamoxifen (1 μ M, 100 nM und 10 nM), außerdem um die Kombination von 200 pM 17- β -Östradiol und den drei verschiedenen Konzentrationen 4-Hydroxytamoxifen. Mitomycin C in einer Konzentration von 10 μ g/ml wurde als Positivkontrolle verwendet. Nach 142 h wurden die Zellen geerntet und wie weiter oben beschrieben aufgearbeitet und ausgewertet.

Die mit 1 nM Östradiol behandelte Probe zeigte, wie in den vorausgegangenen Versuchen, den höchsten Zellzuwachs (Wachstumsfaktor von 2,94), aber auch die mit 200 pM Östradiol behandelte Probe zeigte einen deutlichen Zellzuwachs gegenüber der Kontrolle und der Lösungsmittelkontrolle (Wachstumsfaktor 2,03). Die Zugabe von Hydroxytamoxifen zu den mit Östradiol behandelten Zellen ergab geringere, bis gar nicht gesteigerte Zellzahlen (Abb. 13a). Die Mikrokernzahl war jedoch mit 26 Mikrokernen/1000 Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (24 Mikrokern/1000 Zellen) praktisch nicht erhöht. Am effektivsten wurde die proliferative Wirkung von Östradiol durch Zugabe von 1 μ M Tamoxifen gehemmt (Wachstumsfaktor 1,04). Wie in der Abbildung 13 (b) veranschaulicht, war die Mikrokernrate in der mit 1000 pM und 200 pM Östradiol behandelten Probe deutlich erhöht, gegenüber der unbehandelten Kontrollprobe (mit jeweils 45 Mikrokern/1000 Zellen). Demgegenüber zeigten die mit Östradiol und Hydroxytamoxifen kombiniert behandelten Proben analog dem geringeren Zellwachstum auch etwas geringere Mikrokernwerte, als die nur mit Östradiol behandelten Zellen (siehe auch Tabelle 9 im Anhang).

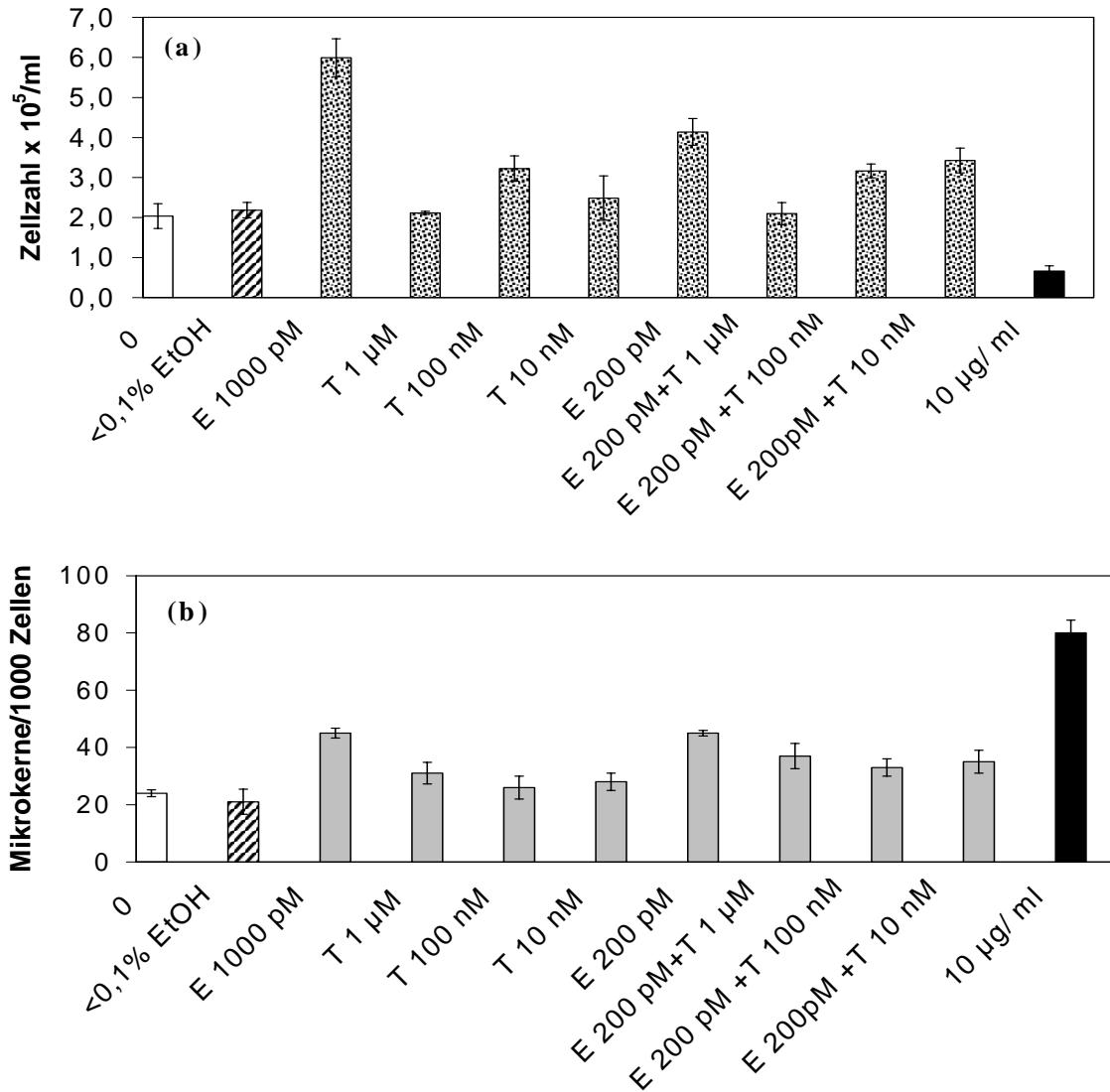


Abbildung 13: (a) Zellproliferation und (b) Mikrokern-Test in der östrogenrezeptorpositiven Brustkrebszelllinie MCF-7 nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol, Hydroxytamoxifen oder einer Kombination beider Substanzen. K: unbehandelte Kontrolle, LK: Lösungsmittelkontrolle (0,1% Ethanol), E: Östradiol, T: Hydroxytamoxifen, E+T: Östradiol und Hydroxytamoxifen in Kombination, MMC: Mitomycin C als Positivkontrolle (Konzentrationen wie oben angegeben). Die Zellen wurden für 142 h, unter Zugabe der Testsubstanzen in RPMI 1640 Medium (phenolrotfrei und kohlebehandelt) inkubiert. Nach der Ernte wurden die Zellzahlen mittels Coulter-Counter bestimmt. Zur Auswertung der Mikrokern wurden die Zellen mittels Cytospin auf Objektträgern aufgetragen und mit Acridin-Orange gefärbt, mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurden die Mikrokern gezählt. Es wurden drei Objektträger mit je 1000 Zellen ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

3.2.4 MCF-7 Zellen und der Östrogenrezeptorantagonist Tamoxifen

Zuletzt wurden noch einmal die östrogenrezeptorpositiven MCF-7 Zellen mit 17- β -Östradiol und 4-Hydroxytamoxifen in Kombination behandelt und parallel dazu die östrogenrezeptornegative Zelllinie MDA-MB231 mit diesen beiden Substanzen in verschiedenen Konzentrationen und der Kombination von beiden kultiviert.

Die östrogenrezeptorpositive Zelllinie MCF-7 wurde zum Zeitpunkt 0 in 12 Zellkulturflaschen mit einer Dichte von $D = 0,8 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Nach 21 h wurden ein Mediumwechsel und die Zugabe der Testsubstanzen vorgenommen. Nach 93 h wurden ein erneuter Mediumwechsel und die erneute Zugabe von Testsubstanz getätigt. Bei den Testsubstanzen handelte es sich in diesem Fall um 1 nM 17- β -Östradiol und vier verschiedenen Konzentrationen 4-Hydroxytamoxifen (5 nM, 0,5 nM, 0,1 nM, 10 pM). Nach 114 h wurden die Zellkulturen geerntet und wie weiter oben beschrieben aufgearbeitet und ausgewertet.

Die mit 1 nM Östradiol behandelten Zellen wiesen einen Wachstumsfaktor von 2,51 auf. Die nur mit Tamoxifen behandelten Proben zeigten keine erhöhte Zellproliferation gegenüber der Kontrolle (Abb. 14a). Die kombiniert mit Hydroxytamoxifen und Östradiol behandelten Zellen zeigten wie in den vorausgegangenen Experimenten eine verringerte Zellproliferation im Vergleich zu den rein mit Östradiol behandelten Proben, jedoch trotzdem etwas höhere Zellzahlen als die unbehandelte Kontrolle und die Lösungsmittelkontrolle (siehe auch Werte Tabelle 10). Die Mikrokernzahlen waren in den mit 1 nM Östradiol behandelten Zellen entsprechend der höchsten Zellproliferationsrate am meisten gegenüber der Kontrollprobe erhöht. Die Zugabe von Hydroxytamoxifen in den mit Östradiol behandelten Proben ergab erneut im Vergleich zur rein mit Östradiol behandelten Probe geringere Mikrokernwerte (siehe Abb. 14b).

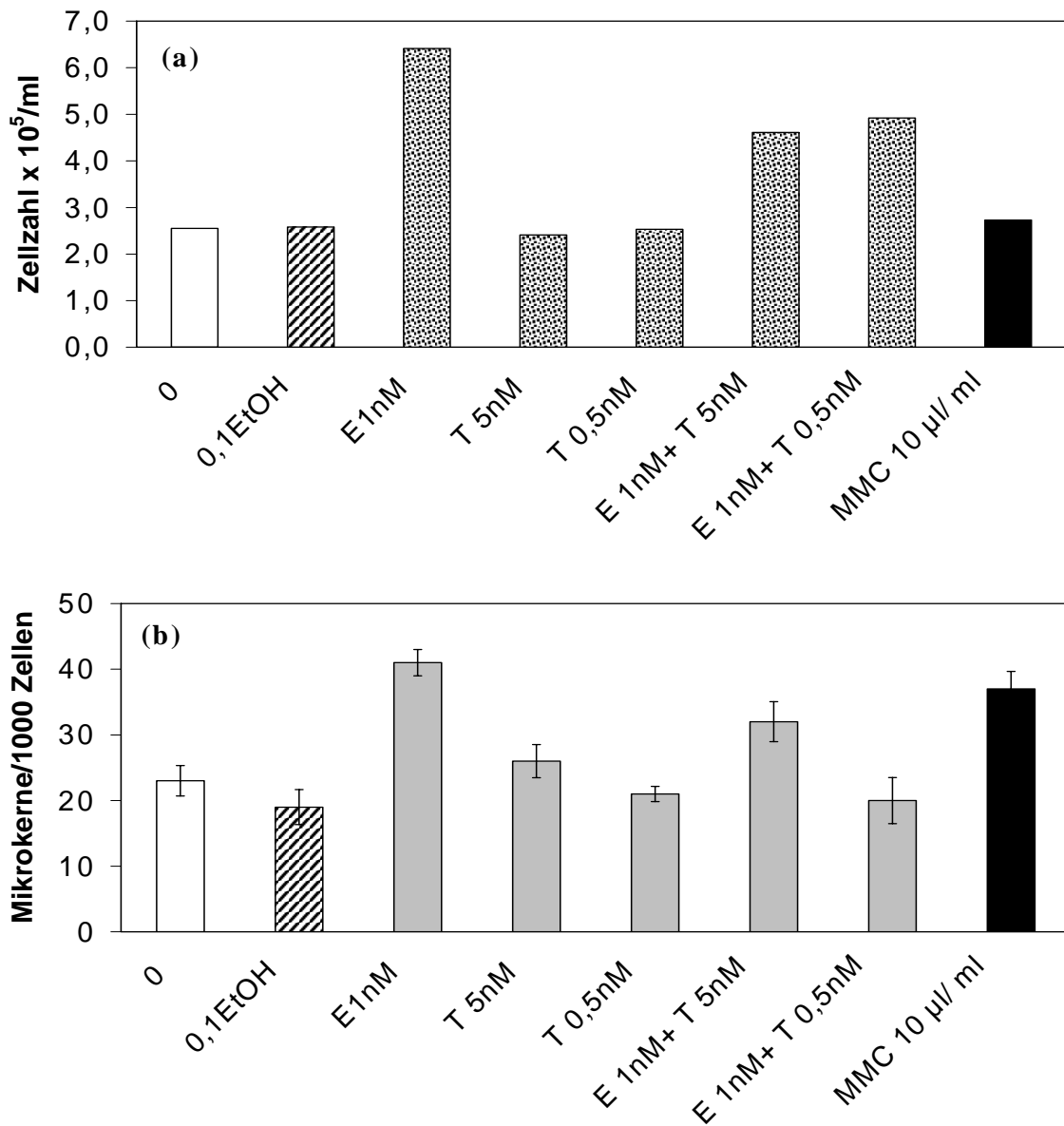


Abbildung 14: (a) Zellproliferation und (b) Mikrokernstest in der östrogenrezeptorpositiven Brustkrebszelllinie MCF-7 nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol, Hydroxytamoxifen oder einer Kombination beider Substanzen. K: unbehandelte Kontrolle, LK: Lösungsmittelkontrolle (0,1% Ethanol), E: Östradiol, T: Hydroxytamoxifen, E+T: Östradiol und Hydroxytamoxifen in Kombination, MMC: Mitomycin C als Positivkontrolle (Konzentrationen wie oben angegeben). Die Zellen wurden für 114 h, unter Zugabe der Testsubstanzen in RPMI 1640 Medium (phenolrotfrei und kohlebehandelt) inkubiert. Nach der Ernte wurden die Zellzahlen mittels Coulter-Counter bestimmt. Nach der Ernte fand die Auswertung der mittels Cytospin auf Objektträgern aufgetragenen und mit Acridin-Orange gefärbten Zellen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie statt. Es wurden drei Objektträger mit je 1000 Zellen ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

3.2.5 MDA-MB231 und der Östrogenrezeptorantagonist Tamoxifen

Parallel zum vorher beschriebenen Experiment wurde die östrogenrezeptornegative Zelllinie MDA-MB231 zum Zeitpunkt 0 in 12 Zellkulturflaschen in einer Dichte von $D = 0,8 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Nach 21 h wurden ein Mediumwechsel und die Zugabe der Testsubstanzen vorgenommen. Nach 93 h fanden ein erneuter Mediumwechsel und die erneute Zugabe der Testsubstanzen statt. Bei den Testsubstanzen handelte es sich, wie oben beschrieben, um 17- β -Östradiol in einer Konzentration von 1 nM sowie um vier verschiedene Konzentrationen 4-Hydroxytamoxifen (5 nM, 0,5 nM, 0,1 nM, 10 pM) und zusätzlich um die Kombination von Östradiol und den vier verschiedenen Konzentrationen Hydroxytamoxifen. Nach 116 h wurden die Zellen geerntet und wie beschrieben aufgearbeitet und ausgewertet.

Bei der östrogenrezeptornegativen Zelllinie ergab sich weder unter Zugabe von Östradiol noch von Hydroxytamoxifen oder unter Kombination der beiden eine im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhte Zellproliferation (siehe Abb. 15a). Die Auswertung der Mikrokerne in dieser Zelllinie diente dem Ausschluss einer direkten Genotoxizität von Östradiol in den angewendeten Konzentrationen. Weder die mit Östradiol noch die mit einer Kombination von Östradiol und Hydroxytamoxifen behandelten östrogenrezeptornegativen Zellen zeigten eine Erhöhung der Mikrokernzahlen gegenüber der unbehandelten Kontrolle und der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 15b). Lediglich die mit 5 nM Tamoxifen behandelten Zellen zeigten eine leichte Erhöhung der Mikrokernrate (Mikrokerne pro 1000 behandelten Zellen/Mikrokerne 1000 unbehandelten Zellen) von 1,3. Die Positivkontrolle (Mitomycin C) zeigt eine deutlich erhöhte Mikrokernrate, infolge Genotoxizität auch in der östrogenrezeptornegativen Zelllinie MDA-MB 231 (siehe auch Tabelle 11 im Anhang).

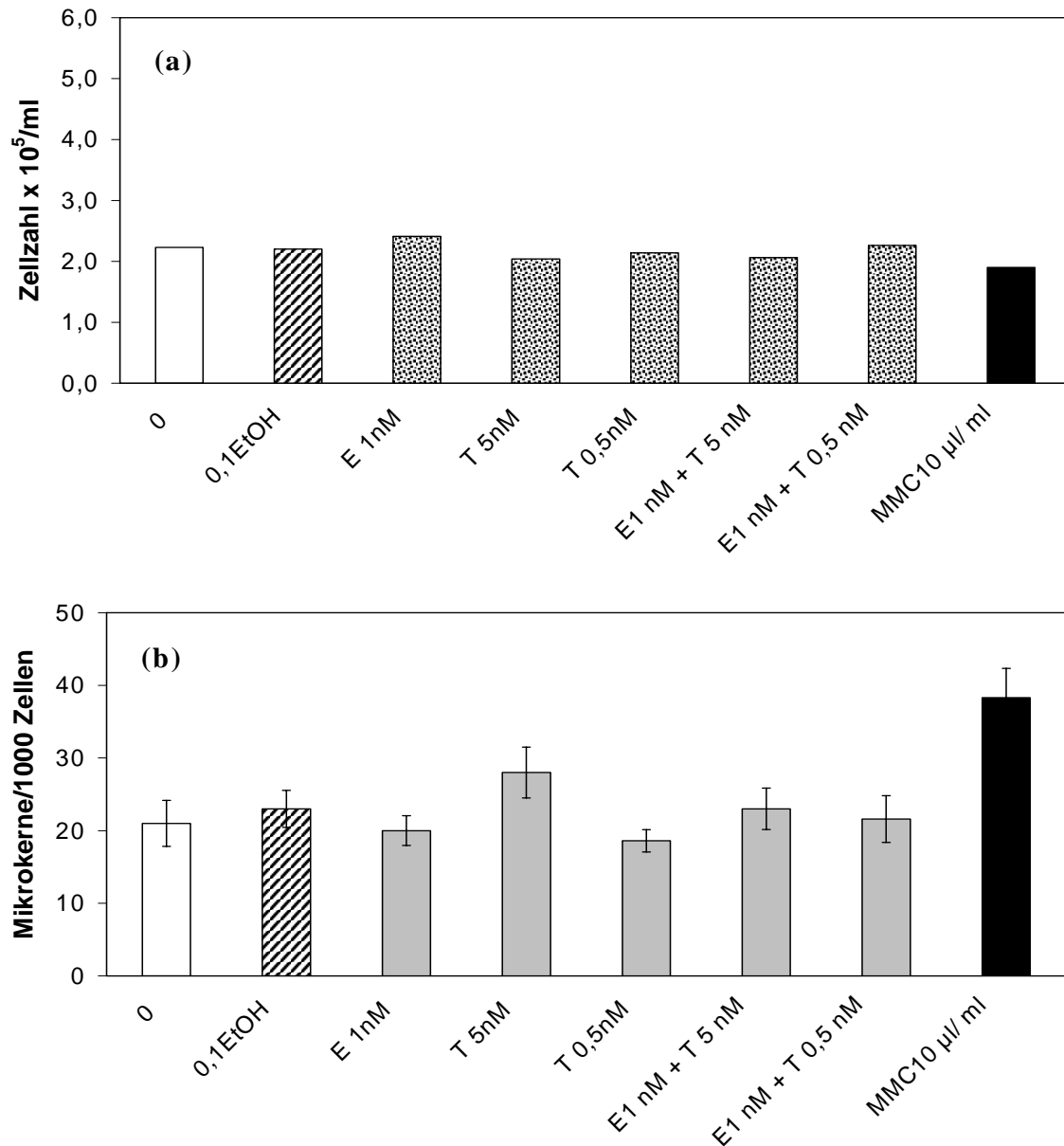


Abbildung 15: (a) Zellproliferation und (b) Mikrokerntest in der östrogenrezeptornegativen Brustkrebszelllinie MDA-MB231 nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol, Hydroxytamoxifen oder einer Kombination beider Substanzen. K: unbehandelte Kontrolle, LK: Lösungsmittelkontrolle (0,1% Ethanol), E: Östradiol, T: Hydroxytamoxifen, E+T: Östradiol und Hydroxytamoxifen in Kombination, MMC: Mitomycin C als Positivkontrolle (Konzentrationen wie oben angegeben). Die Zellen wurden für 116 h, unter Zugabe der Testsubstanzen in RPMI 1640 Medium (phenolrotfrei und kohlebehandelt) inkubiert. Nach der Ernte wurden die Zellzahlen mittels Coulter-Counter bestimmt. Nach der Ernte fand die Auswertung der mittels Cytospin auf Objektträgern aufgetragenen und mit Acridin-Orange gefärbten Zellen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie statt. Es wurden drei Objektträger mit je 1000 Zellen ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

3.3 MCF-7 mit Cytochalasin B und Östradiol behandelt

In diesen Experimenten wurden die Zellen unter Zugabe von 2,5 µg/ml Cytochalasin B inkubiert. Cytochalasin B inhibiert die Zellteilung, aber nicht die Kernteilung. Dadurch kann anhand der Auswertung der Mikrokerne in den doppelkernigen Zellen die Untersuchung auf diejenigen Mikrokerne beschränkt werden, die genau seit Zugabe der Testsubstanzen innerhalb eines Zellteilungszyklus entstanden sind.

Zum Zeitpunkt 0 wurden 12 Zellkulturflaschen mit der östrogenpositiven Brustkrebszelllinie MCF-7 ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium erneuert und sowohl Cytochalasin B in einer Konzentration von 2,5 µg/ml, als auch die Testsubstanzen dazugegeben. Nach 96 h fand eine Erneuerung des Mediums statt und eine erneute Zugabe von Cytochalasin B und der Testsubstanzen. Bei den Testsubstanzen handelte es sich in diesem Fall um Östradiol in zwei verschiedenen Konzentrationen (1 nM und 100 pM), gelöst in Ethanol. Die Endkonzentration an Ethanol überschritt nicht 0,1%. Nach 144 h wurden die Zellen geerntet und wie beschrieben aufgearbeitet und ausgewertet. Der einzige Unterschied zu den vorausgegangenen Experimenten bestand darin, dass nach Färbung mit Acridin-Orange mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie zunächst die Prozentzahl doppelkerniger Zellen bestimmt wurde und anschließend die doppelkernigen Zellen auf Mikrokerne ausgewertet wurden.

Im Vergleich zur Kontrolle zeigten die mit Östradiol behandelten Proben einen Zuwachs von ca. 10% an doppelkernigen Zellen (siehe Abb. 16a und Tabelle 6 im Anhang). Die Mikrokernrate zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine Steigerung um ca. Faktor 1,5 in den mit Östradiol behandelten Proben (Abb. 16b).

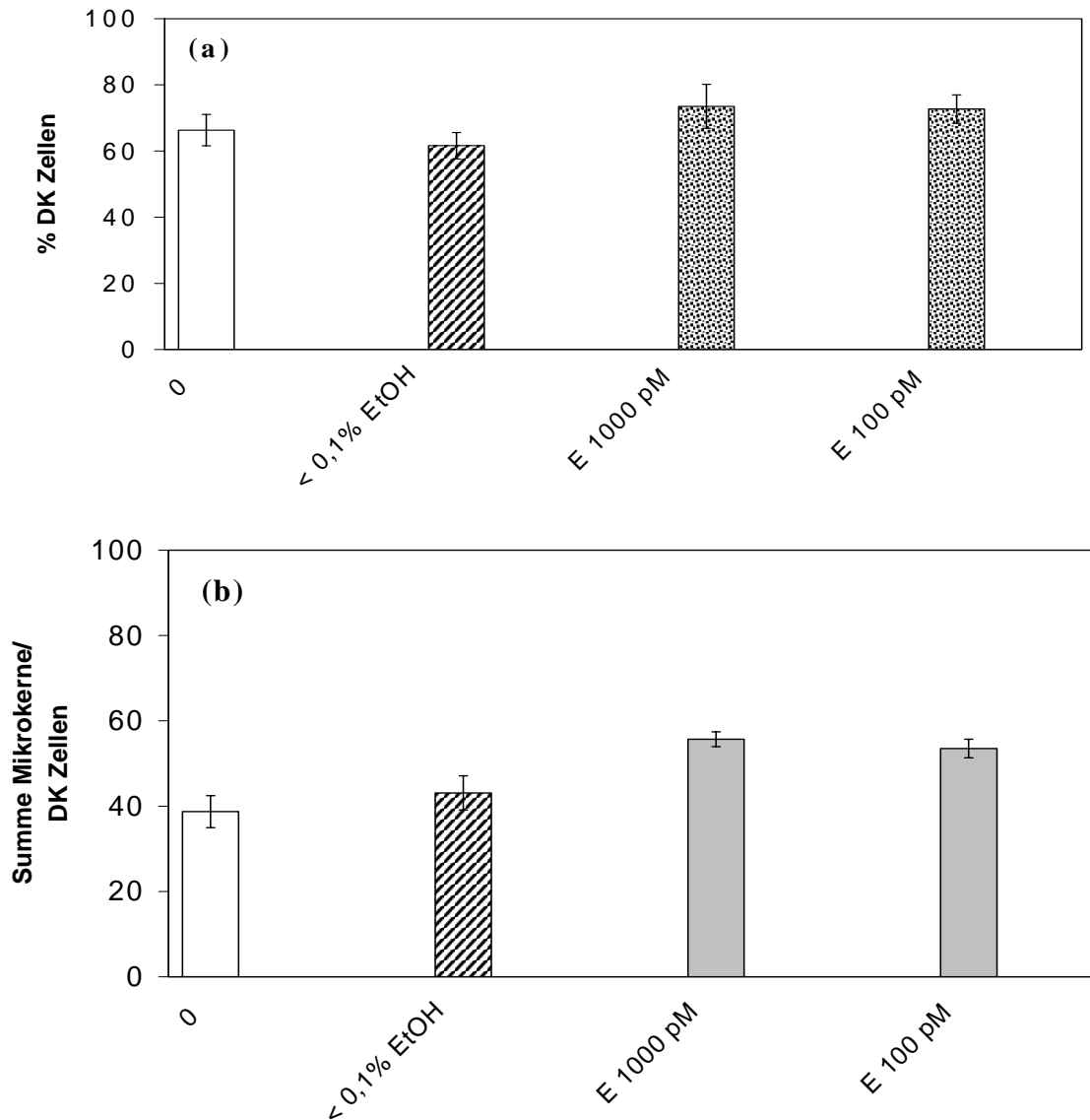


Abbildung 16 (a) Prozentualer Anteil doppelkerniger Zellen und (b) Mikrokerninduktion in den doppelkernigen Zellen der östrogenrezeptorpositiven Brustkrebszelllinie MCF-7 nach Behandlung mit Östradiol. K: unbehandelte Kontrolle, LK: Lösungsmittelkontrolle (0,1% Ethanol), E: Östradiol in den angegebenen Konzentrationen. Die Zellen wurden für 144 h unter Zugabe von Cytochalasin B (2,5 µg/ml) und der Testsubstanzen (in 0,1% Ethanol), in RPMI 1640 Medium phenolrotfrei und kohlebehandelt) inkubiert. Die Zellen wurden mittels Cytospin auf Objektträger aufgetragen und nach Färbung mit Acridine-Orange mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Es wurde die Prozentzahl der doppelkernigen Zellen bestimmt. Zur Auswertung der Mikrokernel wurden drei Objektträger mit je 1000 Zellen ausgewertet. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung.

4 Diskussion

Eine Korrelation zwischen chronischem Reiz und Jahre bis Jahrzehnte später auftretenden bösartigen Tumoren im gleichen Organ wird in Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen diskutiert. So konnte in einer Studie (Solomon und Schnitzler, 1998) gezeigt werden, dass das Risiko an einem Darmkrebs zu erkranken für Patienten, die an Colitis ulcerosa leiden, 10 Jahre nach Diagnose der chronisch entzündlichen Darmerkrankung um 0,5 % bis 1 % pro Jahr ansteigt. In einer weiteren Studie verfolgten Ekbohm et al., (1990) das Schicksal von 3117 Patienten und stellten fest, dass das Darmkrebsrisiko 35 Jahre nach Diagnose der Colitis ulcerosa erhöht war im Vergleich zur Normalbevölkerung. Es betrug 35 % für diejenigen, die eine Pancolitis (Entzündung des gesamten Dickdarmes) hatten und 40 % für diejenigen, die jünger als 15 Jahre bei Diagnose waren (Ekbohm et al., 1990). Dagegen liegt der Risikofaktor in der Normalbevölkerung bei 2-5%. Auch in anderen Organen ließ sich ein Zusammenhang zwischen einer chronischen Entzündung und einer späteren malignen Entartung nachweisen: Die Arbeitsgruppe von Ruiz untersuchte 70 Patienten, die an einem Leberkarzinom litten, und stellte fest, dass fast 90 % davon an einer viralen Hepatitis (B oder C) erkrankt waren (Ruiz et al., 1992). In einer prospektiv angelegten Studie über 24 Jahre wurde gezeigt, dass Patienten, die an chronischer Pankreatitis leiden, ein höheres Risiko haben an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (Malika et al., 2002).

Wichtige Erkenntnisse zur möglichen Pathogenese stammen zudem aus Arbeiten, die sich mit der Entstehung von Magenkarzinomen auf dem Boden chronischer Magenentzündungen beschäftigen. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ist ein Bakterium, welches den Magen von mehr als 50 % der Gesamtbevölkerung besiedelt. Infektionen des Menschen mit *H. pylori* können zu asymptomatischen, leichten oder chronischen Magenentzündungen führen, aber auch zu Ulcerationen der Magenwand und in einigen Fällen zu Adenocarcinomen und MALT-Lymphomen (Buret et al., 2005). Die genauen Mechanismen, die nach einer *H. pylori* Infektion dazu beitragen, dass sich das Risiko an einem Magenkarzinom zu erkranken erhöht, sind nicht bekannt. Jedoch ist eine entzündliche Reaktion allen *H. pylori*-assoziierten Magen-Darm-Erkrankungen gemeinsam. Es scheint so zu sein, dass eher die Antwort des Wirtes auf die entzündlichen Prozesse die unterschiedlichen Entwicklungen der *H. pylori* Infektionen bestimmt und weniger das Bakterium an sich (Wu et al.,

2005). Inzwischen ist bekannt, dass Patienten, die mit CagA-positiven *H. pylori* Bakterienstämmen infiziert sind, ein höheres Risiko tragen an einem Magenkarzinom zu erkranken, als die mit CagA-negativen *H. pylori* Infizierten (Parsonnet et al., 1997). CagA wurde als ein Protein des *H. pylori* identifiziert, welches mittels eines Typ IV Sekretionssystems in die menschlichen Zellen des Magens, verlagert wird (Odenbreit et al., 2000). Vergleichbar mit der Wirkung anderer rezeptorvermittelter Wachstumsfaktoren (Segal et al., 1999) induziert es dort nach Phosphorylierung Veränderungen im Wachstumsverhalten der Wirtszellen. Peek et al., (1999) haben beschrieben, dass CagA positive *H. pylori* Bakterien die Zellzykluskinetik kultivierter Magenepithelzellen beeinflussen, indem sie die Progression der Zellen von der G1-Phase in die G2/M-Phase signifikant beschleunigen (Peek et al., 1999).

In verschiedenen Studien wurde beschrieben, dass eine Infektion mit *H. pylori* die Proliferation der Epithelzellen des Magens steigert, was mit dem erhöhten Risiko an Magenkrebs zu erkranken assoziiert sein könnte (Leite et al., 2005; Hua-Xiang et al., 2001). Nardone et al., (1999) haben festgestellt, dass sich die Magenschleimhaut aller von ihnen untersuchten Patienten, die an chronischer Gastritis litten, in einem hyperproliferativen Zustand befand. Dies war assoziiert zur Entzündung der Schleimhaut und betraf auch Patienten, die nicht mit *H. pylori* infiziert waren. Sie führten bei 45 von 53 *H. pylori* positiven Patienten erfolgreich eine antibiotische Eradikation durch. Die Zellproliferation nahm parallel zur abnehmenden Entzündungsaktivität ab. Und auch die von ihnen untersuchten Marker für genomische Instabilität normalisierten sich (Nardone et al., 1999).

Die Korrelation zwischen einer *H. pylori* positiven (oder negativen) chronischen Gastritis und einer gesteigerten Zellproliferation wurde bereits in früheren Studien hervorgehoben, vor dem Hintergrund dessen, dass ein erhöhter Zellumsatz förderlich ist, für das Auftreten genetischer Mutationen (Panella et al., 1996; Lynch et al., 1995; Lynch et al., 1999; Brenes et al., 1993). Schmausser et al., (2000) haben die direkte Induktion eines DNA-Schadens durch *H. pylori* mit Hilfe des in vitro Mikrokerntests untersucht. Sie stellten nach fünftägiger Inkubation mit bakterieller Lösung fest, dass eine konzentrationsabhängige Induktion von Mikrokernen stattgefunden hatte (Schmausser et al., 2000).

Den oben genannten Krankheitsbildern liegen heterogene Ätiologien zugrunde. Trotzdem verbindet alle, eine Erhöhung des Risikos an einem Tumor zu erkranken. Immunologische, ernährungsbedingte oder psychosomatische Faktoren werden bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen diskutiert, Viren verursachen die Hepatitis B und C, Bakterien die *H. pylori* Infektion. Als ein gemeinsamer Mechanismus, der die Entstehung von Krebs einleiten kann, wird eine durch diverse Stimuli gesteigerte Zellproliferation diskutiert (Cohen et al., 1991; Preston-Martin et al., 1990). Diese Vermutung basiert auf die Beobachtung, dass eine gesteigerte Zellproliferation ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Mutationen in sich birgt (Ames et al., 1993).

Auf einem anderen Stimulus als dem einer chronischen Entzündung aber mit ähnlichen Folgen für die Zellproliferation, basiert die Korrelation zwischen erhöhten Östrogen- bzw. Sexualhormonkonzentrationen im Blut und dem erhöhten Risiko an Brustkrebs oder anderen Karzinomen in hormonsensitive Organe zu erkranken. Wahrscheinlich steigern hohe Sexualhormonkonzentrationen das Brustkrebsrisiko, indem sie die mitotische Aktivität in den Epithelzellen der Brust erhöhen (Key, 1999). Eine Reanalyse aller bis 2002 vorliegenden prospektiven Studien zu dieser Fragestellung hat ergeben, dass nach Eintritt in die Menopause, relativ hohe Konzentrationen von Sexualhormonen im Serum mit einem doppelt so hohen Risiko an Brustkrebs zu erkranken einhergehen, als relativ niedrige (Key et al., 2002). Für Frauen im gebärfähigen Alter sind solche Studien viel schwieriger durchzuführen, da die hormonelle Exposition und das Zusammenspiel zwischen den einzelnen Sexualhormonen sehr komplex sind (Key, 1999). Begrenzungen solcher Studien treten unter anderem aufgrund der Tatsache auf, dass die Östradiolkonzentration im Blutserum einer Frau großen Schwankungen unterliegt und es daher sehr schwierig ist, Aussagen über die durchschnittliche Östradiolkonzentration, sogar für ein und dieselbe Person zu machen. Für Frauen vor der Menopause waren Vergleiche zweier Blutproben, die im Abstand von einem Jahr, ein und derselben Frau abgenommen wurden, nur schwach miteinander korreliert, während sie bei postmenopausalen Frauen ungefähr übereinstimmten (Key, 1999). Die tägliche Sekretionsrate an Östrogenen beträgt bei einer Frau vor der Menopause, je nach Zyklusphase, 25-100 µg (90 – 350 nmol), während Frauen in der Postmenopause 5-10 µg Östrogene/Tag (17-35 nmol/Tag) produzieren (Forth et al., 1993).

Die vielfältigen hormonellen Einflüsse im menschlichen Organismus und die wechselseitige Beeinflussung verschiedener Faktoren erschweren daher eine genaue Untersuchung in einem solch komplexen System. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit ein, im Vergleich zum gesamten Körper, vereinfachtes System gewählt, um sich dieser Fragestellung zu nähern. Anhand von Zellkulturen wurde der Zusammenhang zwischen einer hormonell induzierten Zellproliferationssteigerung und einer erhöhten genomischen Instabilität untersucht. Als Modellsystem diente die gut charakterisierte, östrogenrezeptorpositive Brustkrebszelllinie MCF-7. Für die notwendigen Kontrolluntersuchungen wurde die östrogenrezeptornegative Brustkrebszelllinie MDA-MB231 verwendet. Auf der Zellproliferation der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 basiert der „E-Screen“. Dies ist ein häufig benutzter Test, mit dessen Hilfe man die Fähigkeit von Substanzen überprüfen kann, eine hormonelle Antwort zu induzieren. Eine dosisabhängige Zellproliferationssteigerung in den behandelten MCF-7 Zellkulturen wird als Nachweis für die östrogene Wirkung der Substanzen angesehen (Soto et al., 1995; Payne et al., 2000). Zusätzlich zur Zellproliferation wurde die Induktion von chromosomalen Schäden untersucht. Als Maß für die chromosomale Schädigung wurde der Mikrokerntest angewendet. Dabei wird der Einschluss chromosomaler Fragmente oder ganzer Chromosomen in eine eigene, vom Zellkern getrennte Membran, als Endpunkt einer mikroskopischen Quantifizierung benutzt. Mithilfe des Mikrokerntestes können sowohl aneugen, als auch klastogen wirkende Stoffe detektiert und differenziert werden, da sowohl fehlverteilte ganze Chromosomen, als auch Chromosomenfragmente nach der Zellteilung Mikrokerne bilden (Stopper und Müller, 1997). Die Bildung von Mikrokernen wird als genotoxischer Endpunkt *in vivo* (Sato und Tomita, 2000) und *in vitro* (Stopper und Müller, 1997) angesehen. Da Mikrokerne in den Tochterzellen der behandelten Zellen untersucht werden, stellen sich somit tatsächlich vererbte genetische Schäden dar. In früheren Arbeiten wurde der Mikrokerntest bereits genutzt um die Genotoxizität verschiedener pflanzlicher Hormone zu untersuchen (Boos und Stopper, 2000). Es wurden damals allerdings hohe Hormonkonzentrationen angewandt.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine niedrige Konzentration 17- β -Östradiol (100 pM) appliziert. Dies hatte eine hormonell induzierte Steigerung der Zellproliferation zur Folge. Der Wachstumsfaktor (Proliferation Östradiol stimulierte/unbehandelte Zellen) betrug 2,95. Der daraufhin durchgeführte Mikrokerntest ergab eine um Faktor 1,68 erhöh-

te Mikrokernzahl in der mit 17- β -Östradiol behandelten Probe gegenüber der unbehandelten Kontrolle und der Lösungsmittelkontrolle. Bei der hier angewandten Konzentration 17- β -Östradiols handelt es sich um eine nicht direkt chromosomenschädigend wirkende Konzentration (Fischer et al., 2001).

Ursprünglich wurden Östrogene als epigenetisch und nicht direkt genotoxisch wirkende Substanzen angesehen. Man nahm an, dass dieser Effekt auf den hormonvermittelten Einflüssen auf die Zellproliferation beruhte (Key, 1999; Pike et al., 1993). Später jedoch wurden genotoxische Effekte beschrieben. Diese können entweder durch direkte kovalente Bindung von Östrogenmetabolite an die DNA entstehen oder durch indirekt genotoxisch wirkende Mechanismen (Blackburn et al., 1974; Roy und Liehr, 1999). Es wurde jedoch mehrfach beschrieben, dass Östradiol erst im mikromolaren Bereich chromosomale Schäden induziert (Bandhun und Obe, 1985; Schuler et al., 1998; Wheeler et al., 1986). Ahmad et al., (2000) haben an Kulturen menschlicher Lymphozyten nachgewiesen, dass 17- β -Östradiol in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ keine chromosomalen Schäden hervorrief. Sie beschrieben jedoch, dass 17- β -Östradiol in Konzentrationen von 25-50 $\mu\text{g/ml}$ appliziert, durchaus chromosomenschädigende Effekte hatte (Ahmad et al., 2000). Kong et al., (2000) testeten die mutagene Wirkung von Östradiol in physiologischen und pharmakologischen Konzentrationen in der V79 Hamster-Zelllinie und stellten fest, dass Östradiol auch in solch niedrigen Konzentrationen direkt mutagen wirken kann (Kong et al., 2000). Allerdings handelte es sich bei den beschriebenen Effekten um Genmutationen und nicht um chromosomale Schäden. Da im Mikrokernstest jedoch nur fehlverteilte Chromosomen oder chromosomale Fragmente detektiert werden können, kann der von Kong et al., (2000) festgestellte Effekt nicht für die, in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen verantwortlich sein. Zur Kontrolle wurde die östrogenrezeptornegative Zelllinie MDA-MB231 mit der gleichen Konzentration 17- β -Östradiol (100 pM) behandelt. Dies hatte weder eine Steigerung der Zellproliferation noch eine Steigerung der Mikrokernrate zur Folge, was die Annahme bekräftigte, dass die in der vorliegenden Arbeit applizierte Konzentration Östradiol nicht direkt genotoxisch war.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde geprüft, ob es sich bei der Steigerung der Zellproliferation infolge hormoneller Stimulation und der korrelierten Mikrokernerhöhung in der östrogenrezeptorpositiven Brustkrebszelllinie MCF-7 um einen konzentrationsabhängigen

Effekt handelt. Dazu wurden MCF-7 Zellen mit sechs verschiedenen Konzentrationen Östradiol (5 pM, 25 pM, 50 pM, 200 pM, 500 pM und 1000 pM) behandelt. Eine Konzentrationsabhängigkeit der Zellproliferation und der Mikrokerninduktion konnte zwischen 5 und 1000 pM Östradiol beobachtet werden. Dies demonstrierte die fein aufeinander abgestimmte, umgekehrte Korrelation zwischen stufenweise Zunahme der Zellproliferation und Abnahme der chromosomalen Stabilität in den untersuchten MCF-7 Zellen. Um den genotoxischen Effekt von Östradiol auszuschließen, wurden daraufhin in parallelen Versuchsanordnungen MCF-7 und MDA-MB231 Zellen mit identischen Konzentrationen Östradiol (5 pM bis 200 pM) behandelt. Die östrogenrezeptorpositive Zelllinie MCF-7 zeigte nach Behandlung mit 17- β -Östradiol in Konzentrationen zwischen 5 pM und 200 pM einen dosisabhängigen Anstieg der Zellproliferation mit Wachstumsfaktoren von 1,23 (5 pM) bis 2,02 (200 pM), relativ zur Kontrolle. Die Mikrokernzahlen stiegen im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 1,29 (5 pM) bis 1,54 (200 pM) an. Umso grösser der Proliferationszuwachs bei den MCF-7 Zellen war, desto höher war auch die festgestellte Mikrokernrate. Die östrogenrezeptornegative Zelllinie MDA-MB231 wies nach Behandlung mit 17- β -Östradiol weder einen Anstieg der Zellproliferation noch eine Erhöhung der Mikrokernzahlen auf. Die Zellproliferationssteigerung und Mikrokerninduktion in der östrogenrezeptorpositiven, nicht aber in der östrogenrezeptornegativen Brustkrebszelllinie, deutete darauf hin, dass für den beobachteten Effekt der Östrogenrezeptor eine wichtige Rolle spielte.

Um beurteilen zu können, ob die Steigerung der Mikrokernrate Östrogenrezeptor vermittelt ist, haben wir die MCF-7 Zellen neben 17- β -Östradiol mit 4-Hydroxytamoxifen in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Bei 4-Hydroxytamoxifen handelt es sich um einen spezifischen Östrogenrezeptor-Antagonisten. Durch die Bindung am Östrogenrezeptor kommt es zu einer kompetitiven Hemmung der hormonellen Wirkung. Die zusätzliche Gabe von 4-Hydroxytamoxifen (5 μ M) führte zu einer deutlichen Reduktion der Proliferationssteigerung bei den MCF-7 Zellen von einem Wachstumsfaktor (Proliferation Östradiol stimulierte Zellen/unbehandelte Zellen) von 2,65 in der allein mit 17- β -Östradiol (1000 pM) behandelten Probe zu einem Wachstumsfaktor von 1,01 in der kombiniert mit 17- β -Östradiol (1000 pM) und 4-Hydroxytamoxifen (5 μ M) behandelten Probe. Auch die Mikrokernrate wies reduzierte Werte auf. Die nur mit 4-Hydroxytamoxifen behandelten Zellen zeigten keinen Effekt. Des Weiteren wurden in parallelen Versuchsanordnungen die östro-

genrezeptorpositive MCF-7 und die östrogenrezeptornegative MDA-MB231 Zelllinien mit 17- β -Östradiol (1 nM) und 4-Hydroxytamoxifen (5 nM, 0,5 nM, 0,1 nM und 0,01 nM) kombiniert behandelt. Die MCF-7 Zellen zeigten erneut den oben beschriebenen Effekt der kompetitiven Hemmung am Östrogenrezeptor. Die Kontrollversuche mit der östrogenrezeptornegativen Zelllinie MDA-MB231 ergaben keine vermehrte Zellproliferation oder Mikrokerninduktion, was einen weiteren Hinweis für die Schlüsselrolle des Östrogenrezeptors und für einen anderen, als den bisher beschriebenen Mechanismus der Mikrokerninduktion durch Östrogene in hormonsensitive Gewebe, erbrachte. Dagegen induzierte die klastogen wirkende Substanz Mitomycin C wie erwartet auch in den MDA-MB231 Zellen Mikrokerne. Die vorliegenden Daten unterstützen die Hypothese, dass nicht Östradiol selbst, sondern vielmehr die durch Östradiol vermittelte rezeptorabhängige Proliferationssteigerung die Bildung der Mikrokerne induzierte.

Die oben beschriebene Beobachtung wurde durch eine weitere Studie untermauert, in der die Ovarialtumorzelllinien BG-1 (östrogenrezeptorpositiv) und UCI (östrogenrezeptornegativ) nach Stimulation mit 17- β -Östradiol untersucht wurden. Dort wurde festgestellt, dass es in der östrogenrezeptorpositiven BG-1 Zelllinie, nicht aber in der östrogenrezeptornegativen UCI Zelllinie, zu einem Proliferationsschub und assoziiert dazu, zu einer Erhöhung der genomischen Instabilität kam (Stopper et al., 2003). In einer anderen Studie untersuchten Davis et al., (2002) die Induktion von Mikrokernen in MCF-7 Zellen nach gleichzeitiger Anwendung des Karzinogens Benzo[a]pyrene (B[a]P). Während einer Kombinationsbehandlung mit 17- β -Östradiol kam es zu einer fünffach erhöhten Mikrokernrate, während die nur mit B[a]P behandelten Zellen eine dreifache Steigerung der Mikrokernrate aufwiesen. Sie beobachteten weiterhin, dass der Rückgang der Zellproliferation nach B[a]P Behandlung durch Östrogene in die gegenteilige Richtung beeinflusst wurde (Davis et al., 2002). Der von Davis et al., (2002) beschriebene Effekt könnte eventuell auch auf einer gesteigerten Zellteilungsrate in MCF-7 Zellen nach Vorbehandlung mit 17- β -Östradiol beruhen. DuMond und Roy, (2001) haben beschrieben, dass eine verkürzte Zellzykluszeit (\approx 16 h) für Leydig-Zellen, welche in Medium unter Zugabe von Serum inkubiert wurden, zu einer Reduktion der Reparaturkapazität dieser Zellen um 40% führte, im Vergleich zu Leydig-Zellen welche eine längere Zellzykluszeit (\approx 25 h) infolge Inkubation in serumfreiem Medium hatten. Außerdem haben sie festgestellt, dass die Behandlung der Leydig-Zellen mit Diethylstilbestrol (DES), einer Substanz mit hormoneller

Aktivität, zu einer signifikanten Abnahme der Reparaturkapazität in diesen Zellen führte. Es handelte sich dabei um einen dosisabhängigen Effekt. DES ist dafür bekannt, dass es zu Störungen des Spindelapparates führt und Aneuploidie verursacht (Wheeler et al., 1986). Ob DES direkt oder über Reduktion der Zellzykluszeit die Reparaturkapazität in Leydig-Zellen reduziert, ist nicht klar (DuMond und Roy, 2001 b). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass DES das Wachstum der Leydig-Zellen stimuliert und die Verdopplungszeit der Zellen reduziert (DuMond und Roy, 2001 a).

Eine beschleunigte Zellproliferation infolge hormoneller Stimulation hat eine erhöhte Anzahl von Mitosen zur Folge. Da der Zeitfaktor bei der Reparatur von DNA-Schäden eine essenzielle Rolle spielt, könnte dies zu Ungenauigkeiten bei der Reparatur von aufgetretenen DNA-Schäden führen und folglich zu einer Erhöhung der Mikrokernzahlen als Ausdruck der gesteigerten genomischen Instabilität. Diese Annahmen werden von weiteren Experimenten unterstützt, welche von Stopper et al., (2003) an den vorhin erwähnten Ovarialtumorzelllinien BG-1 und UCI durchgeführt wurden. Dabei wurden mit Östradiol behandelte und unbehandelte BG-1 Zellen, im ersten Teil eines Experimentes zum gleichen Zeitpunkt geerntet, was eine erhöhte Rate an Mikrokernen und ein gesteigertes Zellwachstum in den mit Östradiol behandelten Zellen zur Folge hatte. In einem zweiten Schritt erfolgte die Ernte zu verschiedenen Zeitpunkten, was dazu führte, dass zwar die Zellzahlen identisch, die Mikrokernzahlen in den mit Östradiol behandelten Proben jedoch immer noch erhöht waren. Dies weist auf eine Erhöhung des genomischen Schadens hin, indem die Zellen mittels hormoneller Stimulation durch den Zellzyklus gedrängt werden (Stopper et al., 2003).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Induktion der Mikrokerne auf die Anzahl der Mitosen normiert. Um das zu erreichen wurden MCF-7 Zellen unter Zugabe von 2,5 µg/ml Cythochalasin B inkubiert und mit 17-β-Östradiol (1nM und 100 pM) behandelt. Cythochalasin B hemmt die Zellteilung aber nicht die Mitose. Dies führt zur Ausbildung mehrkerniger Zellen (Fenech, 1993). Wenn man nur die doppelkernigen Zellen auf Mikrokerne untersucht, wird dadurch eine Beschränkung der Mikrokernelauswertung auf mitotisch aktive Zellen möglich. Darüber hinaus bedeutet es, dass sich alle untersuchten Zellen seit Substanzzugabe genau einmal geteilt haben. Im vorliegenden Experiment wurden 3x1000 Zellen gezählt und der Anteil doppelkerniger Zellen bestimmt. Dieser war bei den

beiden mit Östradiol behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle um ca. 10% erhöht. Das bedeutet, dass sich die mit Östradiol behandelten Zellen schneller teilen mussten, da alle Zellen zur gleichen Zeit ausgesät und geerntet wurden. Man kann davon ausgehen, dass die spontan auftretenden genetischen Schäden in den Kontrollproben und in den mit Östradiol behandelten Proben zu Beginn des Experimentes identisch waren. Zum Zeitpunkt der Ernte jedoch war die Mikrokernrate in den mit Östradiol behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 1,4 erhöht.

Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass sich der Zellteilungszyklus in Östradiol behandelten Zellen von dem in unbehandelten Zellen unterscheidet. Eine gesteigerte Zellproliferation wird von einem beschleunigten und verkürzten Zellzyklus begleitet. Die verkürzte Zellzyklusdauer könnte die Genauigkeit der Zellzykluskontrollmechanismen oder der Reparaturmechanismen beeinträchtigen. Dies ist vergleichbar mit einer Situation, in der wichtige Kontrollpunkte durch chemische Substanzen beschädigt oder die DNA-Reparaturmechanismen gehemmt sind (Fischer et al., 2001). Die Wichtigkeit der Zellzykluskontrollpunkte für die Erhaltung der genomischen Stabilität und eine Korrelation zwischen einer Beeinträchtigung ihrer Funktion und dem Auftreten menschlicher Tumore wurden immer wieder diskutiert (Elledge, 1996; Zhou und Elledge, 2000). Die Zellzykluskontrollmechanismen sind nicht per se für den Ablauf des Zellzyklus essenziell, aber sie sind dafür zuständig, den Zellzyklus zu verlangsamen und somit Zeit zur Verfügung zu stellen, damit die Reparaturmechanismen eingreifen können. Erst wenn alles fehlerfrei oder korrigiert ist, erlauben sie dem Zellzyklus in die nächste Phase fortzuschreiten (Nyberg et al., 2002). Es ist bekannt, dass die Hemmung der DNA-Reparatur Mikrokerne induziert (Fenech und Neville, 1992). Weiterhin wurde mehrfach berichtet, dass Östradiol nicht auf direktem Wege die DNA-Reparatur beeinträchtigt (Coibion et al., 1989; Epstein und Smith, 1988). Kong et al., (1999) haben in einer Studie die Wirkung von Östradiol auf DNA-Polymerase-beta, einem DNA-Reparaturgen in Nierentumoren von Hamstern untersucht. Sie demonstrierten, dass in der gesamten DNA-Region, die für das Reparaturgen kodiert, keine Mutationen festzustellen waren, was darauf hinweist, dass nicht Mutationen im Reparaturgen für die Induktion von Nierentumoren in Hamstern durch Östradiol zuständig sind, sondern ein anderer Mechanismus dafür verantwortlich ist (Kong et al., 1999). Es wird diskutiert, dass für viele Erkrankungen des Menschen, bei denen eine Überempfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Faktoren vorliegt, nicht direkt Defekte

der DNA-Reparatursysteme verantwortlich sind, sondern eine gestörte zelluläre Reaktion auf DNA-Schäden (Strachan und Read, 2005).

Kiefer und Wiebel, (1998) haben darauf hingewiesen, dass die Bildung von Mikrokernen in der V79 Hamster Zelllinie in Anwesenheit von Koffein signifikant zunahm (Kiefer und Wiebel, 1998). Ähnlich, wie Davis et al., (2000), die festgestellt hatten, dass 17- β -Östradiol, die Potenz des Karzinogens B[a]P in MCF-7 Zellen Mikrokerne zu induzieren um ein Vielfaches erhöhte (Davis et al., 2002), beschrieben auch Kiefer und Wiebel, (1998), dass die Potenz verschiedener Karzinogene, darunter auch B[a]P, Mikrokerne zu induzieren, unter Zugabe von Koffein deutlich erhöht war (Kiefer und Wiebel, 1998). Es scheint so zu sein, dass Koffein und 17- β -Östradiol, die Effekte mutagener Substanzen über einen ähnlichen Mechanismus potenzierten und dass sie sogar, wenn sie zur gleichen Zeit an Lymphozyten angewendet werden, miteinander konkurrieren (Cocchi et al., 2005). In Experimenten an Lymphozyten stellten Pincheira et al., (2001) fest, dass Koffein die G2-Phase verkürzte und die chromosomalen Schäden siebenfach erhöhte (Pincheira et al., 2001). Zhou et al., (2000) demonstrierten, dass Koffein den G2/M Zellzykluskontrollpunkt aufheben kann (Zhou et al., 2000).

Patienten, die an Ataxia teleangiectasia leiden, haben ein erhöhtes Tumorrisiko. Sie haben eine Mutation im AT-Gen, welche zur Inaktivität der ATM Kinase und infolge einer verminderten Reparaturkapazität, zu erhöhten chromosomalen Aberrationen führt. Koffein ist ein Inhibitor der ATM (ataxia teleangiectasia mutated) Kinase. ATM Kinase aktiviert DNA-Reparaturprozesse und verlängert die G2-Phase des Zellzyklus. Pincheira et al., (2001) stellten jedoch überraschenderweise fest, dass Koffein in Lymphozyten von Patienten mit Ataxia teleangiectasia, die G2-Phase nicht wie erwartet noch mehr verkürzte, sondern im Gegenteil verlängerte. Sie vermuteten daraufhin, dass es zwei verschiedene ATM Kinase vermittelte G2-Kontrollmechanismen geben könnte: einen für die DNA-Reparatur und einen für die G2-Zellzyklusverzögerung zuständigen Weg. Während bei den Kontrolllymphozyten beide Wege durch die koffeinsensitive ATM Kinase vermittelt sein könnten, könnten bei den AT-Zellen, in Abwesenheit einer funktionierenden ATM Kinase, die koffeinempfindliche ATR Kinase für den DNA-Reparaturweg und die koffeinunempfindliche DNA-PK Kinase für den G2-Verzögerungspunkt zuständig sein (Pincheira et al., 2001). Dieses Beispiel vermag ansatzweise zu verdeutlichen, wie komplex und vielseitig die

DNA-Kontroll- und Reparaturmechanismen sind und wie wichtig sie für die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtes zwischen Zellteilung, Reparaturvorgängen und Vererbung eines fehlerfreien Genoms sind.

Zellzykluskontrollpunkte sind auch zuständig für das richtige Timing innerhalb des Zellzyklus und sorgen dafür, dass die Zelle die einzelnen Zellzyklusphasen nicht verlässt, bevor sichergestellt werden kann, dass die DNA fehlerfrei repliziert oder auf die einzelnen Chromosomen einwandfrei verteilt wurde. Stopper et al., (2003) haben in Experimenten an den Ovarialtumorzelllinien BG-1 und UCI auch untersucht, ob sich die Beschleunigung des Zellzyklus nach hormoneller Stimulation in der Verteilung der Zellen innerhalb verschiedener Zellzyklusphasen widerspiegelt. Dazu haben sie die FACS-Analyse angewandt. Diese ergab einen erhöhten Anteil von Zellen in der S-Phase, einen erniedrigten in der G2/M-Phase und nur geringe Unterschiede für die G1/G0-Phase (Stopper et al., 2003). Schwartz et al., (1996) haben eine umgekehrte Korrelation zwischen der Länge der G2-Phasenverzögerung nach Bestrahlung und der Frequenz der induzierten chromosomalen Deletionen in 10 menschlichen Tumorzelllinien gezeigt (Schwartz et al., 1996). Die Bedeutung der G2-Phasenverzögerung wurde auch von O'Reilly et al., (2003) hervorgehoben. Sie untersuchten das Verhalten der MLE15 Zelllinie nach Hypoxie, von der bekannt ist, dass sie DNA-Schäden hervorruft und Zellen vernichtet. Hypoxie führte zu einer deutlichen G2-Phasenverzögerung und verschaffte so den Zellen Zeit um den aufgetretenen Schaden zu reparieren. Zusätzliche Behandlung mit Koffein führte zu einem geringeren Anteil in der G2-Phase befindlicher Zellen und steigerte deren Anteil in G1-Phase. Eine totale Hemmung des G2-Kontrollpunktes führte zu einem erhöhten Anteil an geschädigten und toten Zellen (O'Reilly et al., 2003).

In einer aktuellen Studie untersuchten Cocchi et al., (2005) die Effekte von Koffein an Lymphozyten, welche mit Mitomycin C (MMC) behandelt wurden. Die vorausgegangene Blutentnahme erfolgte bei Frauen mit einem regelmäßigen Menstruationszyklus zu verschiedenen Zeiten desselben. Sie stellten fest, dass die in der ovulatorischen Periode und in der Luteal-Phase entnommenen und mit MMC behandelten Lymphozyten mehr chromosomale Schäden aufwiesen, als Lymphozyten, die in der Menstruationsphase entnommen wurden, in der die Progesteronkonzentrationen hoch waren. Nach zusätzlicher Behandlung mit Koffein, welches bekannterweise den G2/M-Kontrollpunkt inhibiert, zeigten

die in der Progesteron-Phase entnommenen Lymphozyten einen starken Anstieg der chromosomalen Schäden, während die in der Luteal- und der ovulatorischen Phase gewonnenen Lymphozyten nur eine geringe Steigerung der chromosomalen Schäden aufwiesen. Dass MMC in Kombination mit Koffein in Lymphozyten, die zu verschiedenen Zeiten des Menstruationszyklus entnommen wurden, unterschiedliche Effekte zur Folge hatten, könnte dadurch erklärt werden, dass die endogenen Hormone, ähnlich wie Koffein, das Anhalten der Mitose nach aufgetretenem DNA-Schaden stören (Cocchi et al., 2005).

Bisher wurden vor allem die kombinierten oder einzelnen Effekte von Koffein und 17- β -Östradiol auf Zellzykluskontrollpunkte, unter gleichzeitiger Behandlung mit bekannten Karzinogenen untersucht (Cocchi et al., 2005; Davis et al., 2002). Die Reproduktionshormone im Blutkreislauf einer Frau wurden als natürliche Tumorpromotoren angesehen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde 17- β -Östradiol in physiologischen Konzentrationen, welche nachweislich nicht direkt genotoxisch wirken, angewandt. Es konnte eine Erhöhung der genetischen Instabilität nach Behandlung mit 17- β -Östradiol ohne vorherige Anwendung eines Initiators oder einer direkt mutagen wirkenden Substanz demonstriert werden. Das könnte bedeuten, dass die Erhöhung der Zellproliferation per se, nach Stimulation der Zellen mit 17- β -Östradiol, karzinogen wirkt. Allerdings ist das noch hypothetisch. Zu berücksichtigen gilt auch, dass die hier vorliegenden Versuche mit einer Tumorzelllinie durchgeführt wurden, die im Vergleich zu Primärzellen veränderte Eigenschaften aufweist. Womöglich handelt es sich bei den Tumorzelllinien um „initiierte“ Zellen im weiteren Sinne, da bereits genetische Mutationen stattgefunden haben müssen, die sie dazu befähigen, sich in Zellkultur unbegrenzt zu teilen, im Gegensatz zu den Primärzellen im Organismus, die sich nur eine begrenzte Anzahl von Zellzyklen (ca. 50x) teilen können (Hayflick und Moorhead, 1961).

Eine von Yoon et al., (2002) veröffentlichte Studie zur chromosomalen Instabilität von neun Brustkrebszelllinien, plus der nicht aus Tumorgewebe stammenden Zelllinie MCF10A und Epithelzellen aus normalem Brustgewebe, ergab eine deutlich erhöhte chromosomale Instabilität in sieben von neun untersuchten Brustkrebszelllinien, darunter auch in MCF-7 Zellen. Dagegen wiesen die restlichen Brustkrebszelllinien, darunter auch MDA-MB231 eine mäßige chromosomale Instabilität auf, die jedoch im Vergleich zur MCF10A Zelllinie und den normalen Brustepithelzellen immer noch erhöht war. Es wurde

gezeigt, dass alle Zelllinien mit hoher chromosomaler Instabilität einen defekten Spindelkontrollpunkt aufwiesen, während die Zellen mit geringer chromosomaler Instabilität in der G2-Phase anhielten, um den durch Nocodazole induzierten Spindelschaden zu beheben (Yoon et al., 2002).

Es stellt sich die Frage, ob die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte durch einen Defekt im Spindelkontrollpunkt der MCF-7 Zellen zu erklären wären. Die Tatsache, dass in den MCF-7 Zellen und nicht in den MDA-MB231 Zellen die Mikrokernrate nach einer Behandlung mit 17- β -Östradiol erhöht war, könnte eventuell auch auf einer Schwäche der MCF-7 Zellen basieren, bei einer Chromosomenfehlverteilung am Spindelkontrollpunkt anzuhalten. Jedoch spricht die Konzentrationsabhängigkeit der Mikrokernsteigerung in den MCF-7 Zellen, wie auch die Tatsache, dass der Östrogenrezeptorantagonist 4-Hydroxytamoxifen in den MCF-7 Zellen sowohl das Zellwachstum, als auch die Mikrokernzahlen reduzierte, eher für einen dynamischen, aufeinander fein abgestimmten Mechanismus der Mikrokerninduktion, nach hormoneller Stimulation der MCF-7 Zellen. Vielleicht könnten weitere Untersuchungen an MCF-7 Zellen, wie z.B. die von Stopper et al., (2003) an Mikrokernen der BG-1 Zelllinie durchgeführte Kinetochoranalyse, zur Klärung beitragen. Dort konnte festgestellt werden, dass die Bildung von Mikrokernen, in den mit 100 pM 17- β -Östradiol behandelten BG-1 Zellen, auf einen von Störungen des Spindelapparates unabhängigen Mechanismus basiert (Stopper et al., 2003).

Es bleibt Aufgabe weiterer Studien festzustellen, ob der hier beschriebene Effekt der Erhöhung der genomischen Instabilität aufgrund einer gesteigerten Proliferationsrate per se auftritt und ob es sich dabei um einen auch in anderen, nicht hormonabhängigen Zellen und Organen gültigen Mechanismus handelt.

5 Zusammenfassung

Tumore in hormonsensitiven Geweben gehören zu den häufigsten bösartigen Erkrankungen. Östradiol kann als endogenes Hormon zur Entstehung von malignen Entartungen in menschlichen und tierischen Geweben beitragen. Die karzinogene Aktivität von Östradiol wurde bereits in mehreren Studien nachgewiesen und scheint das Ergebnis einer Kombination von hormonellen und genotoxischen Mechanismen zu sein (Roy und Liehr, 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein weiterer, bisher nicht untersuchter Mechanismus der Induktion chromosomaler Schäden durch Östradiol festgestellt werden. Die hier verwendeten Konzentrationen von Östradiol befanden sich weit unterhalb der direkt Chromosomen schädigenden Substanzmenge und führten in der östrogenrezeptorpositiven Zelllinie zu einer konzentrationsabhängigen Stimulation der Proliferation. Die parallel dazu gemessene Anzahl der Mikrokerne als Maß für die chromosomale Schädigung war in den angeregten Zellen ebenfalls erhöht und wies eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit auf. In der östrogenrezeptornegativen Zelllinie konnte weder eine gesteigerte Zellproliferation, noch eine vermehrte Mikrokerninduktion nachgewiesen werden. Der Östrogenrezeptor scheint daher in der proliferationsstimulierenden Funktion von Östradiol eine Schlüsselrolle zu spielen.

Die Vermutung ist, dass die Zellen durch den Proliferationsdruck den Zellteilungszyklus schneller durchlaufen und infolgedessen vermehrt Fehler im Replikationsablauf entstehen können. Zudem könnten wichtige Reparaturmechanismen oder Zellzykluskontrollpunkte nicht mehr adäquat agieren.

Dieser Arbeit folgende Experimente konnten diese Ergebnisse in einem weiteren hormonsensitiven Zellsystem bekräftigen. Diesmal wurde die Induktion von Zellproliferation und Mikrokernen in menschlichen Ovarialzellen, nach Behandlung mit Östrogenen untersucht (Stopper et al., 2003). Die dort erzielten Ergebnisse bekräftigten die hier verfolgte Hypothese, dass gesteigerte Genominstabilität durch eine Steigerung der Zellproliferationsrate nach hormoneller Stimulation verursacht werden kann (Fischer et al., 2001).

6 Literaturliste

Ahmad E., Shadab G.G.H.A., Hoda A., Afzal M., (2000), Genotoxic effects of estradiol-17 β on human lymphocyte chromosomes. *Mutation Research*, 466:109-115.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., (1995), *Molekularbiologie der Zelle, Kapitel 17: Der Zellteilungszyklus, Kapitel 18: Die Mechanik der Zellteilung, Kapitel 24: Krebs*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokio, 3. Auflage.

Ames B.N., Shigenaga M.K., Gold L.S., (1993), DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. *Environ Health Perspect.*, 101(5):35-44.

Antoniades H.N., (1991), PDGF: a multifunctional growth factor. *Baillieres Clin. Endocrinol Metab.*, 5(4):595-613.

Armitage P., Doll R., (1957), A two-stage theory of carcinogenesis in relation to the age distribution of human cancer. *Br. J. Cancer*, 11(2):161-9.

Banduhn N., Obe G., (1985), Mutagenicity of methyl 2-benzimidazolcarbamate, diethylstilbestrol and estradiol: structural chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, C-mitosis, polyploidies and micronuclei. *Mutation Research*, 156 (3):199-218.

Barrett J.C., (1993), Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ. Health. Perspect.*, 100:9-20.

Berenblum I., Shubik P., (1949), The persistence of latent tumour cells induced in the mouse's skin by a single application of 9:10-dimethyl-1:2-benzanthracene. *Br. J. Cancer*, 3(3):384-6.

Bielas J. H., Loeb L. A., (2005), Mutator phenotype in cancer: timing and perspectives. *Environ. Mol. Mutagen.*, 45(2-3):206-13.

Blackburn G.M., Flavell A.J., Thompson M.H., (1974), Oxidative and Photochemical Linkage of Diethylstilbestrol to DNA in Vitro. *Cancer Research*, 34:2015-2019.

Bodmer W.F., (1999), 1998 Runme Shaw Memorial Lecture: somatic evolution of cancer. *Ann Acad. Med. Singapore*, 28(3):323-9.

Boos G., Stopper H., (2000), Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II inhibitors. *Toxicology Letters*, 116:7-16.

Brenes F., Ruiz B., Correa P., Hunter F., Rhamakrishnan T., Fontham E., Shi T.Y., (1993), Helicobacter pylori causes hyperproliferation of the gastric epithelium: pre- and post-eradication indices of proliferating cell nuclear antigen. *Am. J. Gastroenterol.*, 88(11):1870-5.

Buret A.G., Fedwick J.P., Flynn A.N., (2005), Host epithelial interactions with Helicobacter pylori: a role for disrupted gastric barrier function in the clinical outcome of infection? *Can. J. Gastroenterol.*, 19(9):543-52.

Cahill D.P., Kinzler K.W., Vogelstein B., Lengauer C., (1999), Genetic instability and darwinian selection in tumors. *Trends Cell Biol.*, 9(12):M57-60.

Cameron R., Farber E., (1981), Some conclusions derived from a liver model for carcinogenesis. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, (58):49-53.

Camez A., Dupuy E., Bellucci S., Calvo F., Bryckaert M.C., Tobelem G., (1986), Human platelet-tumor cell interactions vary with the tumor cell lines. *Invasion Metastasis*, 6(6):321-34.

Chang-Claude J., Becher H., Hamann U., Schroeder-Kurth T., (1995), Risk assesment for familial occurrence of breast cancer. *Zentralbl. Gynakol.*, 117(8):423-34.

Chapekar T., (2001), Biology of Cancer: Some questions to answer. *Neuroendocrinology Letters*, 22:322-325.

Cocchi L., Scarcelli V., Puliti A., Barale R., Sbrana I., (2005), Endogenous sex hormones affect the mutagen-induced chromosome damage by altering a caffeine-sensitive check-point. *Mutation Research*, 570:281-288.

Cohen S.M., Purtilo D.T., Ellwein L.B., (1991), Ideas in pathology. Pivotal role of increased cell proliferation in human carcinogenesis. *Mod. Pathol.*, 4(3):371-82.

Coibion M., Kiss R., Jossa V., de Launoit Y., Van Geloven O., Malengreau A., Mattheiem W., Pasteels J.L., Paridaens R., (1989), In vitro influence of estradiol or progesterone on the thymidine labeling indices of human benign breast tumors. *Anticancer Res.*, 9(2):475-82.

Custodio J.B., Dinis T.C., Almeida L.M., Madeira V.M, (1994) Tamoxifen and hydroxytamoxifen as intermembrane inhibitors of lipid peroxidation. Evidence for peroxyl radical scavenging activity. *Biochem Pharmacol.*, 47(11):1989-98.

Davis C., Bhana S., Shorrocks A.J., Martin F.L., (2002), Oestrogens induce G(1) arrest in benzo[a]pyrene-treated MCF-7 breast cells whilst enhancing genotoxicity and clonogenic survival. *Mutagenesis*, 17(5):431-8.

DiGiovanni J., Rho O., Xian W., Beltran L., (1994), Role of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in mouse skin carcinogenesis. *Prog. Clin. Res.*, 387:113-38.

DuMond J.W., Roy D., (2001), The inhibition of DNA repair capacity by stilbene estrogen in Leydig cells: its implications in the induction of instability in the testicular genome. *Mutation Research*, 483:27-33.

Eckert I., Stopper H., (1996), Genotoxic Effects Induced by β -Oestradiol In Vitro. *Toxicology in Vitro*, 10:637-642.

Ekbom A., Helmick C., Zack M., Adami H.O., (1990), Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N.Engl. J. Med.*, 323(18):1228-33.

Elledge S.J., (1996), Cell Cycle Checkpoints: Preventing and Identity Crisis. *Science*, 274(5293):1664:1672.

Epstein R.J., Smith P.J., (1988), Estrogen-induced potentiation of DNA damage and cytotoxicity in human breast cancer cells treated with topoisomerase II-interactive antitumor drugs. *Cancer Research*, 48(2):297-303.

Fenech M., (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environmental Health Perspectives*, 101(3): 101-7.

Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E., (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocytes cultures. *Mut.Res.*, 534:65-75.

Fenech M., Neville S., (1992), Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.*, 19(1):27-36.

Fischer H.W., Keiwan A., Schmitt E., Stopper H., (2001), Increased formation of micronuclei after hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells. *Mutagenesis*, 16(3):209-212.

Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K., (1993), *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Sexualhormone*, S.542 ff., BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, 6.Auflage.

Frank S.A., (2004), Commentary: Mathematical models of cancer progression and epidemiology in the age of high throughput genomics. *Int. J. of Epidemiology*, 33:1179-1181.

Freund C., Mirabel L., Annane K., Mathelin C., (2005), Breastfeeding and breastcancer. *Gynecol. Obstet. Fertil.*, 33(10):739-44.

Friedewald W.F., Rous P., (1950), The pathogenesis of deferred cancer; a study of the after-effects of methylcholanthrene upon rabbit skin. *J. Exp. Med.*, 91(5):459-84.

Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofumi T., Ishidate M. Jr., (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Res.*, 245:245-249.

Hayflick L., Moorhead P.S., (1961), The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 25:585-621.

Hecker E., (1978), Co-carcinogens or modulators of carcinogenesis. New aspects of the etiology of human tumors and of the molecular mechanisms of carcinogenesis. *Naturwissenschaften*, 65(12):640-8.

Hecker E., (1984), Co-carcinogens of the initiation-(or tumor)promotor type as environmental risk factors of cancer in man, experimental analysis of an etiologic model situation of life style cancer and current problems of assessment of cancer risk in multifactorial carcinogenesis. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)*, 55(2):145-64.

Hecker E., Lutz D., Weber J., Goerttler K., Morton J.F., (1983), Multistage tumor development in the human esophagus – the first identification of cocarcinogens of the tumor promoter type as principal carcinogenic risk factors in a local life style cancer. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 132B:219-38.

Heldin C.H., Johnsson A., Wennergren S., Wernstedt C., Betsholtz C., Westermark B., (1986), A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. *Nature*, 319(6053):511-4.

Henderson B.E., Feigelson H.S., (2000), Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(3):427-433.

Herrström P., Bratt I., Holmen A., Högstedt B., (1998), Micronuclei in lymphocyte subsets in relation to immune proteins and allergic disease. *Mutation Research*, 405:35-40.

Highman B., Roth S.I., Greenman D.L., (1981), Osseous changes of Osteosarcomas in Mice continuously fed diets containing Diethylstilbestrol or 17 β -Estradiol. *Journal of Carcinogenesis*, 67(3):653-662.

Hua-Xiang Xia H., Talley N.J., (2001), Apoptosis in gastric epithelium induced by helicobacter pylori infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am. J. Gastroenterology*, 96(1):16-26.

Kaufmann W.K., Paules R.S., (1996), DNA damage and cell cycle checkpoints. *FASEB J.*, 10:238-247.

Key T.J., (1999), Serum oestradiol and breast cancer risk. *Endocrine-Related Cancer*, 6:175-180.

Key T., Appleby P., Barnes I., Reeves G., The Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, (2002), Endogenous Sex Hormones and Breast Cancer in Postmenopausal Women: Reanalysis of Nine Prospective Studies. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(8):606-616.

Key T.J., Verkasalo P.K., Banks E., (2001), Epidemiology of breast cancer. *Lancet. Oncol.*, 2(3):133-40.

Kiefer F., Wiebel F.J., (1998), Caffeine potentiates the formation of micronuclei caused by environmental chemical carcinogens in V79 Chinese hamster cells. *Toxicology Letters*, 96,97:131-136.

Kong L.Y., Hodgson A.V., Springer I.N., Liehr J.G., (1999), Lack of mutations in DNA polymerase beta of estradiol-induced hamster kidney tumors: sequence of hamster DNA polymerase beta cDNA. *Int. J. Oncol.*, 15(2):353-9.

Kong L.Y., Szaniszló P., Albrecht T., Liehr J.G., (2000), Frequency and molecular analysis of hprt mutations induced by estradiol in Chinese hamster V79 cells. *Int. J. Oncol.*, 17(6):1141-9.

Leite K.R., Darini E., Canavez F.C., Carvalho C.M., Mitteldorf C.A., Camara-Lopes L.H., (2005), Helicobacter pylori and cagA gene detected by polymerase chain reaction in gastric biopsies: correlation with histological findings, proliferation and apoptosis. *Sao Paulo Med. J.*, 123(3):113:8.

Li L., Zou L., (2005), Sensing, signaling, and responding to DNA damage: organization of the checkpoint pathways in mammalian cells. *J. Cell Biochem.*, 94(2):298-306.

Longmann S.M., Buehring G.C., (1987), Oral contraceptives and breast cancer. In vitro effects of contraceptive steroids on human mammary cell growth. *Cancer*, 59(2):281-7.

Lynch D.A., Mapstone N.P., Clarke A.M., Jackson P., Moayyedi P., Axon A.T., (1999), Correlation between epithelial cell proliferation and gastric mucosa. *J. Clin. Pathol.*, 52(5):367-371.

Lynch D.A., Mapstone N.P., Clarke A.M., Sobala G.M., Jackson P., Morrison L., Dixon M.F., Quirke P., Axon A.T., (1995), Cell proliferation in Helicobacter pylori associated gastritis and the effect of eradication therapy. *Gut*, 36(3):346-50.

MacGregor J.T., Wehr C.M., Gould D.H., (1980), Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. *Environ. Mutagen.*, 2:509-514.

Malka D., Hammel P., Maire F., Rufat P., Madeira I., Pessione F., Levy P., Ruszniewski P., (2002), Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut*, 51:849-852.

Marshall C.J., (1991), Tumor suppressor genes. *Cell*, 64(2):313-26.

McLachlan J.A., (2001), Environmental Signaling: What Embryos and Evolution Teach Us About Endocrine Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*, 22(3):319-341.

McWorther W.P., (1988), Allergy and risk of cancer. A prospective study using NHANESI followup data. *Cancer*, 62(2):451-5.

Melo J., Toczyski D., (2002), A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Current Opinion in Cell Biology*, 14:237-245.

Miller B., Potter-Locher F., Seelbach A., Stopper H., Utesch D., Madle S., (1998), Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test. *Gesellschaft für Umwelt-Mutations-Forschung. Mutat. Res.*, 410(1):81-116.

Mills P.K., Beeson W.L., Fraser G.E., Phillips R.L., (1992), Allergy and Cancer: organ site-specific results from the Adventist Health Study. *Am J Epidemiol.*, 136 (3):287-95.

Moolgavkar S.H., Knudson A.G. Jr., (1981), Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 66(6):1037-52.

Moolgavkar S.H., Luebeck E.G., (1992), Multistage carcinogenesis: population-based model for colon cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84(8):610-8.

Nagasawa H., Mori T., Nakajima Y., (1980), Long-Term Effects of Progesterone or Diethylstilbestrol with or without Estrogen after Maturity on Mammary Tumorigenesis in Mice, *European Journal of Cancer*, 16:1583-1589.

Nardone G., Staibano S., Rocco A., Mezza E., D'Armiento F.P., Insabato L., Coppola A., Salvatore G., Lucariello A., Figura N., De Rosa G., Budillon G., (1999), Effect of Helicobacter pylori infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis. *Gut*, 44:789-799.

Nowell P.C., (1976), The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260):23-8.

Nyberg K.A., Michelson R.J., Putnam C.W., Weinert T.A., (2002), Toward Maintaining The Genome: DNA Damage and Replication Checkpoints. *Annu. Rev. Genet.*, 36:617-56.

Odenbreit S., Püls J., Sedlmaier B., Gerland E., Fischer W., Haas R., (2000), Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into Gastric Epithelial Cells by Type IV Secretion. *Science*, 287(5457):1497-1500.

Olivieri G., Micheli A., (1983), Mitotic delay and repair in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 122 (1):65-72.

O'Reilly M.A., Stavarsky R.J., Finkelstein J.N., Keng P.C., (2003), Activation of the G2 cell cycle checkpoint enhances survival of epithelial cells exposed to hyperoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 284:L368-L375.

Panella C., Ierardi E., Polimeno L., Balzano T., Ingrosso M., Amoruso A., Traversa A., Francavilla A., (1996), Proliferative activity of gastric epithelium in progressive stages of *Helicobacter pylori* infection. *Dig. Dis. Sci.*, 41(6):1132-8.

Parsonnet J., Friedman G.D., Orentreich N., Vogelman H., (1997), Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 40:297-301.

Payne J., Jones C., Lakhani S., Kortenkamp A., (2000), Improving the reproducibility of the MCF-7 cell proliferation assay for the detection of xenoestrogens. *The Science of the Total Environment*, 248:51-62.

Peek R.M., Blaser M.J., Mays D.J., Forsyth M.H., Cover T.L., Song S.Y., Krishna U., Pietenpol J.A., (1999), *Helicobacter pylori* strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. *Cancer Res.*, 59(24):6124-31.

Pike M.C., Spicer D.V., Dahmouh L., Press M.F., (1993), Estrogens, progesterons, normal breast cell proliferation and breast cancer risk. *Epidemiol. Rev.*, 15(1):17-35.

Pincheira J., Bravo M., Navarrete M.H., Marcelain K., Lopez-Saez J.F., de la Torre, C., (2001), Ataxia telangiectasia: G2 checkpoint and chromosomal damage in proliferating lymphocytes. *Mutagenesis*, 16(5):419-422.

Preston-Martin S., Pike M.C., Ross R.K., Jones P.A., Henderson B.E., (1990), Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res.*, 50(23):7415-21.

Ritter G., Wilson R., Pompei F., Burmistrov D., (2003), The Multistage Model of Cancer Development: Some Implications. *Toxicol. Ind. Health.*, 19(7-10):125-45.

Roy D., Liehr J.G., (1999), Estrogen, DNA damage and mutations. *Mutation Research*, 424:107-115.

Ruiz J., Sangro B., Cuende J.I., Beloqui O., Riezu-Boj J.I., Herrero J.I., Prieto J., (1992), Hepatitis B and C viral infections in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 16(3):637-41.

Sato S., Tomita I., (2001), Short-Term Screening Method for the Prediction of Carcinogenicity of Chemical Substances: Current Status and Problems of an in vivo Rodent Micronucleus Assay. *J. Health Science*, 47(1):1-8.

Schiffmann D., DeBonis U., (1991), Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise. *Mutat. Res.*, 246 (1):113-22.

Schmausser B., Müller S.O., Eck M., Moller M., Müller-Hermelink H., Stopper H., (2000), Helicobacter pylori induces DNA damage in vitro. *Cancer Lett.*, 152(2):145-9.

Schmoll H.-J., Höffken K., Possinger K., (2006), *Kompendium Internistische Onkologie, Teil 1, Kap. 1: Prinzipien der Tumorbiologie*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, Trient/Italien, 4. Auflage.

Schuler M., Hasegawa L., Parks R., Metzler M., Eastmond D.A., (1998), Dose-Response Studies of the Induction of Hyperdiploidy and Polyploidy by Diethylstilbestrol and 17 β -Estradiol in Cultured Human Lymphocytes Using Multicolor Fluorescence In Situ Hybridization. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31:263-273.

Schwartz G.K., (2005), Development of cell cycle active drugs for the treatment of gastrointestinal cancers: a new approach to cancer therapy. *J.Clin. Oncol.*, 23(20):4499-508.

Schwartz J.L., Cowan J., Grdina D.J., Weichselbaum R.R., (1996), Attenuation of G2-phase cell cycle checkpoint control is associated with increased frequencies of unrejoined chromosome breaks in human tumor cells. *Radiat. Res.*, 146(2):139-43.

Segal E.D., Cha J., Lo J., Falkow S., Tompkins L.S., (1999), Altered states: Involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, 96(25):14559-14564.

Smith A.P.L., Gimenez-Abian J.F., Clarke D.J., (2002), DNA-Damage-Independent Checkpoints: Yeast and Higher Eukaryotes. *Cell Cycle*, 1:16-33.

Solomon M.J., Schnitzler M., (1998), Cancer and inflammatory bowel disease: bias, epidemiology, surveillance, and treatment. *World J. Surg.*, 22(4):352-8.

Soto A.M., Sonnenschein C., Chung K.L., Fernandez M.F., Olea N., Serrano F.O., (1995), The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.*, 103(7):113-22.

Stenback F., Peto R., Shubik P., (1981), Initiation and promotion at different ages and doses in 2200 mice. I. Methods and the apparent persistence of initiated cells. *Br. J. Cancer*, 44(1):1-14.

Stopper H., Kirchner S., Schiffmann D., Poot M., (1994), Cell cycle disturbance in relation to micronucleus formation induced by the carcinogenic estrogen diethylstilbestrol. *Pathobiology*, 62(4):180-5.

Stopper H., Müller S.O., (1997), Micronuclei as a Biological Endpoint for Genotoxicity: A Minireview. *Toxicology in Vitro*, 11:661-667.

Stopper H., Schmitt E., Gregor C., Müller S.O., Fischer W.H., (2003), Increased cell proliferation is associated with genomic instability: elevated micronuclei frequencies in estradiol-treated human ovarian cancer cells. *Mutagenesis*, 18(3):243-247.

Strachan T., Read A.P., (2005), *Molekulare Humangenetik, Kap.1: DNA-Struktur und Genexpression, Kap.2: Struktur und Funktion der Chromosomen, Kap.11: Die Instabilität des menschlichen Genoms: Mutationen und DNA-Reparatur, Kap. 17: Tumorgenetik*, Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München, 3. Auflage.

Suganuma M., Kawabe T., Hori H., Funabiki T., Okamoto T., (1999), Sensitization of Cancer Cells to DNA Damage-induced Cell Death by Specific Cell Cycle G2 Checkpoint Abrogation. *Cancer Research*, 59:5887-5891.

Tekmal R.R., Ramachandra N., Gubba S., Durgam V.R., Mantione J., Toda K., Shizuta Y., Dillehay D.L., (1996), Overexpression of int-5/aromatase in mammary glands of transgenic mice results in the induction of hyperplasia and nuclear abnormalities. *Cancer Res.*, 56:3180-5.

Vogel P.M., Georgiade N.G., Fetter B.F., Vogels F.S., McCarty K.S. Jr., (1981), The correlation of histologic changes in the human breast with the menstrual cycle. *Am. J. Pathol.*, 104(1):23-34.

Walaszek Z., Hanausek M., Slaga T.J., (2004), Mechanisms of Chemoprevention. *Chest*, 125:128S-133S.

Walaszek Z., Hanausek M., Slaga T.J., (2005), Combined Natural Source Inhibitors in Skin Cancer Prevention. *Cellscience Reviews*, 1(3):1742-8130.

Wawrzyn H., Hesch R.-D., (1999), Karzinogenese und Prävention unter Berücksichtigung hormoneller und molekulargenetischer Aspekte – ein Paradigmenwandel. *Journal für Menopause*, 6(2):21-41.

Weinberg R.A., (1989), Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.*, 49(14):3713-21.

Wheeler W.J., Cherry L.M., Downs T., Hsu T.C., (1986), Mitotic inhibition and aneuploidy induction by naturally occurring and synthetic estrogens in Chinese hamster cells in vitro. *Mutat. Res.*, 171(1):31-41.

Wingo P.A., Tong T., Bolden S., (1995), Cancer Statistics. *CA-A Cancer Journal for Clinicians*, 45:8-30.

Wu M.S., Chen C.J., Lin J.T., (2005), Host-environment interactions: their impact on progression from gastric inflammation to carcinogenesis and on development of new approaches to prevent and treat gastric cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14(8):1878-82.

Yoon D.-S., Wersto R.P., Zhou W., Chrest F.J., Garrett E.S., Kwon T.K., Gabrielson E., (2002), Variable Levels of Chromosomal Instability and Mitotic Spindle Checkpoint Defects in Breast Cancer. *Am. J. Pathology*, 161:391-397.

Zhou B.-B.S., Elledge S.J., (2000), The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408:433-439.

7 Anhang

Tabelle 1: MCF-7 mit 100 pM Östradiol							
Bezeichnung	Konzentration in pM	Zellzahl	Mittelwert Zellzahl	Standardabweichung	Wachst.-fakt.	Mikrokernzahl	Standardabweichung
K1	0	1,95	1,78	0,186	1	32	5
K2		1,59					
Lk1	< 0,1% EtOH	1,80	1,92	0,109	1,08	23	6
Lk2		2,03					
1 E1	Estradiol 100 pM	5,10	5,24	0,142	2,95	54	6
1 E2		5,38					

Tabelle 2: MDA-MB231 mit 100 pM Östradiol							
Bezeichnung	Konzentration in pM	Zellzahl	Mittelwert Zellzahl	Standardabweichung	Wachst.-fakt.	Mikrokernzahl	Standardabweichung
K1	0	3,77	3,81	0,04	1,00	19	1
K2		3,84					
Lk1	<0,1% EtOH	3,72	3,65	0,07	0,96	20	1
Lk2		3,58					
1 E1	Estradiol 100 pM	3,49	3,63	0,15	0,95	25	5
1 E2		3,78					

Tabelle 3: MCF-7 mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol							
Bezeichnung	Konzentration in pM	Zellzahl	Mittelwert Zellzahl	Standardabweichung	Wachst.-fakt.	Mikrokernzahl	Standardabweichung
K1		1,97					
K2	0	1,92	1,92	0,049	1	23	3,52
K3		1,87					
Lk1		2,30					
Lk2	<0,1% EtOH	2,13	2,15	0,144	1,12	23	4,23
Lk3		2,01					
2 E1		5,24					
2 E2	E 1000pM	5,61	5,24	0,369	2,73	42	6,94
2 E3		4,87					
3 E1		4,19					
3 E2	E 500pM	4,26	4,33	0,173	2,26	40	5,42
3 E3		4,52					
4 E1		4,16					
4 E2	E 200pM	4,63	4,39	0,236	2,29	37	3,39
4 E3		4,39					
5 E1		3,92					

7 Anhang

5 E2	E 50pM	4,14	4,00	0,122	2,09	33	7,96
5 E3		3,95					
6 E1		3,58					
6 E2	E 25pM	3,10	3,38	0,249	1,76	26	4,13
6 E3		3,46					
7 E1		2,88					
7 E2	E 5pM	2,35	2,72	0,328	1,42	22	6,16
7 E3		2,95					

Tabelle 4:
Wiederholungsexperiment MCF-7 mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol

Bezeichnung	Konzentration in pM	Zellzahl	Mittelwert Zellzahl	Standardabweichung	Wachst.-fakt.	Mikrokernzahl	Standardabweichung
K1		1,96					
K2	0	2,05	1,93	0,14	1	24	1,0
K3		1,77					
Lk1		1,97					
Lk2	<0,1% EtOH	2,08	1,93	0,18	1	25	2,6
Lk3		1,73					
1 E1		4,03					
1 E2	E 200pM	3,87	3,90	0,13	2,02	37	8,8
1 E3		3,78					
2 E1		3,70					
2 E2	E 50pM	3,27	3,53	0,23	1,83	38	7,5
2 E3		3,62					
3 E1		2,97					
3 E2	E 25pM	2,97	2,90	0,13	1,5	39	5,1
3 E3		2,75					
4 E1		2,33					
4 E2	E 5pM	2,62	2,37	0,23	1,23	31	3,3
4 E3		2,17					
MMC1		1,21					
MMC2	MMC 10µg/ml	1,31	1,25	0,06	0,65	112	13,5
MMC3		1,21					

Tabelle 5:
MDA-MB231 mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol

Bezeichnung	Konzentration in pM	Zellzahl	Mittelwert Zellzahl	Standardabweichung	Wachst.-fakt.	Mikrokernzahl	Standardabweichung
K1		2,06					
K2	0	2,21	2,12	0,09	1	25	4,75
K3		2,09					
Lk1		2,02					
Lk2	<0,1% EtOH	2,03	2,08	0,10	0,98	22	3,97
Lk3		2,20					
1 E1		2,04					
1 E2	E 200pM	2,02	2,04	0,02	0,96	25	6,66

1 E3		2,07					
2 E1		1,94					
2 E2	E 50pM	2,02	1,98	0,04	0,93	24	4,29
2 E3		1,98					
3 E1		2,05					
3 E2	E 25pM	2,10	2,13	0,11	1	22	3,74
3 E3		2,26					
4 E1		2,06					
4 E2	E 5pM	2,14	2,04	0,04	0,99	23	8,91
4 E3		2,09					
MMC1		1,41					
MMC2	MMC 10µg/ml	1,45	1,43	0,02	0,67	73	9,15
MMC3		1,49					

Tabelle 6:
MCF-7 mit Cyt B und verschiedenen Konzentrationen Östradiol

Bezeichnung	Konzentration in pM	%DK Zellen	MW-%DK	Standardabweichung	MK/DK (SMK)	MW MK/DK	Standardabweichung
K1		69			38		
K2	0	63,4	66,3	3,75	41,5	38,7	5,31
K3		66,4			36,5		
Lk1		65,4			46,5		
Lk2	<0,1% EtOH	58,4	61,6	4,01	46	43,1	8,74
Lk3		60,9			37		
1E1		74,4			55,5		
1E2	1000 pM	73	73,5	1,73	54,5	55,7	3,04
1E3		73			57		
2E1		74,5			45		
2E2	100 pM	72,4	72,7	2,2	62	53,5	6,99
2E3		71,2			53,5		

Tabelle 7:
MCF-7 mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol und Tamoxifen

Bezeichnung	Konzentration in pM	Zellzahl	Mittelwert Zellzahl	Standardabweichung	Wachst.-fakt.	Mikrokernzahl	Standardabweichung
K1	0	1896	1,90	0,01	1	21	1
K2		1905					
Lk1	<0,1% EtOH	1898	1,81	0,09	0,95	27	3
Lk2		1712					
1 E1	E 1000 pM	5256	5,03	0,22	2,65	44	3
1 E2		4812					
2 E1	E 100 pM	4328	4,52	0,19	2,38	40	9
2 E2		4702					
T1	T 5 µM	1420	1,35	0,07	0,71	30	1
T2		1273					
1ET1	E 1000 pM + T 5 µM	1746	1,92	0,18	1,01	33	1
1ET2		2098					
2ET1	E 100 pM + T 5 µM	1620	1,54	0,08	0,81	37	2
2ET2		1453					

Tabelle 8: Wiederholungsexperiment MCF-7 mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol und Tamoxifen							
Bezeichnung	Konzentration in nM	Zellzahl	Mittelwert Zellzahl	Standard- abweichung	Wachst.- fakt.	Mikro- kern- zahl	Standard- abweichung
K1	0	1,14	1,11	0,04	1	34	6,7
K2		1,11					
K3		1,06					
Lk1		1,29					
Lk2	<0,1% EtOH	1,1	1,19	0,09	1,07	30	3,4
Lk3		1,13					
1 E1		3,12					
1 E2	E 1 nM	3,21	3,17	0,17	2,86	54	7,3
1 E3		3,17					
2 E1		2,42					
2 E2	E 0,1nM	2,17	2,36	0,13	2,13	53	9,1
2 E3		2,4					
1OT1		1,14					
1OT2	T 10 nM	1,1	1,12	0,03	1,01	45	8,3
1OT3		1,08					
2OT1		1,13					
2OT2	T 1 nM	1,23	1,29	0,15	1,16	37	9
2OT3		1,45					
1E1OT1		1,8					
1E1OT2	E 1 nM+ T 10 nM	1,82	1,81	0,01	1,63	41	7,9
1E1OT3		1,8					
1E2OT1		1,95					
1E2OT2	E 1 nM+ T 1 nM	1,83	1,99	0,18	1,79	37	7,8
1E2OT3		2,19					
MMC1	MMC 60 µg/ml	0,37	0,43	0,16	0,39	99	11,5
MMC2		0,4					

Tabelle 9: Wiederholungsexperiment MCF-7 mit verschiedenen Konzentrationen Östradiol und Tamoxifen							
Bezeichnung	Konzentration	Zellzahl	Mittelwert Zellzahl	Standard- abweichung	Wachst.- fakt.	Mikro- kern- zahl	Standard- abweichung
K1	0	2,10	2,04	0,31	1	24	1,2
K2		2,31					
K3		1,70					
Lk1	<0,1% EtOH	1,98	2,18	0,192	1,07	21	4,4
Lk2		2,35					
Lk3		2,23					
1 E1	E 1000 pM	5,68	5,99	0,476	2,94	45	1,7
1 E2		5,39					
1 E3		6,90					
1T1	T 1 µM	2,10	2,11	0,04	1,04	31	3,8
1T2		2,16					
1T3		2,08					

2T1	T 100 nM	3,45					
2T2		3,36	3,22	0,318	1,58	26	4
2T3		2,86					
3T1	T 10 nM	2,27					
3T2		3,10	2,48	0,554	1,22	28	3
3T3		2,08					
2 E1	E 200 pM	4,18					
2 E2		3,84	4,14	0,334	2,03	45	1
2 E3		4,39					
1E2T1	E 200 pM+T 1 µM	1,91					
2E2T1		2,41	2,10	0,276	1,03	37	4,4
3E2T1		1,97					
1E2T2	E 200 pM +T 100 nM	2,98					
2E2T2		3,33	3,16	0,172	1,55	33	3
3E2T2		3,19					
1E2T3	E 200pM +T 10 nM	3,29					
2E2T3		3,78	3,42	0,31	1,68	35	4
3E2T3		3,21					
MMC1	10 µg/ml	0,51					
MMC2		0,76	0,66	0,134	0,32	80	4,5
MMC3		0,71					

Tabelle 10:
Parallelexperiment MCF-7 mit Östradiol und Tamoxifen

Bezeichnung	Konzentration in nM	Zellzahl	Mittelwert Zellzahl	Standardabweichung	Wachst.-fakt.	Mikrokernzahl	Standardabweichung
Ko	0	2,55			1,00	23	2,31
Lko	0,1EtOH	2,58			1,01	19	2,65
1E	E 1nM	6,41			2,51	41	2
1T	T 5nM	2,41			0,95	26	2,52
2T	T 0,5nM	2,53			0,99	21	1,15
3T	T 0,1nM	2,73			1,07		
4T	T 0,01nM	2,70			1,06		
E1T	E 1nM+ T 5nM	4,61			1,81	32	3,05
E2T	E 1nM+ T 0,5nM	4,92			1,93	20	3,51
E3T	E 1nM+ T 0,1nM	5,38			2,11		
E4T	E 1nM+ T 0,01nM	5,76			2,26		
MMC	MMC 10 µl/ml	2,73			0,84	37	2,65

Tabelle 11:
Parallelexperiment MDA-MB231 mit Östradiol und Tamoxifen

Bezeichnung	Konzentration in nM	Zellzahl	Mittelwert Zellzahl	Standardabweichung	Wachst.-fakt.	Mikrokernzahl	Standardabweichung
Ko	0	2,23			1,00	21	3,16
Lko	0,1EtOH	2,20			0,99	23	2,55
1E	E 1nM	2,41			1,08	20	2,05
1T	T 5nM	2,04			0,91	28	3,5
2T	T 0,5nM	2,14			0,96	19	1,53
3T	T 0,1nM	2,31			1,04		

7 Anhang

<i>4T</i>	<i>T 0,01nM</i>	2,56			<i>1,15</i>		
E1T	E1 nM + T 5 nM	2,06			0,92	23	2,86
E2T	E1 nM + T 0,5 nM	2,26			1,01	22	3,21
<i>E3T</i>	<i>E1nM + T 0,1 nM</i>	2,48			<i>1,11</i>		
<i>E4T</i>	<i>E1nM + T 0,01 nM</i>	2,35			<i>1,05</i>		
MMC	MMC10 µl/ml	1,90			0,85	38	4,04

Hinweis: Bei den kursiv hervorgehobenen Experimenten wurde die Mikrokernzahl nicht ermittelt.

Danksagung

An allererster Stelle möchte ich mich bei Frau Professor Helga Stopper bedanken, die mich geduldig, verständnisvoll und sehr hilfsbereit über einen langen Zeitraum betreut hat und es mir somit ermöglicht hat, die vorliegende Dissertation anzufertigen. Frau Professor Helga Stopper und Herr Dr. Wolfgang Fischer sind gemeinsam die „geistigen Väter“ dieser Arbeit und haben mir dieses interessante Dissertationsthema zur Verfügung gestellt.

Bei Dr. Wolfgang Fischer möchte ich mich ganz besonders dafür bedanken, mein Interesse für das vorliegende Thema geweckt zu haben.

Ganz herzlich möchte ich mich beim gesamten Arbeitskreis für die geduldige Anleitung in die Laborarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken. Mein besonderer Dank an dieser Stelle gilt Elmar Schmitt, der mich bei der Planung und Durchführung zahlreicher Experimente unterstützt hat.

Bei meiner Mutter möchte ich mich ganz herzlich dafür bedanken, dass sie mir das Studium und somit die vorliegende Dissertation ermöglicht hat. In besonderer Weise hat mich meine gesamte Familie nach der Geburt meines Sohnes darin unterstützt, Zeit zu finden, um die Doktorarbeit zu schreiben. Herzlichen Dank!

Anke Dahlmann möchte ich für das interessierte Korrekturlesen und die hilfreichen Anregungen danken. Bei Frau Ohr möchte ich mich für die wohlwollende und wertvolle Hilfestellung bedanken, die zur Realisierung dieser Promotion wesentlich beigetragen hat.

Die Hilfe von Victor Roman war für mich während dem Entstehungsprozess dieser Arbeit von unschätzbarem Wert. Er war immer für mich da und konnte mir auf verschiedenen Ebenen, sowohl in praktischer, als auch in emotionaler Hinsicht sehr helfen. Vielen Dank!

Lebenslauf

Zur Person:

Adriana Roman, geboren Keiwan

- Geburtsdatum: 03.07.1974
- Geburtsort: Temeschburg/Rumänien
- Wohnort: Stuttgart
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Familienstand: verheiratet, ein Sohn

Schulische Ausbildung:

1980-1984 Grundschule Temeschburg/Rumänien
1984-1990 Nikolaus-Lenau Gymnasium Temeschburg/Rumänien
1990-1993 Walther-Rathenau Gymnasium Schweinfurt
09.07.1993 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschulausbildung:

10/1993-09/2000 Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
10/2000-11/2001 Studium der Humanmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
03/1997 Ärztliche Vorprüfung
08/1998 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2000 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2001 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Ausbildung:

10/2000-10/2001 Praktisches Jahr am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart

- 10/2000-02/2001 Abteilung für Chirurgie
- 02/2001-06/2001 Abteilung für Psychosomatische Medizin
- 06/2001-09/2001 Abteilung für Innere Medizin

01/2002-07/2003 Ärztin im Praktikum am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart,
Abteilung für Psychosomatische Medizin
seit 07/2003 Assistenzärztin am Robert-Bosch-Krankenhaus Stuttgart,
Abteilung für Psychosomatische Medizin
seit 10/2003 Psychoanalytische Ausbildung am Institut für Psychoanalyse
der DPG Stuttgart

Promotion:

seit 04/1999 Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Würzburg zur genetischen Schädigung von Säugerzellen durch
die Induktion vermehrter Zellproliferation
Veröffentlichung: W. H. Fischer, A. Keiwan, E. Schmitt, H. Stopper, (2001), Increased
formation of micronuclei after hormonal stimulation of cell proliferation in
human breast cancer cells. *Mutagenesis*, 16(3):209-212