

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Toxikologie
Vorstand: Professor Dr. sc. techn. W. K. Lutz

**Genomische Instabilität
bei der humanen Ovarialtumorzelllinie BG-1
durch hormonelle Proliferationsstimulierung**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius - Maximilians - Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Caroline Gregor
aus Tübingen

Würzburg, Juni 2003

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

Korreferent: Privatdozent Dr. rer. nat. W. Fischer

Dekan: Professor Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 21. November 2003

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Einführung	1
1.1.1	Tumor und Krebs.....	1
1.1.2	Ursachen der Tumorentstehung.....	1
1.1.3	Karzinogene.....	2
1.1.4	Zellteilung.....	3
1.1.5	Zellzykluskontrolle und DNA- Reparatur	3
1.2	Hormone und Krebs	5
1.3	Hintergrund und Fragestellung dieser Arbeit	8
1.4	Vorstellung der verwendeten Testsysteme	10
1.4.1	In vitro Mikrokern-Test.....	10
1.4.2	Zellzyklusanalyse	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Chemikalien und Arbeitsgeräte	12
2.1.1	Allgemeine Laborchemikalien und Verbrauchsmaterial.....	12
2.1.2	Verwendete Arbeitsgeräte	12
2.2	Puffer und Lösungen	13
2.3	Zellkultur	14
2.3.1	Verwendete Zelllinien	14
2.3.2	Kulturmedien.....	14
2.3.3	Kultivierung der Zellen	15
2.4	Ermittlung der Proliferationskinetik der Zelllinien	17
2.5	Optimierung des Phenolrot-Gehaltes im Medium der BG-1 Zellen	17
2.6	Bestimmung der Zellüberlebensrate mit der Ethidiumbromid/ Fluoresceindiacetat Methode.....	19
2.6.1	Testprinzip.....	19
2.6.2	Durchführung	19
2.6.3	Auswertung.....	19
2.7	Proliferationsexperimente.....	20
2.7.1	Humane östrogensensitive Ovarialkarzinomzelllinie BG-1	20
2.7.2	Humane östrogeninsensitive Ovarialkarzinomzelllinie UCI-107.....	20
2.8	Testsubstanzen.....	21
2.9	Mikrokerntest	22
2.9.1	Eigenschaften	22
2.9.2	Durchführung	22

2.9.3	Auswertung.....	23
2.10	Inhibierung der Zytokinese.....	23
2.10.1	Testprinzip.....	23
2.10.2	Durchführung.....	23
2.10.3	Auswertung.....	24
2.11	Zellzyklusanalyse.....	24
2.11.1	Testprinzip.....	24
2.11.2	Durchführung.....	24
2.11.3	Auswertung.....	25
3	Ergebnisse	27
3.1	Vorversuche.....	27
3.1.1	Proliferationskinetik in Vollmedium.....	27
3.1.2	Optimierung des Phenolrot-Gehaltes im Medium der BG- 1 Zellen	30
3.1.3	Untersuchung der Zellüberlebensrate mit der Ethidiumbromid/ Fluoresceindiacetat Methode.....	33
3.1.4	Nachweis des Östrogenrezeptors.....	33
3.2	Proliferationsexperimente.....	34
3.2.1	Stimulationsversuche.....	34
3.2.2	Einsatz des Rezeptorantagonisten Hydroxytamoxifen.....	37
3.3	Inhibierung der Zytokinese.....	41
3.4	Langzeitproliferation und Zellzyklusanalyse der BG-1 Zellen.....	43
3.4.1	Langzeitproliferation	43
3.4.2	Zellzyklusanalyse	47
4	Diskussion.....	50
5	Zusammenfassung	60
6	Literatur	62
7	Anhang.....	71
7.1	Optimierung des Phenolrot-Gehalts im Medium der BG -1 Zellen	71
7.2	Proliferationsexperimente.....	72
7.3	Einsatz des Östrogenrezeptorantagonisten 4-Hydroxytamoxifen	73
7.4	Inhibierung der Zytokinese mit Cytochalasin B.....	75
7.5	Zellzyklusanalyse	76

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

1.1.1 Tumor und Krebs

Unter dem Begriff Tumor wird die abnorme Vergrößerung eines Gewebes verstanden, welche durch autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen entsteht. In einem Tumor ist der Anteil sich teilender Zellen größer als im Normalgewebe. Der Begriff Krebs steht für maligne Tumoren. Maligne Tumoren unterscheiden sich von benignen Tumoren durch infiltratives und destruktives Wachstum, Verlust der Differenzierungsfähigkeit und verminderte „Drug“-Sensitivität sowie durch die Fähigkeit zur Metastasierung (Hartwell und Kastan, 1994; Wagener, 1999).

1.1.2 Ursachen der Tumorentstehung

Die Entwicklung eines Tumors, die Umwandlung einer normalen Körperzelle in eine Tumorzelle ist ein mehrstufiger Prozeß, bei dem mehrere Veränderungen der Erbsubstanz erforderlich und viele verschiedene Gene beteiligt sind (Boyd and Barrett, 1990). Tumoren sind in der Regel klonalen Ursprungs, d.h. sie entstehen aus einer einzelnen Normalzelle (Nowell, 1976). Als Ausgangspunkt dafür gilt eine Veränderung der Erbsubstanz, so dass die Eigenschaften der malignen Proliferation genetisch fixiert und dadurch bei einer Zellteilung auf die Tochterzellen weitergegeben werden können. Solch ein initiales Ereignis in einer einzelnen Zelle verschafft ihr einen Wachstumsvorteil, wodurch ein Klon identischer Zellen entsteht. Diese Sequenz wiederholt sich, bis das Wachstum dieses Zellklons den Kontrollmechanismen des Wirts weitgehend entzogen ist. Der Überlebensvorteil der Tumorzellklone beruht also auf mehreren mutagenen Ereignissen.

Der Prozeß der Tumorentstehung wird durch das 'Mehrstufenmodell' in drei Phasen unterteilt: Initiation, Promotion und Progression. Die Initiation bedeutet die erste genetische Veränderung und Auslösung einer irreversiblen molekularen Transformation. Initiatoren verursachen direkt oder indirekt DNA-Modifikationen.

Solche DNA – Mutationen, können zur Aktivierung oder Inaktivierung kritischer Gene führen. Vornehmlich sind zwei große Gruppen von Genen, die Onkogene, bzw. ihre Vorstufen die Proto- Onkogene, und die Tumorsuppressorgene, in den Ablauf der malignen Transformation verwickelt (Weinberg, 1989; Sager, 1989). So kann beispielsweise aus der Aktivierung eines Proto- Onkogens zu einem Onkogen durch eine mutagene Veränderung ein stetiger Proliferationsreiz resultieren. Im Gegensatz dazu kann die Inaktivierung oder der Verlust eines Tumorsuppressorgens durch die fehlende inhibierende Wirkung dieses Gens auf das Wachstum ebenso zu einer ungehemmten Proliferation führen. Die Initiation schafft also die Grundlage zur bevorzugten Vermehrung der initiierten bzw. mutierten Zelle im Rahmen der Promotion.

Die Promotion ist definiert als der Prozess, bei dem die initiierte Zelle klonal expandiert. Solch eine Zellvermehrung kann das Risiko weiterer Mutationen erhöhen, da eine sich in der Zellteilung befindliche Zelle wesentlich anfälliger gegenüber mutagenen Ereignissen ist, als eine ruhende Zelle. Tumorpromotoren, Substanzen oder Wirkstoffe, die eine chronische Zellteilung bewirken, sind also nicht direkt mutagen, können aber indirekt krebsfördernd wirken. Sie werden im allgemeinen als kanzerogen eingestuft. Tumorpromotion kann auf exogenen oder endogenen Einflüssen beruhen. In diesem Sinne kann auch die hormonelle Situation eines Organismus einen Beitrag zur Tumorpromotion leisten (Barrett, 1993; Cohen and Ellwein, 1990).

Die Progression bedeutet die Entwicklung zur Malignität, wobei die Zellen weitere genetische Veränderungen durchmachen müssen. Die Malignität ist gekennzeichnet durch destruktives, infiltratives Wachstum, Verlust der Differenzierung und der Fähigkeit zur Metastasierung. Dieser beschriebene mehrstufige Prozess der Tumorentwicklung würde somit möglicherweise auch den Grund für die lange Latenz bis zur Ausbildung und dem phänotypischen Auftreten von Krebs erklären (Wagener, 1999; Barrett, 1993).

1.1.3 Karzinogene

Karzinogene sind Substanzen oder Faktoren, die beim Menschen, im Tierversuch oder unter bestimmten experimentellen Bedingungen die Inzidenz maligner Tumoren

erhöhen und die Latenz der Karzinogenese verkürzen können (Shelby, 1988). Karzinogene können endogen entstehen oder exogen zugeführt werden. Es gibt initiiierende und promovierende Karzinogene. Initiiierende, oder auch mutagene Karzinogene führen direkt oder indirekt zu Veränderungen der DNA. Zu den initiiierenden, mutagenen Kanzerogenen gehören zum Beispiel Nitrosamine und polyzyklische Kohlenwasserstoffe, die Inhaltsstoffe des Tabakrauches und Rußes, Aflatoxine, Inhaltstoff des Schimmelpilzes, aromatische Amine oder auch ionisierende Strahlung. Promovierende Karzinogene sind Substanzen oder Vorgänge, die auf verschiedene Art und Weise die Zellteilung stimulieren, somit indirekt DNA-schädigend und krebsfördernd wirken können.

1.1.4 Zellteilung

Die Teilung einer Zelle umfasst komplex regulierte, genau koordinierte Vorgänge. Die Zelle durchläuft während einer Zellteilung bestimmte Phasen des Zellzyklus. (Alberts et al., 1986). Die M-Phase bezeichnet die Zellteilungsphase mit der Verteilung der Chromosomen auf zwei Tochterzellen (Mitose = Kernteilung) und Teilung des Zytoplasmas (Zytokinese). Die Phase zwischen zwei Mitosen ist die Interphase. Diese teilt sich in die S-Phase, die G1/G0- und die G2-Phase auf und nimmt normalerweise mindestens 90 % der gesamten Zyklusdauer in Anspruch. Im Verlauf der S-Phase kommt es zur DNA- Replikation. Vor der S-Phase liegt die G1-Phase, in der die DNA-Replikation vorbereitet wird und damit die Biosyntheserate steigt. Nach der S-Phase folgt die G2-Phase, in der die Kondensierung des Chromatins beginnt, damit die Chromosomensätze in der sich anschließenden Mitose an die Tochterzellen weitergegeben können. Normalerweise unterliegt die Zellteilung genauen homöostatischen Kontrollmechanismen. Im neoplastischen Gewebe ist die Homöostase durch Störung dieser Kontrollmechanismen in Richtung Proliferation verschoben.

1.1.5 Zellzykluskontrolle und DNA- Reparatur

Im Verlauf der Zellteilung beim Durchlaufen des Zellzyklus gibt es verschiedene Kontrollpunkte, sog. „Checkpoints“, an denen überprüft wird, ob die vorangegangenen Prozesse ordnungsgemäß abgelaufen sind, um damit die Erhaltung der Integrität des Genoms zu gewährleisten (Royer et al., 1999; Weinert, 1998; Elledge, 1996;). Die

Kontrollpunkte sind dadurch gekennzeichnet, dass die nächste Zellteilungsphase erst dann beginnt, wenn die vorherige Phase vollständig abgeschlossen und fehlerfrei abgelaufen ist, ansonsten wird der Eintritt in die nächste Phase verzögert, um aufgetretene Fehler zu beseitigen.

Ein wichtiger Kontrollpunkt liegt in der G1- Phase vor der Verdopplung des Chromosomensatzes in der S-Phase, bei dem überprüft wird, ob die DNA intakt ist und ob Faktoren für eine fehlerfreie Verdopplung der DNA in ausreichender Konzentration vorhanden sind. Ein zweiter Checkpoint liegt in der G2-Phase, an dem verhindert wird, dass die Mitose vor Beendigung der DNA- Replikation beginnt oder sich eine weitere Verdopplung der DNA anschließt. Außerdem wird in der G2-Phase überprüft, ob Fehler bei der Verdopplung aufgetreten und ob sich das Chromatin sich gebildet hat. Des weiteren gibt es einen Spindel-Checkpoint in der Mitose, an dem die korrekte Anordnung der Chromosomen im Spindelapparat kontrolliert wird.

Die Bedeutsamkeit dieser „Checkpoints“ für die Aufrechterhaltung einer genomischen Integrität und damit einhergehend das Auftreten einer genetischen Instabilität bei Fehlfunktion dieser Kontrollpunkte wurde schon oft untersucht und diskutiert (Shackelford et al., 1999; Hartwell und Kastan, 1994). In einer Arbeit von Zhou et al. (2000) wurde gezeigt, dass Koffein den G2/ M-Phasen Checkpoint im Zellzyklus aufhebt, wodurch Zellen empfindlicher gegenüber ionisierender Strahlung und anderen genotoxischen Schäden werden (Zhou et al., 2000). Auch Saganuma et al. (1999) beschrieben eine erhöhte Empfindlichkeit von Zellen gegenüber DNA- Schäden bei einer Dysregulation des Zellzyklus durch Störungen an den Kontrollpunkten (Saganuma et al., 1999).

Darüber hinaus gibt es zur Aufrechterhaltung der chromosomalen Stabilität verschiedene DNA-Reparatursysteme. Die DNA ist in vivo durch eine außerordentliche Konstanz der Basenzusammensetzung gekennzeichnet. Die Fehlerrate für den Austausch eines einzelnen Basenpaares liegt bei nur einem Austausch pro 10^9 Basenpaare pro Zellgeneration. Dies beruht unter anderem darauf, dass die Komplementarität der Einzelstränge eine äußerst effektive Reparatur von Defekten ermöglicht. Verschiedene DNA-Reparaturmechanismen garantieren die Konstanz der

DNA-Zusammensetzung, so z.B. das Basen- Exisions- Reparatursystem, Mismatch-Reparatursysteme oder die Nukleotid- Exisions- Reparatur. Die Störung dieser Systeme ist mit einer erhöhten Mutationsrate verbunden und kann ein erhöhtes Krebsrisiko zur Folge haben. Beispielsweise sind bei Patienten mit hereditärem nicht- polypösen Kolonkarzinom Gene durch Mutationen inaktiviert, die für Proteine des Mismatch-Reparatursystems kodieren (Peltomäki, 2001). Xeroderma pigmentosa ist ein Krankheitsbild, das seine Ursache in Defekten von Genen des Nukleotid- Exisions-Reparatur-Systems hat und welches durch eine erhöhte Tumorinzidenz gekennzeichnet ist (Hanawalt et al., 1986).

Zusammenfassend können also sowohl Störungen der Kontrollpunkte im Zellzyklus als auch Fehler bei den Reparatursystemen eine genomische Instabilität verursachen. Diese äußert sich am häufigsten in Veränderungen des Chromosomensatzes (Aneuploidie) (Mitelman, 1991), aber auch Translokationen, Deletionen und Insertionen sowie Amplifikationen und Chromosomenaberrationen (Wagener, 1999; Barrett, 1993). Eine genetische Instabilität kann für die maligne Transformation bedeutsame Folgen haben und wird mit Tumorerkrankungen ursächlich in Zusammenhang gebracht.

1.2 Hormone und Krebs

Hormone spielen bei vielen Tumoren von hormonabhängigen Geweben eine bedeutende Rolle (Key, 1995; Preston- Martin et al., 1990; Henderson et al., 1982). Tumoren von hormonabhängigen Geweben machen in den USA bei Männern >35 % und bei Frauen >40 % der neu diagnostizierten Neoplasien aus (Wingo et al., 1995). Daten von experimentellen Tierversuchen und von epidemiologischen und endokrinologischen Studien bei Menschen unterstreichen die Hypothese, dass die endogenen Hormone, welche für das normale Wachstum der Zielorgane sowie für andere physiologische und biologische Aktivitäten des Körpers verantwortlich sind (Adashi,1992), ebenso die Inzidenz von Tumoren erhöhen oder selbst Neoplasien verursachen können (Henderson et al., 1982). Dabei kommt den endogenen steroidal Sexualhormonen eine besondere Rolle zu, weil die vier hormonassoziierten Krebsarten von Brust, Prostata, Endometrium und Ovarien am häufigsten auftreten (Henderson et al., 1982). Vor allem über Brust-, Endometrium- und Ovarialkrebs existieren eine Fülle von epidemiologischen Daten und Untersuchungen, welche einen Zusammenhang zwischen

den Steroidhormonen und der Entstehung und Entwicklung dieser Krebsarten annehmen (Lopez-Otin und Diamandis, 1998; Preston-Martin et al., 1990; Key, 1995).

Überzeugenden Beitrag zu diesen Annahmen leisteten die zahlreichen Untersuchungen der Risikofaktoren für die Entwicklung der hormonabhängigen Tumoren. So weiß man, dass ein junges Alter bei der Menarche sowie das späte Eintreten der Menopause und damit einhergehend eine hohe Anzahl an Zyklen bzw. Ovulationen im Leben einer Frau, das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, deutlich erhöhen. Parallel dazu sinkt die Inzidenzrate von Brustkrebs bei Frauen nach der Menopause. Die beidseitige Ovariectomie bei Frauen unter 40 Jahren, welche das Risiko für Brustkrebs signifikant erniedrigt, gilt sogar als Schutzfaktor. Ebenso ist ein junges Alter bei der ersten Schwangerschaft und die Anzahl von Schwangerschaften für die Risikoabschätzung von Bedeutung (Adami et al., 1995). Schwangerschaften sollen das Risiko für Brust-, Endometrium- und Ovarialkrebs verringern. Im Falle des Brustkrebsrisikos lassen sich die beobachteten Phänomene möglicherweise damit erklären, dass die Proliferation des Brustgewebes während einer Schwangerschaft in Richtung Differenzierung und postmenopausal in Richtung Apoptose und/oder Atrophie verschoben ist. Daraus lässt sich das erniedrigte Risiko ableiten. Des Weiteren gelten die langjährige Einnahme oraler Kontrazeptiva sowie eine Hormonersatztherapie während der Menopause als Risikofaktoren für das Auftreten von Brustkrebs. Ebenso wurden bei Frauen, die über einen längeren Zeitraum eine Hormonersatztherapie machten, vermehrtes Auftreten von Endometriumkrebs festgestellt. Beim Eierstockkrebs dagegen wird die Einnahme oraler Kontrazeptiva als Schutzfaktor angesehen. Diese Beobachtung wird mit der Hypothese erklärt, dass Kontrazeptiva den Eisprung verhindern und dadurch der Proliferationsstimulus zur Reparatur und Regeneration der epithelialen Ovarialzellen, welche bei einem Eisprung zugrunde gehen, wegfällt.

Alle diese Faktoren, welche das Risiko erhöhen, haben eine verlängerte oder erhöhte Östrogenexposition und damit erhöhte Östrogenspiegel im Blut gemeinsam, wohingegen verminderte Östrogenexposition das Risiko verringern (Feigelson and Henderson, 1996; Key, 1999). Gestützt wird dieser Zusammenhang durch epidemiologische Untersuchungen, bei denen der Östrogenspiegel im Blut von Frauen aus verschiedenen Regionen der Welt mit der Häufigkeit von Brustkrebs verglichen

wurde Es konnte festgestellt werden, dass die Brustkrebshäufigkeit sowie das Risiko in Japan, wo die Frauen niedrigere Östrogenspiegel haben als in Amerika, geringer ausfällt (Shimizu et al., 1990).

Jedoch ist man sich trotz dieser umfangreichen Studien, welche die Verwicklung der Hormone in den Prozess der Krebsentstehung nahe legen, über die Mechanismen, über welche die Hormone einen Beitrag zur Karzinogenese leisten, noch weitgehend im Unklaren.

Die karzinogene Wirkung der Sexualhormone wird als Kombination aus epigenetischen und genotoxischen Mechanismen betrachtet (Roy und Liehr, 1999; Liehr, 2000). Zahlreiche Untersuchungen an Tieren konnten eine kanzerogene Wirkung von Östrogenen zeigen. So steigt beispielsweise bei Tieren die Häufigkeit von Endometrium- Karzinomen durch erhöhte Hormonspiegel bzw. die exzessive DES-Gabe (Diethylstilböstrol) (Henderson et al., 1982). Bei Mäusen erhöhte sich die Inzidenz von Brust-, Vaginal- Uterus- und anderer Arten von Krebs durch die Gabe von Östradiol (Highman et.al., 1980; Nagasawa et al., 1980).

Daraus und aus den oben erläuterten Befunden über die Risikoabschätzungen lässt sich für die verschiedenen hormonabhängigen Gewebearten die Erklärungshypothese formulieren, dass hohe Hormonspiegel einen stetigen Proliferationsdruck auf die Zellen ausüben und die Hormone dadurch indirekt DNA-schädigend und krebsfördernd wirken (Barrett, 1993; Cohen and Ellwein, 1990). Der zellproliferationssteigernde Effekt der Hormone kann also im Rahmen des Mehrstufenkonzeptes der Kanzerogenese als Promotionsfaktor angesehen werden.

Darüber hinaus gibt es Beobachtungen, dass beispielsweise Östrogene selbst genetische Veränderungen verursachen können, diese Veränderungen aber nicht auf hormonrezeptorabhängigen Mechanismen beruhen. Kong et al. berichteten über Genemutationen wie z. B. Deletionen und Punktmutationen in chinesischen Hamster Zellen V79, hervorgerufen durch Östradiol (Kong et al., 2000). Andere östrogeninduzierte Genschäden beinhalten direkte DNA-Schäden durch kovalente DNA- Bindung von Östrogenmetaboliten und indirekte Schäden durch Bildung DNA-reaktiver Metabolite (Cavalieri et al., 2000; Roy und Liehr, 1999; Bolton et al., 1998).

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Östrogene chromosomale Veränderungen durch Induktion von Aneuploidie sowie Hyper- und Polyploidie auf Grund von Mikrotubuliveränderungen und Störung der Mitose verursachen und damit eventuell zur malignen Zelltransformation beitragen (Tsutsui et al., 1983; Wheeler et al., 1985; Eckert und Stopper, 1996; Schuler et al., 1998).

Zusammenfassend spielen die Hormone im Prozess der Tumorentstehung somit wohl in doppelter Hinsicht eine Rolle. Zum einen stimulieren sie die Zellproliferation, wirken damit als promovierendes Karzinogen und zum anderen induzieren sie als initiiertes Karzinogen auch direkt genetische Veränderungen (Liehr et al., 1986; Liehr, 2000).

1.3 Hintergrund und Fragestellung dieser Arbeit

Aus der Literatur existieren Hinweise, dass eine erhöhte Zellteilungsaktivität zu einer genetischen Instabilität beiträgt. In einer Arbeit von Herrström et al. (1998) wurde eine erhöhte chromosomale Instabilität in peripheren Lymphozyten atopischer Allergiker beschrieben (Herrström et al., 1998). Als Maß für die chromosomale Instabilität wurde die Frequenz sogenannter Mikrokerne, DNA-haltige Strukturen im Zytoplasma von Zellen, genutzt. Dabei zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen den Plasma IgE - Spiegeln und der Mikrokernfrequenz in den B-Lymphozyten dieser Patienten. Für hohe IgE - Spiegel ist neben dem Klassenwechsel (zu IgE - Antikörpern) eine Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten Voraussetzung. In den T-Lymphozyten konnte keine erhöhte Mikrokernrate gefunden werden. T-Lymphozyten sind an der Induktion des Klassenwechsels, der Differenzierung und der Proliferation der B-Lymphozyten zu einer IgE produzierenden B-Zelle essentiell beteiligt, zeigen jedoch selbst keine erhöhte Zellteilungsrate.

Aus diesen Befunden leitete sich folgende Hypothese ab: Die Induktion einer gesteigerten Zellproliferation ist ursächlich an der Entstehung einer genetischen Instabilität beteiligt.

Ergebnisse einer bereits durchgeführten Studie zu diesem Thema konnten zeigen, dass sich die Mikrokernfrequenz durch Stimulierung der Zellteilung beeinflussen lässt. Bei der humanen Brusttumorzelllinie MCF-7 führte eine hormonrezeptorvermittelte

Proliferationsstimulierung mit dem natürlichen Östrogen 17- β -Östradiol zu einem Anstieg der Zellzahl und parallel dazu zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Mikrokernfrequenz (Fischer et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde nun das Ziel verfolgt, die präsentierten Befunde zu bestätigen, zu erweitern und die oben formulierte Hypothese, eines Zusammenhangs zwischen einer erhöhten Proliferationsrate und einer genetischen Instabilität weiter zu untermauern (Stopper et al., 2003). Es sollte gezeigt werden, dass die hormonrezeptor-abhängige beschleunigte Zellteilungsaktivität per se mutagen sein kann, um damit einen möglichen weiteren Mechanismus in der Pathogenese der hormonabhängigen Tumoren aufzuklären.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine andere Zellart, die östrogenrezeptorpositive Ovarialtumorzelllinie BG-1 eingesetzt. Die BG-1 Zellen wurden ebenfalls mit 17- β -Östradiol zur Proliferation stimuliert und anschließend auf chromosomale Schäden überprüft. Zur Detektion einer genetischen Instabilität kam hierbei ebenso die Bestimmung der Mikrokernfrequenz zum Einsatz.

Geisinger et al. charakterisierten 1989 erstmals die BG-1 (Bowman-Gray) Zelllinie und untersuchten die Zellen hinsichtlich ihrer morphologischen, biochemischen und zytogenetischen Merkmale sowie deren Proliferationseigenschaften (Geisinger et al., 1989). Später wurde diese Zelllinie auf Grund ihrer hohen Östrogensensitivität als Alternativmodell zur Untersuchung von östrogenabhängigem Wachstum beschrieben (Baldwin et al., 1998). In einer weiteren Arbeit wurden diese Zellen als 'Vergleichszelllinie' zu der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 zur Beurteilung östrogenwirksamer Umweltstoffe eingesetzt (Schmitt et al., 2001). Aufgrund dieser Berichte war sichergestellt, dass sich die Zellen mit 17- β -Östradiol zur Steigerung der Zellteilungsaktivität stimulieren lassen.

Eine mögliche Erklärung für den Zusammenhang zwischen der Zellproliferation und Mikrokernentstehung liegt in den Prozessen der Zellzyklusregulation. In Zellen mit genomischen Schäden wird der Ablauf des Zellzyklus für eine Reparatur unterbrochen. In einer Situation mit erhöhter Zellproliferation, beim beschleunigten Durchlaufen des Zellzyklus, ist die Zelle möglicherweise nicht in der Lage, die normalen

Kontrollmechanismen sowie Reparaturprozesse im Zellzyklus aufrechtzuerhalten. Wenn unter solchen Bedingungen eine Zellteilung durchgeführt wird, könnten chromosomale Fragmente in Mikrokern eingeschlossen werden. Deshalb wurden die Untersuchungen mit einer Zellzyklusanalyse ergänzt. Dabei sollte der Einfluss der hormonellen Proliferationsstimulierung auf die prozentuale Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zellzyklusphasen (G1/G0-, S- und G2/M-Phase) und die Zyklusphasendauer analysiert werden.

1.4 Vorstellung der verwendeten Testsysteme

1.4.1 In vitro Mikrokern-Test

Bei Mikrokernen handelt es sich um chromatinhaltige Strukturen im Zytoplasma von Zellen. Zwischen dem Mikrokern und dem Zellkern besteht keine Verbindung. Die Mikrokern weisen ähnliche morphologische Eigenschaften wie Zellkerne auf. Sie werden von einer Doppelmembran mit Lamina und Nukleoporen umgeben, die also strukturell mit der Kernmembran vergleichbar ist (Schiffmann und DeBoni, 1991). Sie stellen somit separierte Teile des Kernmaterials dar. Die Mechanismen, die zur Mikrokernbildung führen sind nur ansatzweise geklärt. Ihre Entstehung kann sowohl auf der Absonderung chromosomaler Fragmente nach Chromosomenmutationen als auch auf Chromosomenfehlverteilungen durch Störung des Spindelapparates während der Mitose beruhen (Schmuck et al., 1988; Tucker und Barrett, 1986). Mikrokern kommen in den Zellen verschiedenster Organismen spontan vor. Ihre Häufigkeit nimmt mit dem Alter des Organismus bzw. des Gewebes zu. Auch ist die Anzahl von Mikrokernen in präkanzerös veränderten und tumorösen Geweben häufig erhöht, was ein Hinweis für eine eventuell erfolgende maligne Entartung mikrokernhaltiger Zellen sein könnte (Benner et al., 1993; Garewal et al., 1993, Rosin, 1993). Somit spielen die Mikrokern möglicherweise selbst eine Rolle im Verlauf der Karzinogenese, indem sie zum Verlust von genomischen Material beitragen, beispielsweise zum Verlust von Genen, die für die Kontrolle und Regulation des Zellzyklus und der DNA-Reparatur wichtig sind.

Der Mikrokerntest (in vivo und in vitro) wurde als Testsystem unter anderem zur Beurteilung der Gentoxizität von Substanzen etabliert. Er ist einfach auszuführen und

leicht reproduzierbar und im Vergleich zu anderen konventionellen Chromosomenaberrationstests weniger aufwendig in der Durchführung und Auswertung (Stopper und Müller, 1997). In dieser Arbeit dient dieser Test zur Detektion einer genetischen Instabilität.

1.4.2 Zellzyklusanalyse

Bei dieser Messung wird in einer wachsenden Zellpopulation jede einzelne Zelle durch ein fluoreszenzaktiviertes Zellanalyse-Gerät optisch vermessen und registriert. Die Zellen sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der nur dann fluoresziert, wenn er an die DNA gebunden ist, so dass die Intensität ihrer Fluoreszenz direkt proportional dem DNA-Gehalt der Zelle ist. Mit Hilfe des Fluoreszenz- Analysators (FACScan) unter Verwendung des Computerprogramms CELLQuest kann somit sehr schnell die relative Fluoreszenz einer großen Zahl von Zellen -und damit ihr relativer DNA-Gehalt- bestimmt werden. Die Zellen mit der geringsten DNA-Menge befinden sich in der G1-Phase, die mit der doppelten Menge in der G2/M-Phase. Die Zellen in der S-Phase liegen mit ihrem DNA-Gehalt zwischen diesen Werten. Aus dem Anteil an Zellen in jedem dieser Bereiche multipliziert mit der Gesamtzyklusdauer, welche aus der Verdopplungszeit der Zellen ermittelt wird, kann die Länge der G1/G0-, S- und G2/M-Phase berechnet werden (Alberts et al., 1986).

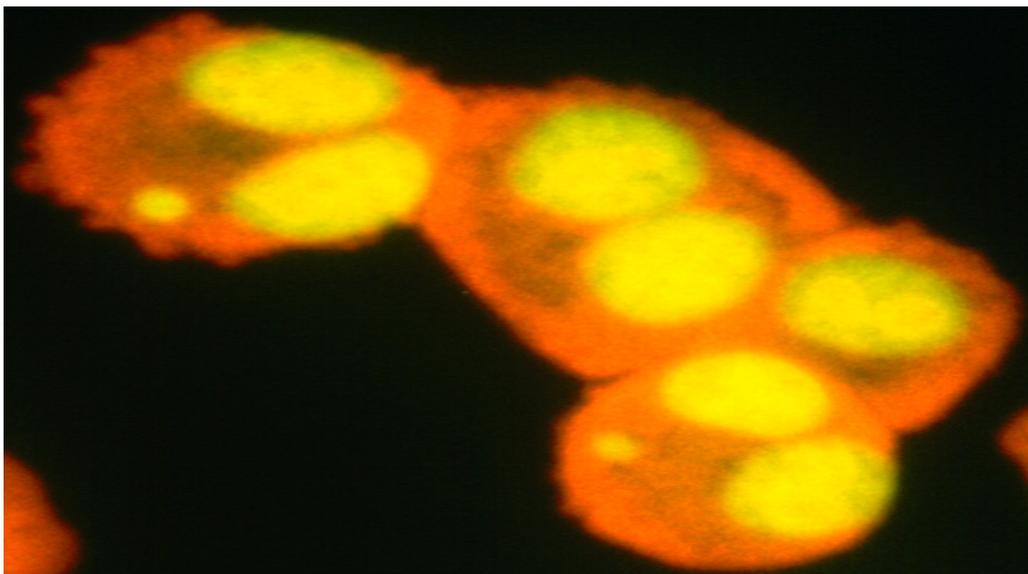


Abbildung 1: Fluoreszenzmikroskopisches Bild doppelkerniger Zellen mit Mikrokern nach Behandlung der Zellen mit Cytochalasin B und anschließender Acridin- Orange-Färbung

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Arbeitsgeräte

2.1.1 Allgemeine Laborchemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle Chemikalien wurden in höchster Qualität kommerziell erworben. Sie stammten von den Firmen Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Biochrom (Berlin) und Aldrich- Chemie (Steinheim). Puffersalze wurden von Merck (Darmstadt), Lösungsmittel von Roth (Karlsruhe) erworben. Spezielle Mediumzusätze wurden von der Firma Hyclone (USA) bezogen.

Allgemeine Verbrauchsmaterialien lieferte die Firma Hartenstein (Würzburg), Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur stammten von Greiner (Nürtingen).

Hochreines Wasser wurde aus der hauseigenen Reinstwasser - Anlage entnommen (Milliporesystem).

Puffer und Lösungen wurden autoklaviert oder durch Millipore Filter steril filtriert.

2.1.2 Verwendete Arbeitsgeräte

Autoklav	Melag Typ 28, Melag, Deutschland
Brutschrank	Typ B 5060 EK-CO ₂ , Heraeus, Deutschland
Coulter Counter	Z1 bzw. Z2, Coulter Electronics, UK
Durchfluss- Zytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Labophot 2A/2, Nikon, Deutschland
Fotomaterial	Polaroidfilme Typ 667, Polaroid, Deutschland
Lichtmikroskop	Zeiss, Deutschland
Netzgeräte	Power Pac 300, Biorad, Deutschland, Power Supply 500/500, Roth, Deutschland
Pipetten	Gilson, Frankreich; Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Labsystem, Finnland
Sterile Werkbank	Gelaire BH 26, Flow Laboratories, Deutschland

Sterilisator	Heraeus, Deutschland
Wasserbad	Kottermann, Deutschland
Zentrifuge	Universal K2S, Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zytozentrifuge	Cytospin 3, Shandon, UK

2.2 Puffer und Lösungen

PBS/ CMF- Puffer: 8,0 g Natriumchlorid
0,2 g Kaliumchlorid
0,575 g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat
0,2 g Kaliumhydrogenphosphat
hochgereinigtes Wasser ad 1000 ml, steril filtrieren
ph- Wert des Puffers: 7,0

EDTA-Lösung: 0,02 %ige Lösung (Sigma)

Mit Hilfe dieser Reagenz wurden die am Boden der Kulturflasche haftenden Zellen mobilisiert. EDTA bindet alle zweiwertigen Kationen, durch welche die Proteine, mit deren Hilfe sich die Zellen am Substrat anheften, stabilisiert werden.

Sörensen-Puffer: Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat: 5,84 g/ 492 ml H₂O
Kaliumhydrogenphosphat: 4,61 g/ 508 ml H₂O (bidest)
ph-Wert des Puffers: 6,8

Der Puffer diente dem Waschen der Objektträger beim Färbvorgang der Mikrokernpräparate.

Acridin-Orange-Lösung: 450 µl 1 %ige Acridin-Orange-Stammlösung (Sigma) auf
71,5 ml Sörensen-Puffer

Mit dieser Fluoreszenzfarbstofflösung wurden die Zellen für die Mikrokernauswertung angefärbt.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Verwendete Zelllinien

2.3.1.1 Humane östrogensensitive Ovarialkarzinomzelllinie BG-1

Die Zelllinie wurde von Dr. S. Müller, National Institute of Environmental Health Sciences, North Carolina (USA), zur Verfügung gestellt und im Labor dieser Arbeitsgruppe etabliert. Die Expression von Östrogenrezeptoren wurden mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden gesichert.

2.3.1.2 Humane östrogeninsensitive Ovarialkarzinomzelllinie UCI-107

Diese Zelllinie wurde ebenfalls von Dr. S. Müller, National Institute of Environmental Health Sciences, USA, zur Verfügung gestellt und im Labor dieser Arbeitsgruppe etabliert.

2.3.2 Kulturmedien

2.3.2.1 Humane östrogensensitive Ovarialkarzinomzelllinie BG-1

Zur Kultivierung der humanen östrogensensitiven Ovarialtumorzelllinie BG-1 wurden 500 ml des phenolrothaltigen Flüssigmediums DMEM/HAM'S F12 (Biochrom, Phenolrotgehalt: 10-15 mg/l) unter Zusatz folgender Substanzen verwendet (Vollmedium):

- 10 % Fötale Rinder-Serum (FBS, Sigma), hitzeinaktiviert 30 min. bei 56°C
- 0,25 mg/ml L- Glutamin (Sigma)
- 40 U/ml Penicillin/ 0,04 mg/ml Streptomycin (Sigma)

Für alle Experimente mit dieser Zelllinie wurden 500 ml des phenolrotfreien Flüssigmediums DMEM/ F12 (Sigma) unter Zusatz folgender Substanzen verwendet (reduziertes Medium):

- 5% Dextran-coated charcoal-treated FBS (DCC-FBS, Hyclone), hitzeinaktiviert 30 min. bei 56°C
- 0,25 mg/ml L- Glutamin (Sigma)
- 40 U/ml Penicillin/ 0,04 mg/ml Streptomycin (Sigma)

2.3.2.2 Humane östrogeninsensitive Ovarialkarzinomzelllinie UCI-107

Zur Kultivierung der humanen östrogeninsensitiven Ovarialtumorzelllinie UCI-107 wurden 500 ml des phenolrotfreien Flüssigmediums RPMI 1640 (Sigma) unter Zusatz folgender Substanzen verwendet (Vollmedium):

- 5% Fetales Rinder-Serum (FBS, Sigma), hitzeinaktiviert 30 min. bei 56° C
- 0,25 mg/ml L- Glutamin (Sigma)
- 40 U/ml Penicillin/ 0,04 mg/ml Streptomycin (Sigma)

Für alle Experimente mit dieser Zelllinie wurden 500 ml des phenolrotfreien Flüssigmediums RPMI 1640 (Sigma) unter Zusatz folgender Substanzen verwendet (reduziertes Medium):

- 5% Dextran-coated charcoal-treated FBS (DCC-FBS, Hyclone), hitzeinaktiviert 30 min. bei 56°C
- 0,25 mg/ml L- Glutamin (Sigma)
- 40 U/ml Penicillin/ 0,04 mg/ml Streptomycin (Sigma)

2.3.3 Kultivierung der Zellen

2.3.3.1 Auftauen der Zellen

Die in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefrorenen Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Vor dem Öffnen musste die Ampulle unter der Sterilbank mit 70%igem Alkohol desinfiziert werden. Der Inhalt wurde in ein mit 8 ml Vollmedium gefülltes Zentrifugenröhrchen pipettiert, um die Trennung der Zellen von dem im Einfriermedium enthaltenen DMSO (Dimethylsulfoxid) durch Zentrifugation (1000 rpm, 5 min., Raumtemperatur) zu vollziehen. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 5 ml Vollmedium aufgenommen. Durch mehrfaches Resuspendieren wurden die Zellen vereinzelt und anschließend in eine Zellkulturflasche (T25, Greiner) überführt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 %igem CO₂-Gehalt. Am nächsten Tag war ein Mediumwechsel durchzuführen, um die durch das Auftauen entstandenen Zelltrümmer zu entfernen.

2.3.3.2 Einfrieren der Zellen

Die adhären wachsenden Zellen wurden zunächst mit PBS/CMF-Puffer gewaschen, mit 0,02 %iger EDTA-Lösung vom Boden abgelöst und in 5 ml frischem Medium aufgenommen (Beschreibung siehe 2.3.3.3). Nach Zentrifugation der Zellsuspension (1000 rpm, 5 min., Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml Vollmedium, das mit 10 % DMSO versetzt war, aufgenommen. Diese Zellsuspension verteilte man in gekühlte Einfrierampullen (1,8 ml). Die Ampullen mussten zunächst für zwei Stunden bei -20°C belassen, anschließend bei -70°C gelagert werden, ehe sie in flüssigem Stickstoff bei -196°C deponiert werden konnten.

2.3.3.3 Erhaltung der Zellkulturen

Kultur der östrogensensitiven Ovarialkarzinomzelllinie BG-1

Die Zellen wurden als adhären wachsende Zellen bei 37°C und 5% CO_2 -Atmosphäre kultiviert und alle 3-4 Tage bzw. 80%iger Konfluenz passagiert.

Beim Passagieren wurde zuerst das Medium abpipettiert und die Zellen mit 3 ml auf 37°C erwärmten PBS/CMF-Puffer zweimalig gewaschen, um abgestorbene Zellen und Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 ml EDTA-Lösung, welche die Zellschicht dünn benetzen sollte, im Brutschrank (37°C und 5% CO_2) inkubiert. Nach 2-3 Minuten wurden die Zellen durch vorsichtiges Beklopfen der Zellkulturflasche vom Boden abgelöst, mit 10 ml Medium resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Das Medium wurde abzentrifugiert (1000 rpm; 5 min.; Raumtemperatur). Danach erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang mit jeweils 30 ml PBS/CMF-Puffer. Dieser Arbeitsschritt diente dem Entfernen der EDTA-Lösung, damit nach der Aussaat ein besseres Anwachsen der Zellen erzielt wurde. Die Zellen wurden in frischem Vollmedium aufgenommen und durch mehrmaliges Aufziehen der Zellsuspension mit einer 5 ml Pipette vereinzelt. Nach Messung der Zellzahl mit dem Coulter Counter wurden die Zellen mit einer Zellzahl von etwa 9×10^5 , was einer Dichte von 6×10^4 Zellen pro ml entspricht, in einem Volumen von 15 ml Vollmedium in Zellkulturflaschen (T 75; Greiner) ausgesät.

Kultur der östrogeninsensitiven Ovarialkarzinomzelllinie UCI-107

Die Zellen wurden als adhären wachsende Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ Atmosphäre kultiviert und alle 3-4 Tage bzw. 80 %iger Konfluenz passagiert.

Beim Passagieren wurden die Zellen zuerst mit 3 ml auf 37°C erwärmten PBS/CMF-Puffer zweimalig gewaschen, um abgestorbene Zellen und Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurde die Zellschicht mit 0,5 ml EDTA-Lösung benetzt. Nach 2-3 Minuten Inkubation im Brutschrank (37°C und 5 % CO₂) wurden die Zellen durch vorsichtiges Beklopfen der Zellkulturflasche vom Boden abgelöst, mit frischem Medium resuspendiert und durch mehrmaliges Aufziehen der Zellsuspension mit einer 5 ml Pipette vereinzelt. Nach Messung der Zellzahl mit dem Coulter Counter wurden die Zellen mit einer Zellzahl von $7,5 \times 10^5$, was einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro ml entspricht, in einem Volumen von 15 ml Vollmedium in Zellkulturflaschen (T 75; Greiner) ausgesät.

2.4 Ermittlung der Proliferationskinetik der Zelllinien

Zur Ermittlung des Wachstumverhaltens der Zellen und Bestimmung ihrer Generationszeiten wurden die Zellen aus einer zu 80 % konfluenten Kulturflasche, wie unter 2.3.3.3 beschrieben, abgelöst und mit einer Zellzahl von jeweils 5×10^5 Zellen pro Zellkulturflasche in einem Volumen von 5 ml Vollmedium in zehn Zellkulturflaschen (T25, Greiner) ausgesät und im Brutschrank (37°C und 5 % CO₂) kultiviert. Täglich wurde die Zellzahl einer Kulturflasche mit dem Coulter Counter (3 Messungen pro Probe) gemessen. Somit ergab sich eine Wachstumskurve, mit der die Verdopplungszeiten bestimmt werden konnten. Während der 10-tägigen Wachstumszeit fand nach 96 h ein Mediumwechsel statt.

2.5 Optimierung des Phenolrot-Gehaltes im Medium der BG-1 Zellen

Zur Optimierung der Kulturbedingungen für die geplanten Proliferationsexperimente wurden zu Beginn der Arbeit einige Vorversuche mit der BG-1 Zelllinie durchgeführt. Dabei sollte die Zellproliferation in Abhängigkeit von der Mediumzusammensetzung untersucht werden. Aus der Literatur gab es Hinweise dafür, dass bestimmte Bestandteile des Mediums für das Wachstum östrogenrezeptorsensitiver Zellen von Bedeutung sind (Pavlik et al., 1991). Besonderer Beachtung kam dabei dem Zusatzstoff

Phenolrot zu, einem Indikator, der den Wechsel des pH-Wertes eines Mediums vom neutralen in den sauren Bereich durch Farbumschlag von rot nach gelb anzeigt. Dieser Indikator zeigt Affinität zum Östrogenrezeptor und daraus resultierend östrogene Wirkung. Dies macht sich bei östrogensensitiven Zellen durch Stimulation zur Proliferation und verbessertes Wachstum bemerkbar (Berthois et al., 1986).

Darüber hinaus wurde das fetale Rinderserum (FBS), gegen DCC-FBS (Dextran-coated charcoal-treated FBS) ausgetauscht. FBS enthält organische Stoffe, Wachstumsfaktoren und Steroide, die wachstumsfördernde Wirkung aufweisen. Beim DCC-FBS sind diese Stoffe auf minimale Konzentrationen reduziert.

Bei der experimentellen Durchführung wurde das Wachstum der Zellen in fünf verschiedenen Versuchsansätzen mit jeweils fünf verschiedenen Medien beobachtet. Dabei wurde bei der Medienzusammensetzung das Mischungsverhältnis zwischen phenolrothaltigem und phenolrotfreiem Mediumanteil variiert. Neben 100 % phenolrotfreiem und 100 % phenolrothaltigem Medium (Phenolrotgehalt: 10-15 mg/l) kam ein Medium mit dem Mischungsverhältnis von 90 % phenolrotfrei/ 10 % phenolrothaltig, eines im Verhältnis von 75 % phenolrotfrei/ 25 % phenolrothaltig sowie ein Medium im Verhältnis von 50 % phenolrotfrei/ 50 % phenolrothaltig zum Einsatz. Allen Medienansätzen wurde DCC-FBS zugesetzt. Nach der Aussaat der Zellen in den verschiedenen Mischungen erfolgte nach 142 bzw. 167 Stunden die Ablösung und die Zellzahlmessung mit dem Coulter Counter. Die Wachstumszeit betrug 142 Stunden bei Verwendung des 100 % phenolrothaltigen und 100 % phenolrotfreien Mediums bzw. 167 Stunden bei den drei weiteren Mischungen.

Um eine Aussage darüber machen zu können, wie die Wirkung des Phenolrots die Proliferationsstimulation von Östradiol beeinflusst, wurde ein Teil der Zellen zusätzlich mit 17- β Östradiol (200 pM) behandelt. Die Testsubstanzzugabe wurde mit einem Mediumwechsel nach 24 Stunden durchgeführt und nach weiteren 72 Stunden wiederholt, um damit eventuellen metabolischen Umwandlungen von Östradiol entgegenzuwirken und eine gleichmäßige Konzentration der Testsubstanzen aufrechtzuerhalten.

2.6 Bestimmung der Zellüberlebensrate mit der Ethidiumbromid/ Fluoresceindiacetat Methode

2.6.1 Testprinzip

Zur Bestimmung der Überlebensrate von Zellen nach der Beanspruchung durch den Ablösevorgang im allgemeinen oder nach der Behandlung mit den Testsubstanzen wurde die Methode der Vitalitätsfärbung nach Strauss angewendet (Strauss,1991).

Das farblose Fluoresceindiacetat wird in die intakte Zelle aufgenommen und dort durch aktive Esterasen zu dem im Fluoreszenzmikroskop gut sichtbaren grün leuchtenden Fluorescein gespalten. In abgestorbenen Zellen sind diese Esterasen nicht mehr aktiv. Die Membranintegrität wird durch Ethidiumbromid überprüft. Dieser Farbstoff kann nur bei defekter Zellmembran in die Zelle gelangen und sich an die DNA binden. Somit können abgestorbene oder stark beschädigte Zellen mit Ethidiumbromid rot leuchtend angefärbt werden.

2.6.2 Durchführung

Reagenzien: Färbelösung: 30 µl Ethidiumbromid (1 mg/ ml bidest. H₂O, Sigma)
15 µl Fluoresceindiacetat (5mg/ ml Aceton)
2.5 ml PBS/ CMF-Puffer (siehe 2.2)

Nach Ablösung der Zellen wurde ein Alliquot der Zellsuspension (35 µl) mit der Färbelösung (15µl) auf einem Objektträger gemischt, abgedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

2.6.3 Auswertung

Es wurden 200 intakte Zellen (grüne Fluoreszenz des Fluoresceins) ausgezählt und der Anteil Ethidiumbromid positiver Zellen (rote Fluoreszenz des DNA-gebundenen Ethidiumbromids) bestimmt. Die Überlebensrate entspricht dem Anteil lebender Zellen an der Gesamtzahl und wurde indirekt durch Angabe der toten Zellen in Prozent dargestellt.

2.7 Proliferationsexperimente

2.7.1 Humane östrogensensitive Ovarialkarzinomzelllinie BG-1

Zur Steigerung sowie Inhibierung der Zellproliferation wurden Wachstumsexperimente durchgeführt, bei denen die Zellen mit verschiedenen Testsubstanzen behandelt wurden. Die Zellen der laufenden Kultur wurden zunächst abgelöst, nach Bestimmung der Zellzahl mit einer Dichte von 5 bis 7×10^4 Zellen pro ml in einem Volumen von 5 ml reduziertem, phenolrotfreiem Medium in Zellkulturflaschen (T25) ausgesät und bei 37°C und 5 % CO₂ Atmosphäre inkubiert. Nach 20 bis 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel sowie die Zugabe der Testsubstanzen gelöst in Ethanol, wobei die Endkonzentration an Ethanol 0,1% nicht überschritt. Nach weiteren 72 Stunden Inkubation musste erneut ein Mediumwechsel mit Zugabe der Testsubstanzen durchgeführt werden. Dies sollte einer eventuellen metabolischen Umwandlungen der Testsubstanzen entgegenwirken und eine gleichmäßige Testsubstanzenkonzentration gewährleisten. 72 Stunden später war der Ablösevorgang der Zellen (siehe 2.3.3.3) durchzuführen. Die Zellzahl der abgelösten, gut vereinzelt Zellen wurde mit dem Coulter Counter bestimmt, wobei jede Probe dreimal gemessen wurde. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert dargestellt. Die Wachstumsdauer betrug insgesamt 164 bis 168 Stunden. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

2.7.2 Humane östrogeninsensitive Ovarialkarzinomzelllinie UCI-107

Zur Durchführung der Wachstumsversuche mit dieser Zelllinie wurden die Zellen mit einer Zellzahl von 5×10^4 pro ml in einem Volumen von 5 ml reduziertem Medium in Zellkulturflaschen (T25) ausgesät. Nach 14 Stunden Inkubation (37°C und 5 % CO₂) wurde das Medium gewechselt und frisches reduziertes Medium mit den Testsubstanzen, gelöst in Ethanol, zugegeben. Die Endkonzentration an Ethanol überschritt nicht 0,1 %. Nach weiteren 72 Stunden erfolgte erneut ein Mediumwechsel mit Zugabe der Testsubstanzen. Der Ablösevorgang und die Zellzahlbestimmung mit dem Coulter Counter war nach weiteren 10 Stunden durchzuführen. Jede Probe wurde dreimal gemessen und die Ergebnisse als Mittelwert dargestellt. Die Wachstumsdauer betrug bei diesen Zellen insgesamt etwa 96 Stunden. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

2.8 Testsubstanzen

Als Testsubstanzen wurden eingesetzt:

- 17- β Östradiol (Sigma) wurde zur Stimulation der Zellproliferation verwendet. 17- β Östradiol ist ein Steroidhormon, welches dem endogenem Sexualhormon Östrogen entspricht und in dieser Form auch physiologisch im Körper vorkommt (Beato, M., 1989). 17- β Östradiol wurde in Konzentrationen von 0,1 pM bis 10 nM eingesetzt. Die physiologische Konzentration im Körper (Plasmaspiegel) einer gebärfähigen Frau beträgt zwischen 100 pM und 1 nM. Bei allen Experimenten, bei denen nur eine Konzentration von Östradiol zum Einsatz kam, wurde eine Konzentration von 100 pM gewählt.
- 4-Hydroxytamoxifen (Sigma) wurde als spezifischer Östrogenrezeptor-antagonist eingesetzt. Es ist ein Metabolit des Antiöstrogens Tamoxifen (Kupfer et al., 1994; Custodio et al., 1994). In dieser Arbeit wurden Konzentrationen im Bereich von 0,1 nM bis 1 nM gewählt.
- Mitomycin C (Sigma) ist ein genotoxischer, Stoff, für den eine Mikrokerninduktion bekannt ist. Die Substanz wurde in einer Konzentration von 20 μ g/ ml eingesetzt. Die mit Mitomycin C behandelten Zellen wurden als Positivkontrolle eingesetzt.

17- β Östradiol (E) und 4-Hydroxytamoxifen (OHT) waren in Ethanol gelöst, wobei die Endkonzentration an Ethanol 0,1 % nicht überschritt. Mitomycin C (MMC) war in PBS/ CMF-Puffer gelöst.

Neben einer unbehandelten Kontrolle (K) gab es bei jedem Experiment eine mit Lösungsmittel behandelte Probe (LK). Als Lösungsmittel wurde Ethanol in einer Konzentration von 0,1 % verwendet. Dies entsprach der Ethanolkonzentration der gelösten Testsubstanzen.

2.9 Mikrokerntest

2.9.1 Eigenschaften

Bei diesem Test wird die Induktion von Mikrokerneln zum Nachweis einer DNA-Schädigung genutzt. Mikrokerne stellen separierte Teile des Kernmaterials dar, die eine eigenständige Kernhülle besitzen (Schiffmann und DeBoni, 1991), in der Mitose in Erscheinung treten können und nach erfolgter Zytokinese vom Zellkern getrennt vorliegen. Sie können durch mikroskopische Auswertung quantifiziert werden.

2.9.2 Durchführung

a. Vorbereitung der Objektträger

Zunächst wurden die Objektträger 30 Minuten in deionisiertem hochgereinigtem Wasser (Millipore) in einem Schüttelbad gewaschen und anschließend für 30 Minuten in ein Ethanol-Bad gestellt (absolutes Ethanol). Nach dieser Behandlung ließ man die Objektträger an der Luft trocknen. Die Reinigung gewährleistete ein sicheres Haften der aufgetragenen Zellen sowie weniger Artefakte und Verschmutzungen auf den Objektträgern und somit eine bessere Auswertung der Präparate.

b. Herstellung der Präparate

Unter Verwendung des Cytospin-Gerätes wurden die Zellen gleich im Anschluß an die Proliferationsexperimente, d. h. nach der Behandlung mit den Testsubstanzen (siehe Abschnitt 2.7) auf Objektträger zentrifugiert. Die gereinigten Objektträger wurden mit einem Lochfilter (Shandon Filter Cards, Pittsburgh, USA) und einem Tropfentrichter in die dafür vorgesehenen Einsätze (Shandon Cytoclip, Pittsburgh, USA) eingespannt. Nach der Ablösung der Zellen und Messung der Zellzahl wurden je nach Zelldichte 50 bis 500 µl der gut vereinzelt Zellsuspension in die Tropfentrichter pipettiert. Nach der Zentrifugation (1000 rpm; 5 min., Raumtemperatur) mussten die aufgetragenen Zellen für mindestens zwei Stunden in eiskaltem Methanol (-20°C) fixiert werden.

c. Anfärbung der Präparate

Reagenzien: Sörensen-Puffer: siehe 2.2

Acridin- Orange- Lösung: siehe 2.2

Die Färbung der Mikrokernelpräparate erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acridin-

Orange für etwa zwei bis drei Minuten. Anschließend wurden die Objektträger zweimal fünf Minuten in einem Sörensen - Puffer-Bad gewaschen. Danach wurde auf die mit einem Tropfen Sörensen-Puffer bedeckten Zellen ein Deckglas platziert.

2.9.3 Auswertung

Die Auswertung war mit dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 500-fachen Vergrößerung durchzuführen. Auf Grund der Definition wurden bei der mikroskopischen Zählung solche Formationen als Mikrokerne gewertet, die eine runde oder ovale, kernähnliche Struktur und eine Größe von bis zu $\frac{1}{4}$ des Zellkerns aufwiesen, deutlich getrennt von diesem vorlagen und eine dem Kern vergleichbare Färbung zeigten. Es wurden pro Versuchsansatz und pro Testsubstanz auf jedem von drei Objektträgern 1000 Zellen ausgewertet. Die Anzahl an mikrokernhaltigen Zellen wurde als Mittelwert der drei Zählungen angegeben. Die Objektträger wurden codiert analysiert.

2.10 Inhibierung der Zytokinese

2.10.1 Testprinzip

Die Zugabe von Cytochalasin B führt zu doppelkernigen Zellen. Cytochalasin B hemmt die Zytokinese, wodurch bei einer Zellteilung doppelkernige Zellen entstehen. Durch Bestimmung des prozentualen Verhältnisses von einkernigen zu doppelkernigen Zellen erhält man ein Maß für die Proliferationsrate. Sollte eine Testsubstanz den Zellzyklus beschleunigen oder die Teilungshäufigkeit erhöhen, so ist dies aus einem höheren Anteil an doppelkernigen Zellen zu erkennen. Mikrokerne werden nur in doppelkernigen Zellen gezählt. Diese haben sich während der Inkubation mit den Testsubstanzen genau einmal geteilt.

2.10.2 Durchführung

Bei diesen Experimenten wurden die Zellen in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen in einem Volumen von 5 ml reduziertem Medium in Zellkulturflaschen (T25) ausgesät und inkubiert (37°C und 5% CO₂ Gehalt). Nach acht Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, sowie die Zugabe der Testsubstanzen in Kombination mit Cytochalasin B (2 µg/ml Sigma), gelöst in Ethanol, wobei die Lösungsmittelkonzentration 0,1% nicht überschritt.

Als Testsubstanzen wurden 17- β Östradiol (100 pM), Lösungsmittel (0,1 % Ethanol) und Mitomycin C (2 μ g/ ml) eingesetzt. Nach weiteren 40 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit PBS/ CMF-Puffer gewaschen und mit 0,02 %iger EDTA-Lösung abgelöst (siehe Abschnitt 2.3.3.3). Durch Messung der Zellzahl wurde überprüft, dass diese nicht gestiegen war, um sicherzustellen, dass Cytochalasin B die Zellteilung verhindert hatte. Wie in Abschnitt 2.9 genau beschrieben wurden die Zellen mittels der Zytocentrifuge auf gereinigte Objektträger gebracht und mindestens zwei Stunden bei -20°C in Methanol fixiert, bevor sie zur mikroskopischen Auswertung mit einer Acridin- Orange- Färbelösung visualisiert werden konnten.

2.10.3 Auswertung

Die Präparate waren bei 500-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop auszuwerten. Es wurden pro Versuchsansatz und pro Testsubstanz auf drei Objektträgern jeweils 1000 Zellen gezählt. Davon musste das Verhältnis aus einkernigen zu doppelkernigen Zellen bestimmt werden. Es wurden außerdem die mikrokernhaltigen Zellen pro 1000 doppelkernige Zellen gezählt.

2.11 Zellzyklusanalyse

2.11.1 Testprinzip

Bei dieser Analyse kann mit Hilfe eines FACScans (fluoreszenzaktiviertes Zellanalyse-Gerät) der prozentuale Anteil der sich im Wachstum befindlichen Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen (G1/G0-, S- und G2/M-Phase) ermittelt werden. Die Ermittlung der Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen erfolgt durch Multiplikation der Gesamtdauer eines Zellzyklus mit den gemessenen prozentualen Phasenanteile. Somit kann der Einfluss der Wachstumsstimulation durch 17- β Östradiol auf die Zellzyklusphasen analysiert werden.

2.11.2 Durchführung

Die Durchführung dieses Experimentes erfolgte nur mit der Ovarialtumorzelllinie BG-1. Der Versuch lief über einen Zeitraum von mindestens 312 Stunden. Die BG-1 Zellen wurden mit einer Zellzahl von $0,9 \times 10^5$ Zellen/ ml in einem Volumen von 5 ml phenolrotfreiem, reduziertem Medium ausgesät und über einen Zeitraum von 312

Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert (37° C und 5% CO₂). Als Testsubstanzen kamen 17-β Östradiol (100 pM) und Lösungsmittel (0,1 % Ethanol) zum Einsatz. Der erste Mediumwechsel mit Zugabe der Testsubstanzen erfolgte nach 24 Stunden und wiederholte sich im weiteren Verlauf alle 72 Stunden. Damit wurde eine gleichbleibende Konzentration der Testsubstanzen im Medium gewährleistet und einer eventuellen metabolischen Umwandlungen der Testsubstanzen entgegengewirkt. Zu den angezeigten Zeiten fand nach der Ablösung der Zellen die Zellzahlmessung mit dem Coulter Counter (3 Messungen pro Probe), die Anfertigung von Mikrokernpräparaten mit Hilfe des Cytospin-Gerätes sowie anschließend die Präparation der Zellen für die Zellzyklusanalyse statt:

Reagenzien: PBS/CMF-Puffer: siehe 2.2

Ethanol-Lösung: 70 % in bidest. H₂O verdünnt

RNAse- Lösung: Typ1-A (Sigma) 50 Units/ ml PBS/CMF-Puffer

Propidiumiodid- Lösung: 50 µl/ ml PBS/CMF-Puffer (Sigma)

Im Anschluss an die Mikrokernpräparation erfolgte mit dem Rest der Zellsuspension nach Abzentrifugation des Mediums (1000 rpm, 5 min., Raumtemperatur) ein Waschvorgang mit PBS/CMF-Puffer statt. Dieser wurde ebenfalls abzentrifugiert. Die Zellen mussten nun für eine Stunde in 1 ml 70 %igem Ethanol bei 4°C fixiert werden. Es folgte erneutes Waschen mit PBS/ CMF-Puffer. Daraufhin wurde das Zellpellet mit 0,5 ml RNAse- Lösung und 0,5 ml Propidiumiodid- Lösung versetzt und unter Lichtausschluss eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. RNAse ist eine Nuclease, welche spezifisch die Nukleinsäuren der RNA hydrolysiert. Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an die DNA oder RNA bindet. Die Proben mussten dann bei 4°C gelagert werden, bevor sie mit dem FACScan ausgewertet wurden.

2.11.3 Auswertung

Bei der computergestützten Auswertung unter Verwendung der Software CELLQuest (BD, Heidelberg) wird jede einzelne Zelle der wachsenden Zellpopulationen durch das fluoreszenzaktivierte Zellanalyse-Gerät optisch vermessen und registriert. Dazu stimuliert ein Laser die mit Propidiumiodid gefärbten Zellen mit einer definierten Wellenlänge zur Emission von Strahlung. Die Intensität dieser Strahlung wird detektiert. Die gemessene Stärke des Fluoreszenzfarbstoffsignals stellt ein Maß für den

DNA-Gehalt der Zellen dar. Der Computer ordnet die Zellen anhand dieser Messwerte bestimmten Bereichen zu, welche vorher für die Zellzyklusphasen (G1/G0-, S- und G2/M-Phase) definiert wurden. Somit erhält man eine prozentuale Zuordnung der Zellpopulation zu den einzelnen Zellzyklusphasen.

Die Dauer der G1/G0-, S- und G2/M-Phase errechnete sich aus dem prozentualen Anteil an Zellen in der jeweiligen Phase multipliziert mit der Länge eines gesamten Zellzyklus. Die Zellzykluslänge wurde aus der Wachstumskurve ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche

3.1.1 Proliferationskinetik in Vollmedium

Mit diesem Experiment sollte das Wachstumsverhalten der Zellen beider Zelllinien bei Inkubation in Vollmedium analysiert werden. Die Zellen wurden mit jeweils der gleichen Zelldichte in zehn Zellkulturflaschen (T25) in Vollmedium ausgesät. Täglich wurde die Zellzahl ein- oder zweimal bestimmt, um eine Wachstumskurve erstellen zu können. Aus dieser ließ sich die Verdopplungszeit der Zellen ermitteln.

Darüber hinaus dienten diese Versuche der Optimierung der sich anschließenden Proliferationsexperimente, weil anhand der ermittelten Daten die Zeitpunkte für die Testsubstanzenzugabe, die Medienwechsel sowie für die Ernte der Zellen (Ablösung der Zellen, Zellzahlbestimmung und Mikrokernpräparation) festgelegt wurden.

3.1.1.1 BG-1 Zellen

Die östrogenrezeptorpositiven BG-1 Zellen zeigten nach der Aussaat von 5×10^4 Zellen pro ml in einem Volumen von 5 ml phenolrothaltigem Vollmedium einen exponentiellen Proliferationsanstieg nach einer Zeit von etwa 96 Stunden (Abb. 2). Die exponentielle Wachstumsphase dauerte bis zu einem Zeitpunkt von etwa 168 Stunden nach Aussaat der Zellen an. Danach hatten sie die Plateauphase erreicht, was lichtmikroskopisch beurteilt, einer kompletten Konfluenz der auf dem Boden der Zellkulturflasche haftenden Zellen entsprach. Ließ man die Zellen weiter wachsen, kam es nach einer etwa 15- bis 20-stündigen Zeit in der Plateauphase nochmals zu einem exponentiellen Wachstumsanstieg. Im Lichtmikroskop zeigte sich dieses Phänomen durch dicht gelagerte übereinanderwachsende Zellnester. In der dargestellten Wachstumskurve ließ sich in der Zeit zwischen 96 und 170 Stunden nach Aussaat der Zellen eine Verdopplungszeit von etwa 30 bis 40 Stunden ermitteln.

3.1.1.2 UCI-107 Zellen

Aus der Wachstumskurve der östrogenrezeptornegativen UCI-107 Zelllinie ließ sich ein exponentielles Wachstum in der Zeit zwischen 48 und 100 Stunden nach der Aussaat der Zellen mit einer Dichte von 4×10^4 Zellen pro ml in einem Volumen von 5 ml Vollmedium ermitteln (Abb. 3). Danach wurde die Plateauphase erreicht. Diese dauerte bis etwa 168 Stunden nach Aussaat. Ließ man die Zellen noch weiter wachsen, sank bei diesen Zellen nach der Plateauphase die Zellzahl. Lichtmikroskopisch konnte dies durch viele abgelöste und abgerundete, im Medium schwimmende Zellen beobachtet werden. Die Verdopplungszeit der UCI-107 Zellen während der logarithmischen (exponentiellen) Wachstumsphase betrug etwa 15 bis 20 Stunden. Die kürzere Verdopplungszeit gegenüber den BG-1 Zellen zeigt sich in der Graphik durch einen steileren Kurvenverlauf.

Anhand dieser Ergebnisse wurde für die anschließenden Proliferationsexperimente der Zeitpunkt der Ernte für die BG-1 Zellen auf etwa 164 bis 168 Stunden, für die UCI-107 Zellen auf 96 bis 100 Stunden nach der Aussaat, noch vor Erreichen der Plateauphase, festgelegt. Die Zugabe der Testsubstanzen und die Durchführung des ersten Mediumwechsels konnte für beide Zelllinien auf 20 bis 24 Stunden nach der Aussaat der Zellen festgelegt werden. Diese Zeit brauchten die Zellen, um sich am Boden der Zellkulturflasche abzusetzen und anzuwachsen. Der zweite Mediumwechsel mit Zugabe der Testsubstanzen musste etwa nach weiteren 72 Stunden zu Beginn bzw. während der exponentiellen Wachstumsphase erfolgen. Dadurch konnte eine gleichbleibende Konzentration der Testsubstanzen im Medium gewährleistet und einer eventuellen metabolischen Umwandlung der Testsubstanzen entgegengewirkt werden.

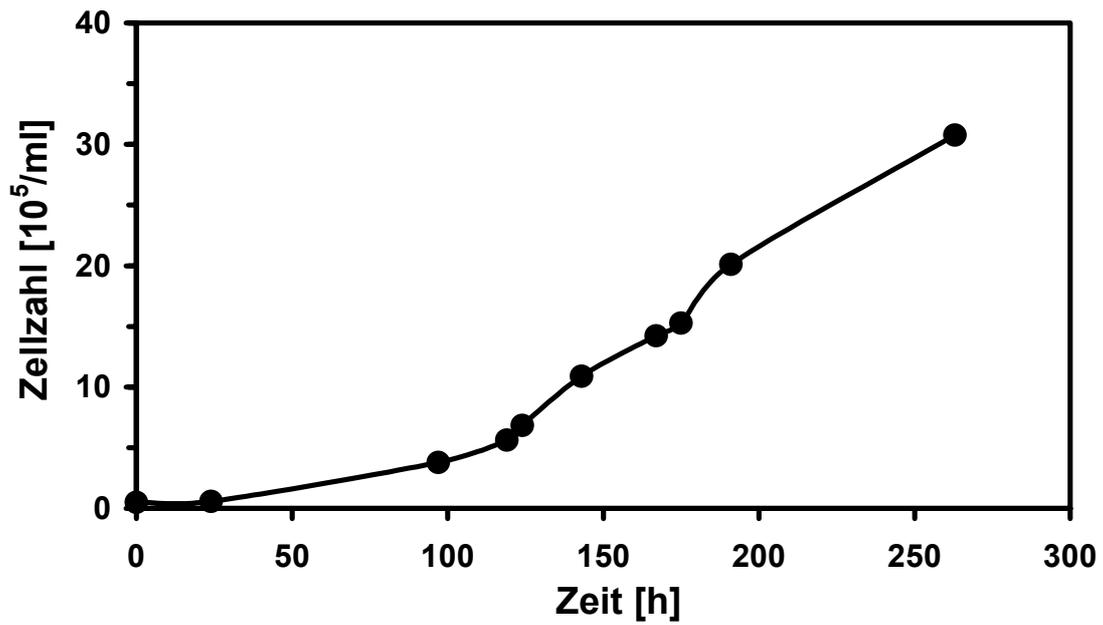


Abbildung 2: Zellwachstum der östrogenrezeptorpositiven Ovarialtumorzelllinie BG-1 in phenolrot-haltigem Vollmedium

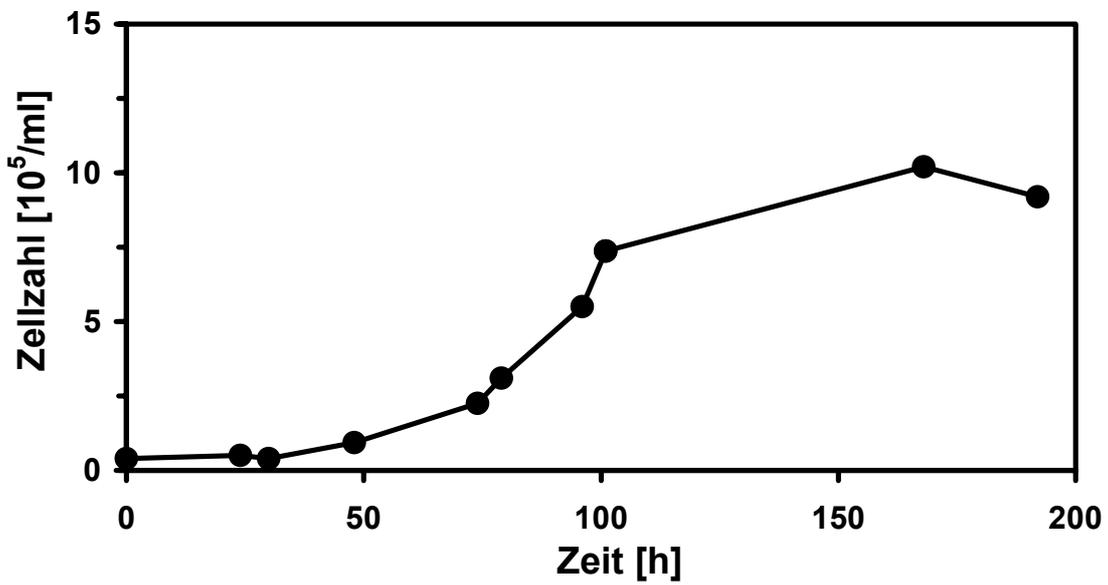


Abbildung 3: Zellwachstum der östrogenrezeptornegativen Ovarialtumorzelllinie UCI-107 in Vollmedium

3.1.2 Optimierung des Phenolrot-Gehaltes im Medium der BG- 1 Zellen

Zur Optimierung der Kulturbedingungen für die geplanten Proliferationsexperimente wurden Vorversuche mit der BG-1 Zelllinie durchgeführt, bei denen die Zellproliferation in Abhängigkeit vom Gehalt an Phenolrot im Medium untersucht wurde.

Neben dem phenolrothaltigen Kulturmedium mit einem Phenolrotgehalt von etwa 10-15 mg/l und einem phenolrotfreiem Medium, kam ein Medium mit dem Mischungsverhältnis von 90 % phenolrotfrei/ 10 % phenolrothaltig, eines im Verhältnis von 75 % phenolrotfrei/ 25 % phenolrothaltig sowie ein Medium im Verhältnis von 50 % phenolrotfrei/ 50 % phenolrothaltig zum Einsatz. Nach der Aussaat der Zellen in den Medien mit den o.g. Mischungsverhältnissen erfolgte nach 142 bzw. 167 Stunden die Ablösung und die Zellzahlmessung mit dem Coulter Counter. Die Wachstumszeit betrug 142 Stunden bei dem phenolrothaltigen und 100% phenolrotfreien Medium bzw. 167 Stunden bei den drei weiteren Mischungen.

Um eine Aussage darüber machen zu können, wie Phenolrot die Proliferationsstimulation durch Östradiol beeinflusst, wurde pro Mediumansatz ein Teil der Zellen zusätzlich mit 200 pM Östradiol behandelt. Aus dem Verhältnis der Zellzahlen der Östradiol stimulierten Zellen zur Zellzahl der unbehandelten wurden die Wachstumsfaktoren bestimmt.

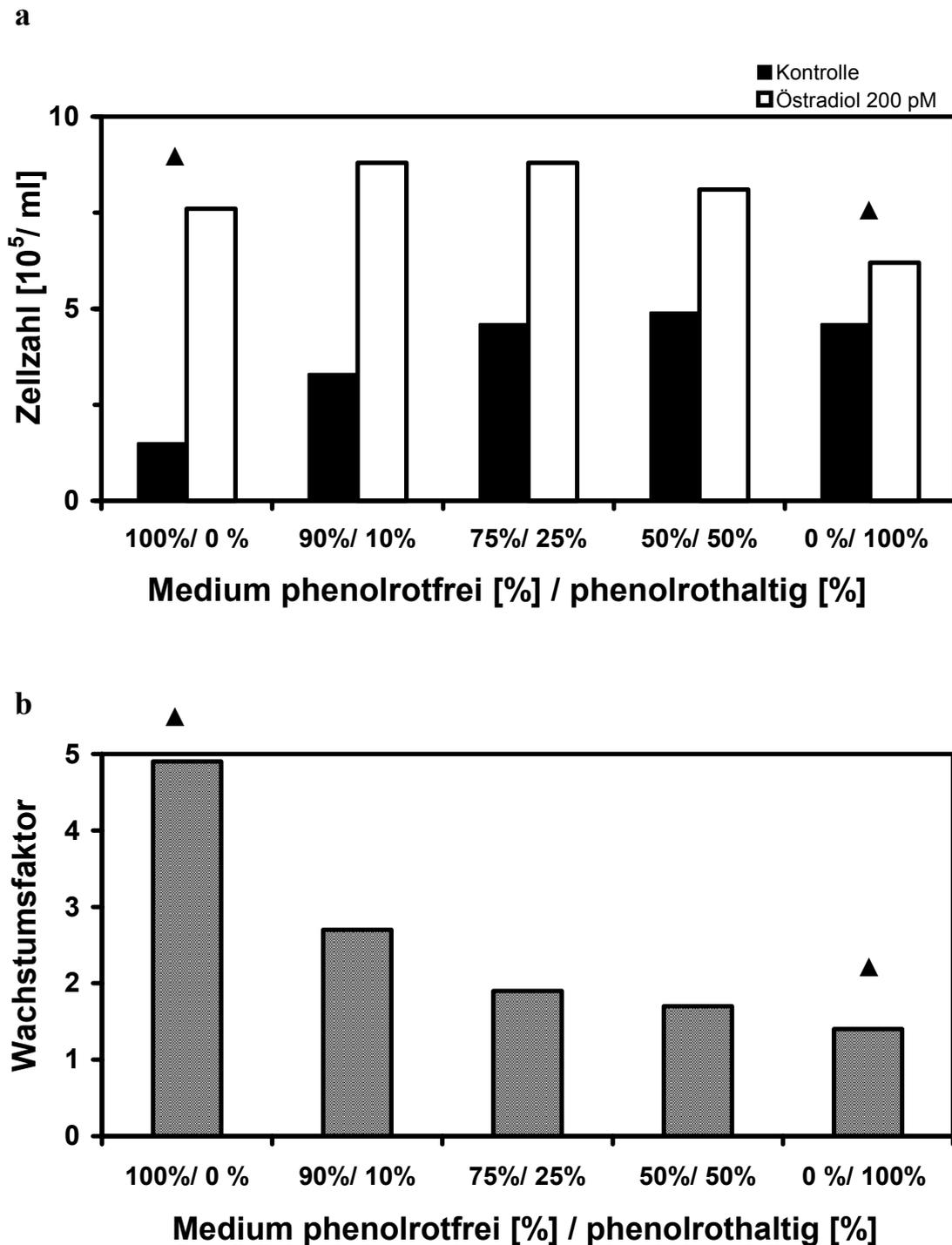


Abbildung 4: Absolute Zellzahl (a) und Wachstumsfaktor (relative Proliferation) (b) der östrogenrezeptorpositiven Ovarialtumorzelllinie BG-1 bei Kultivierung der Zellen in Medien mit unterschiedlichem Mischungsverhältnis von phenolrotfreiem und phenolrothaltigem Anteil. Pro Mediumansatz wurde ein Teil der Zellen mit 200 pM 17- β Östradiol behandelt, der andere Teil ergab die unbehandelte Kontrolle. Nach 140 (\blacktriangle) bzw. 167 Stunden Wachstums- und Inkubationszeit erfolgte die Zellzahlmessung mit dem Coulter Counter, woraus die Wachstumsfaktoren ermittelt wurden. **a)** Zellzahlen der unbehandelten und der östradiolstimulierten Zellen nach Inkubation der Zellen in den verschiedenen Medienmischungen; **b)** Der Wachstumsfaktor ergibt sich aus dem Verhältnis der Zellzahl der östradiolstimulierten Zellen zur Zellzahl der unbehandelten Zellen. \blacktriangle : Wachstumszeit betrug 140 Stunden (siehe Anhang 70 Tab. 2)

Die BG-1 Zellen zeigten in ihrem Wachstum eine deutliche Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis zwischen phenolrotfreiem und phenolrothaltigem Medium (Abb.4).

Die Proliferation der unbehandelten Zellen erhöhte sich mit Zunahme des Phenolrotgehaltes im Medium. Mit steigendem Anteil an Phenolrot stieg die maximal erreichte Zellzahl der unbehandelten BG-1 Zellen während der 142- bzw. 167-stündigen Wachstumszeit. Die maximal erreichte Zellzahl der östradiolstimulierten Zellen sank dagegen mit zunehmenden Phenolrotgehalt (Abb.4 a).

Mit abnehmenden Anteil an Phenolrot im Medium konnten die BG-1 Zellen durch Östradiol jedoch zu einer besseren Proliferationssteigerung stimuliert werden. Unter Verwendung des phenolrotfreien Mediums wurde der größte Wachstumsfaktor (Proliferation Östradiol stimulierte/ unbehandelte Zellen) erreicht (Abb.4 b). Die Zugabe von Östradiol führte hierbei nach 144 - stündiger Inkubation zu einer Wachstumssteigerung um den Faktor 4,9. Dieser Faktor sank bei den anderen Versuchsansätzen mit zunehmendem Anteil an Phenolrot im Medium und lag unter Verwendung des 100 % phenolrothaltigen Mediums nach der gleichen Zeit (144 Stunden) bei 1,4 (Abb.4 b).

Diese Beobachtung machte die Affinität von Phenolrot zum Östrogenrezeptor der BG-1 Zellen deutlich und wies auf eine kompetitive Verdrängung von Östradiol vom Rezeptor durch Phenolrot hin.

Für die geplanten Proliferationsexperimente war es wichtig, durch die Stimulation mit Östradiol einen möglichst großen Wachstumsfaktor zu erzielen, weil ein großer Wachstumsfaktor eine deutliche Differenz der Zellteilungshäufigkeit oder -aktivität zwischen unbehandelten und stimulierten Zellen bedeutet. Deshalb fiel die Wahl des Mediums für die Experimente mit den BG-1 Zellen auf das phenolrotfreie Medium. Somit konnte gleichzeitig sichergestellt werden, dass bei den Stimulationsversuchen allein Östradiol für die Proliferationssteigerung verantwortlich war.

3.1.3 Untersuchung der Zellüberlebensrate mit der Ethidiumbromid/Fluoresceindiacetat Methode

Die Vitalität der im Experiment verwendeten Zellen ist für die Ergebnisinterpretation von größter Bedeutung. Daher wurden Vitalitätsuntersuchungen in den jeweiligen Testsystemen durchgeführt. Bei der Untersuchung wurde die Zellüberlebensrate der Zellen beider Zelllinien nach der Beanspruchung durch den Ablösevorgang (beispielsweise beim Resuspendieren oder Vereinzeln der Zellen) und nach der Behandlung mit den Testsubstanzen bestimmt.

Das Prinzip des verwendeten Vitalitätstest beruht darauf, dass bei abgestorbenen Zellen der DNA- Farbstoff Ethidiumbromid in die Zelle gelangt. Diese Zellen leuchten unter dem Fluoreszenzmikroskop rot. Vitale Zellen hingegen nehmen Fluoresceindiacetat auf. Aktive Esterasen spalten die beiden Esterfunktionen ab. Das entstehende Fluorescein färbt die Zelle, unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar, leuchtend grün.

Anhand dieser Vitalitätsfärbung konnte festgestellt werden, dass auch bei hoher Beanspruchung und nach Zugabe der Substanzen in den eingesetzten Konzentrationen keine Einschränkung der Vitalität der Zellen zu beobachten war. Der Prozentanteil toter Zellen bewegte sich jeweils im normalen Bereich von 10-15 %. Da die Auszählung beständig mindestens 85 % überlebende Zellen ergab, wurde diese Untersuchung im weiteren Verlauf nur stichprobenartig durchgeführt.

3.1.4 Nachweis des Östrogenrezeptors

Der Nachweis der Exprimierung des Östrogenrezeptors bei den Zellen der Ovarialtumorzelllinie BG-1 wurde im NHIES (National Institute of Environmental and Health Systems) North Carolina (USA) von Dr. S. Müller mit Hilfe von biochemischen und molekularbiologischen Methoden durchgeführt. Dazu wurden die Kernproteine der Zellen beider Zelllinien isoliert und mittels Western Blot analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die BG-1 Zelllinie den Östrogenrezeptor exprimiert, die UCI-107 Zelllinie jedoch nicht. Die Daten werden nicht gezeigt.

3.2 Proliferationsexperimente

3.2.1 Stimulationsversuche

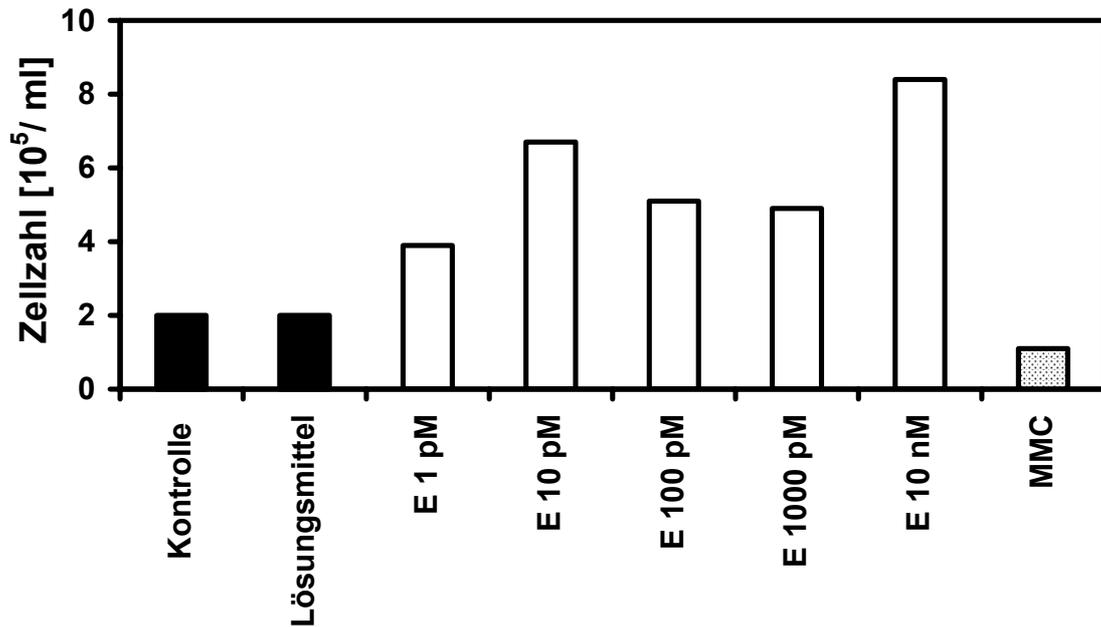
Ziel dieser Experimente war es, die östrogenrezeptorpositive Ovarialtumorzelllinie BG-1 mit 17- β -Östradiol zu einer gesteigerten Proliferation zu stimulieren und zusätzlich die Zellen nach der Stimulation mit Hilfe des Mikrokerntests auf eine Induktion von Chromosomenschäden zu untersuchen.

Die BG-1 Zellen zeigten eine Proliferationssteigerung nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an 17- β -Östradiol (Abb. 5). Der maximale Wachstumsfaktor (Proliferation Östradiol stimulierte/ unbehandelte Zellen) wurde bei der Stimulation mit Östradiol in einer Konzentration von 10 nM erreicht und betrug 4,2. Beim Einsatz von 10 pM Östradiol lag der Wachstumsfaktor bei einem Wert von 3,4 und bei Behandlung der Zellen mit 100 pM Östradiol betrug dieser 2,6. Parallel dazu konnte bei der mikroskopischen Auswertung der Mikrokerne eine Erhöhung der Mikrokernrate bei den Östradiol stimulierten Zellen festgestellt werden. Eine Erhöhung der Zellzahl und der Mikrokerne ließ sich bei der unbehandelten Kontrolle und Lösungsmittelkontrolle (0,1 % Ethanol) nicht nachweisen.

Vergleichbare Experimente wurden auch mit der östrogenrezeptornegativen Ovarialtumorzelllinie UCI-107 durchgeführt (Abb. 6). Bei diesen Zellen konnte nach der Behandlung mit denselben Konzentrationen an 17- β -Östradiol keine Steigerung der Zellzahl sowie keine Induktion von Mikrokernen beobachtet werden. Die Mikrokernauswertung diente dem Ausschluss einer Genotoxizität von Östradiol in den eingesetzten Konzentrationen.

Die fehlende Proliferationssteigerung bei den UCI-107 Zellen und die eingetretene Zellzahlerhöhung bei der rezeptorpositiven Zelllinie BG-1 stellte somit sicher, dass die Proliferationssteigerung über einen rezeptorabhängigen Prozeß abläuft und mit Östradiol spezifisch stimuliert werden kann.

a



b

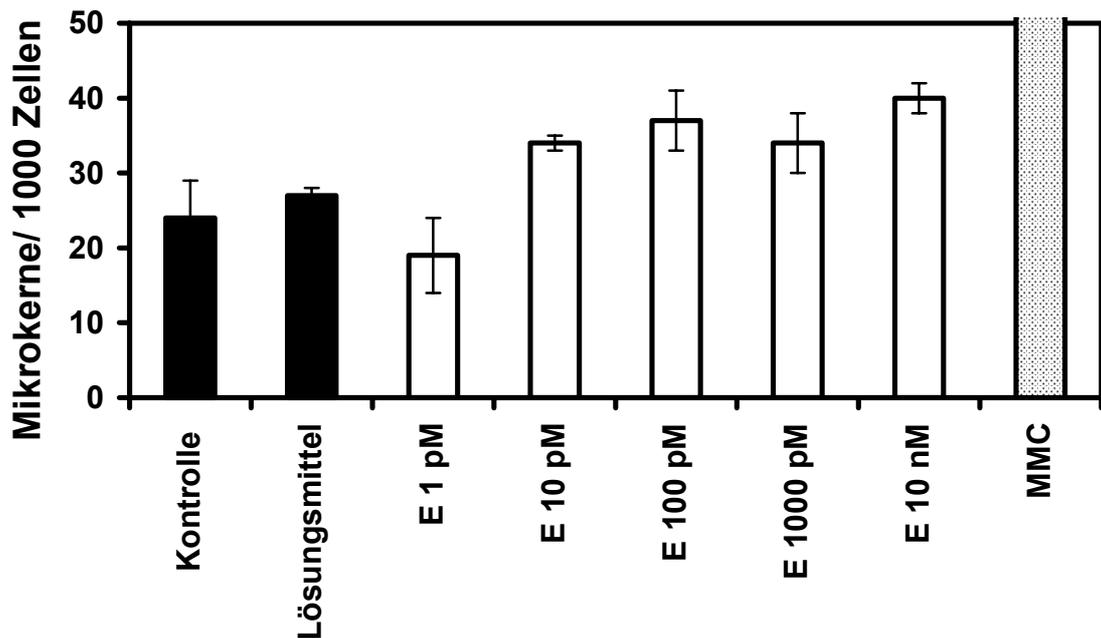
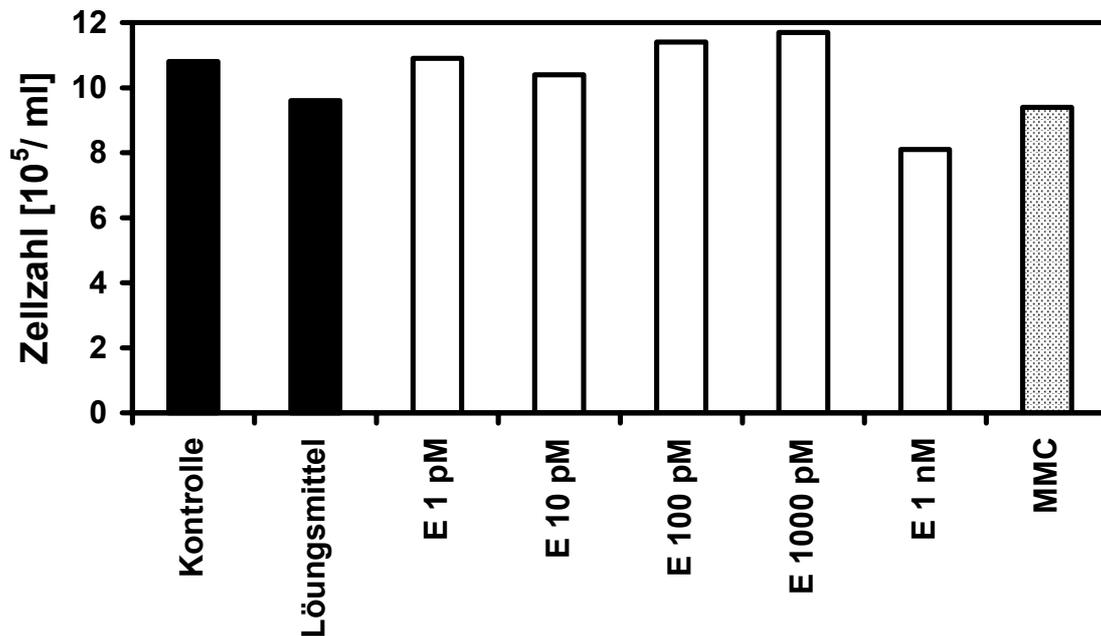


Abbildung 5: Zellproliferation (a) und Mikrokerninduktion (b) bei der östrogenrezeptorpositiven Ovarialtumorzelllinie BG-1 nach Behandlung mit Lösungsmittel (0,1 % Ethanol), den angegebenen Konzentrationen an 17- β -Östradiol (E) oder Mitomycin C (MMC, 20 μ g/ml, Positivkontrolle). Die BG-1 Zellen wurden für 168 Stunden mit den Testsubstanzen in reduziertem Medium (DCC-FBS, phenolrotfrei) inkubiert. Nach der Ablösung der Zellen, Zellzahlmessung und anschließender Fixierung der Zellen auf Objektträgern fand die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der mit Acridin-Orange gefärbten Mikrokernpräparate statt. Es wurden die mikrokernhaltigen Zellen von 3 x 1000 Zellen gezählt und der Mittelwert (\pm Standardabweichung) gebildet. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit konsistenten Ergebnissen (siehe Anhang Tab. 3).

a



b

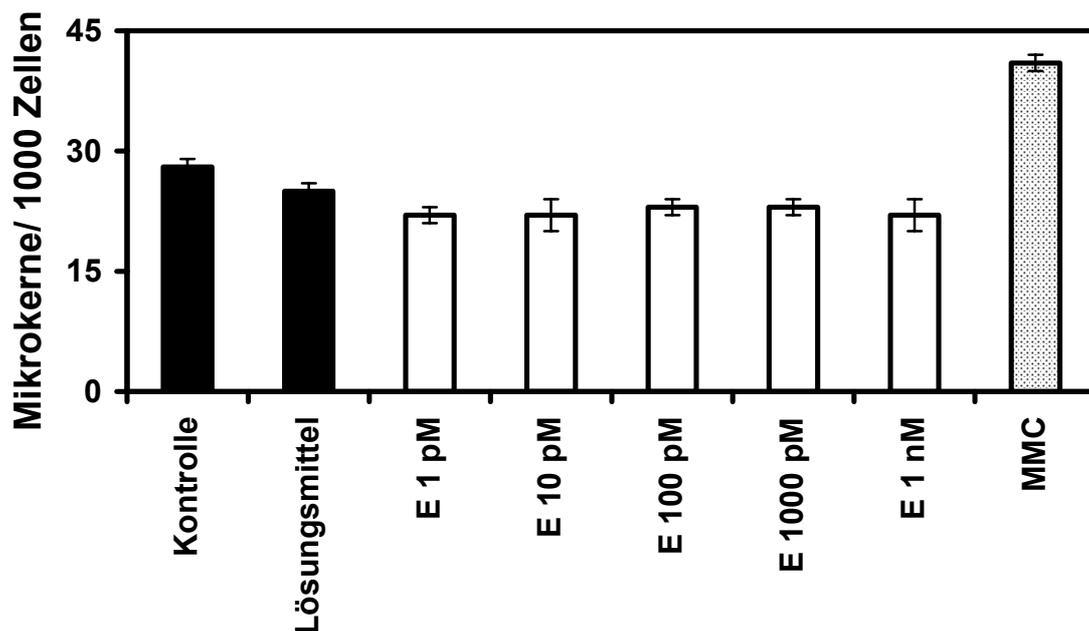


Abbildung 6: Zellproliferation (a) und Mikrokerninduktion (b) bei der östrogenrezeptornegativen Ovarialtumorzelllinie UCI-107 nach Behandlung mit Lösungsmittel (0,1% Ethanol), den angegebenen Konzentrationen an 17- β Östradiol (E) oder Mitomycin C (MMC, 20 μ g/ ml, Positivkontrolle). Die UCI-107 Zellen wurden für 96 Stunden mit den Testsubstanzen in reduziertem Medium inkubiert. Nach der Ablösung der Zellen, Zellzahlmessung und anschließender Fixierung der Zellen auf Objektträgern fand die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der mit Acridin- Orange gefärbten Mikrokernpräparate statt. Es wurden die mikrokernhaltigen Zellen von 3 x 1000 Zellen gezählt und der Mittelwert (+/- Standardabweichung) gebildet. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments von drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit konsistenten Ergebnissen (siehe Anhang Tab. 4).

3.2.2 Einsatz des Rezeptorantagonisten Hydroxytamoxifen

Auf Grund der Ergebnisse der vorangegangenen Stimulationsexperimente sollte nun überprüft und gesichert werden, dass der beobachtete Effekt der Mikrokernerhöhung bei den östradiolstimulierten BG-1 Zellen rezeptorvermittelt ist und deshalb nur bei einer gleichzeitigen Erhöhung der Zellteilungsaktivität durch Rezeptorstimulation auftritt. Darum wurde bei den folgenden Proliferationsexperimenten zusätzlich zu Östradiol der spezifische Östrogenrezeptorantagonist 4-Hydroxytamoxifen eingesetzt.

Bei der experimentellen Durchführung wurden die Zellen mit Östradiol in einer Konzentration von 100 pM und 10 pM alleine sowie mit Östradiol (10 pM) in Kombination mit Hydroxytamoxifen (1nM, 0,5 nM und 0,1nM) behandelt. Im Anschluß an die Inkubation wurden die Zellzahlen der Proben bestimmt und die Zellen auf Mikrokern untersucht.

Bei der Behandlung der BG-1 Zellen mit 100 pM bzw. 10 pM Östradiol alleine konnte eine Proliferationssteigerung um einen Wachstumsfaktor von 5,7 bzw. 4,5 erzielt und der gleichzeitige Nachweis einer Mikrokernerhöhung erbracht werden (Abb. 6). Die Mikrokernrate (Verhältnis Mikrokern/ 1000 östradiolstimulierte zu Mikrokern/ 1000 unbehandelte Zellen) stieg um einen Faktor von etwa 1,8.

Der Einsatz von Hydroxytamoxifen alleine zeigte bei diesen Zellen in den Konzentrationen 0,5 nM und 1 nM eine minimale Zellzahlerhöhung, was auf eine geringe agonistische Wirkung von Hydroxytamoxifen am Östrogenrezeptor hindeutet. Eine Mikrokerninduktion konnte hierbei nicht festgestellt werden. (Abb. 6)

Der proliferationssteigernde Effekt von Östradiol bei den östrogenrezeptorpositiven BG-1 Zellen konnte bei gleichzeitiger Behandlung mit 17- β -Östradiol und 4-Hydroxytamoxifen durch Hydroxytamoxifen aufgehoben werden (Abb. 6). Beim Einsatz von Östradiol in einer Konzentration von 10 pM in Kombination mit den drei steigenden Konzentrationen an 4-Hydroxytamoxifen (0,1nM, 0,5 nM und 1nM) ließ sich eine ebenso ansteigende Proliferationsinhibition beobachten. Je höher die Hydroxytamoxifenkonzentration war, desto effektiver war die kompetitive Verdrängung des Östradiols vom Rezeptor. Die Zellproliferation konnte beim Einsatz von 10 pM

Östradiol in Kombination mit 1 nM bzw. 0,5 nM Hydroxytamoxifen auf einen Wachstumsfaktor von 1,9 bzw. 2,1 reduziert werden. Parallel zu der Verminderung der Proliferation ergab die Auswertung der Mikrokerne bei den BG-1 Zellen, die gleichzeitig mit Östradiol und Hydroxytamoxifen behandelt wurden, eine Reduktion der Mikrokernrate (Abb. 6).

Um ausschließen zu können, dass 4-Hydroxytamoxifen in den eingesetzten Konzentrationen gentoxisch ist, wurde der gleiche Versuch mit der rezeptornegativen Zelllinie UCI-107 durchgeführt (Abb. 7). Dabei zeigte sich neben fehlender Proliferationssteigerung durch Östradiol, keine erhöhte Mikrokernrate bei den mit Hydroxytamoxifen, sowie den in Kombination von Östradiol und Hydroxytamoxifen behandelten UCI-107 Zellen.

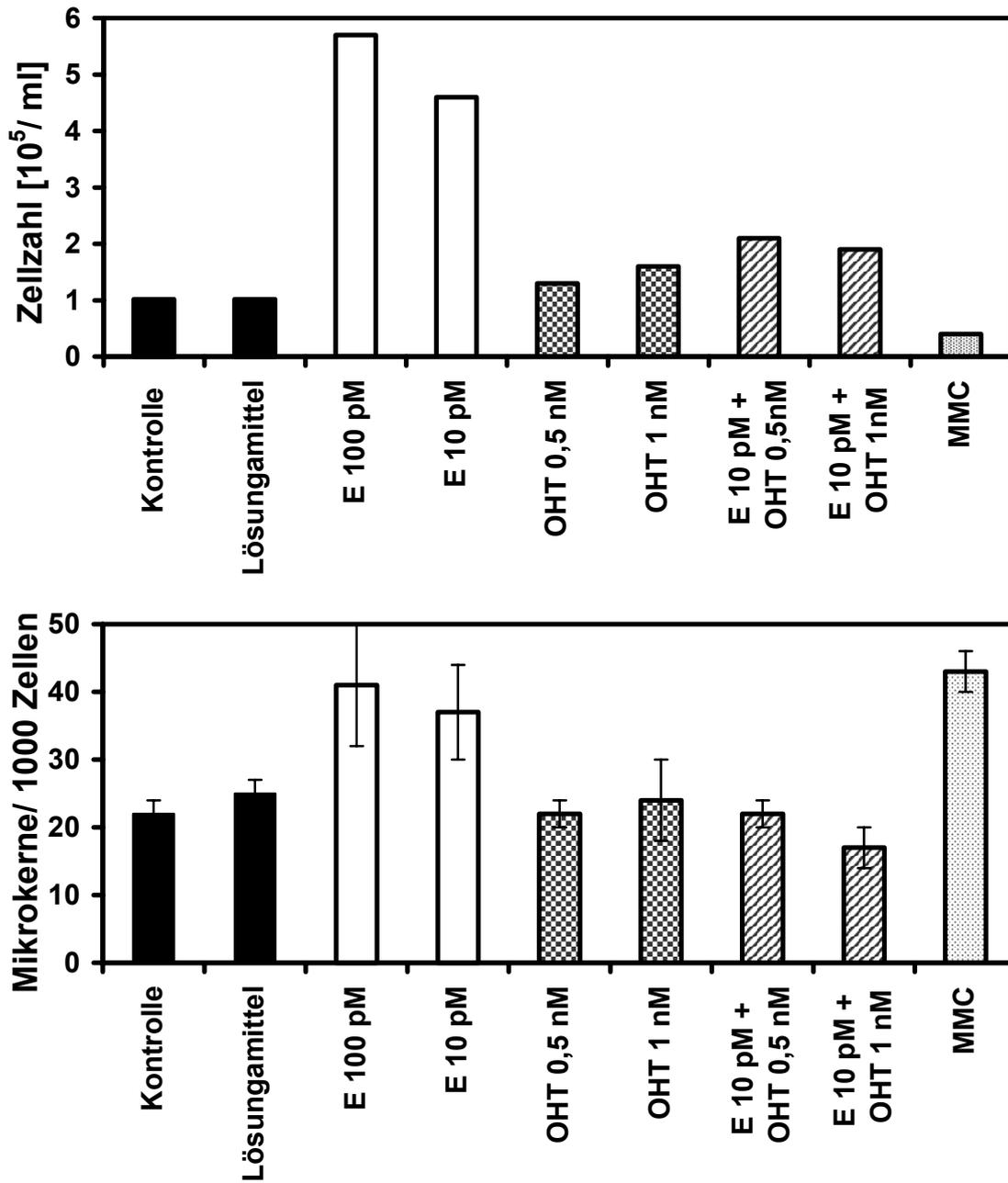


Abbildung 7: Zellproliferation und Mikrokerninduktion bei den östrogenrezeptorpositiven BG-1 Zellen nach Behandlung mit Lösungsmittel (0,1 % Ethanol), Östradiol (E, 100 pM und 10 pM), Hydroxytamoxifen (OHT, 0,5 nM und 1 nM) sowie Östradiol (10 pM) in Kombination mit Hydroxytamoxifen (E+OHT) oder Mitomycin (MMC, 20 μ g/ml, Positivkontrolle). Die Zellen wurden für 168 Stunden mit den Testsubstanzen in reduziertem Medium (DCC-FBS, phenolrotfrei) inkubiert. Nach der Ablösung der Zellen, Zellzahlmessung und anschließender Fixierung der Zellen auf Objektträgern fand die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der mit Acridin -Orange gefärbten Mikrokernpräparate statt. Es wurden von 3 x 1000 Zellen die mikrokernhaltigen Zellen gezählt und der Mittelwert (+/- Standardabweichung) gebildet. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit konsistenten Ergebnissen (siehe Anhang Tab. 5).

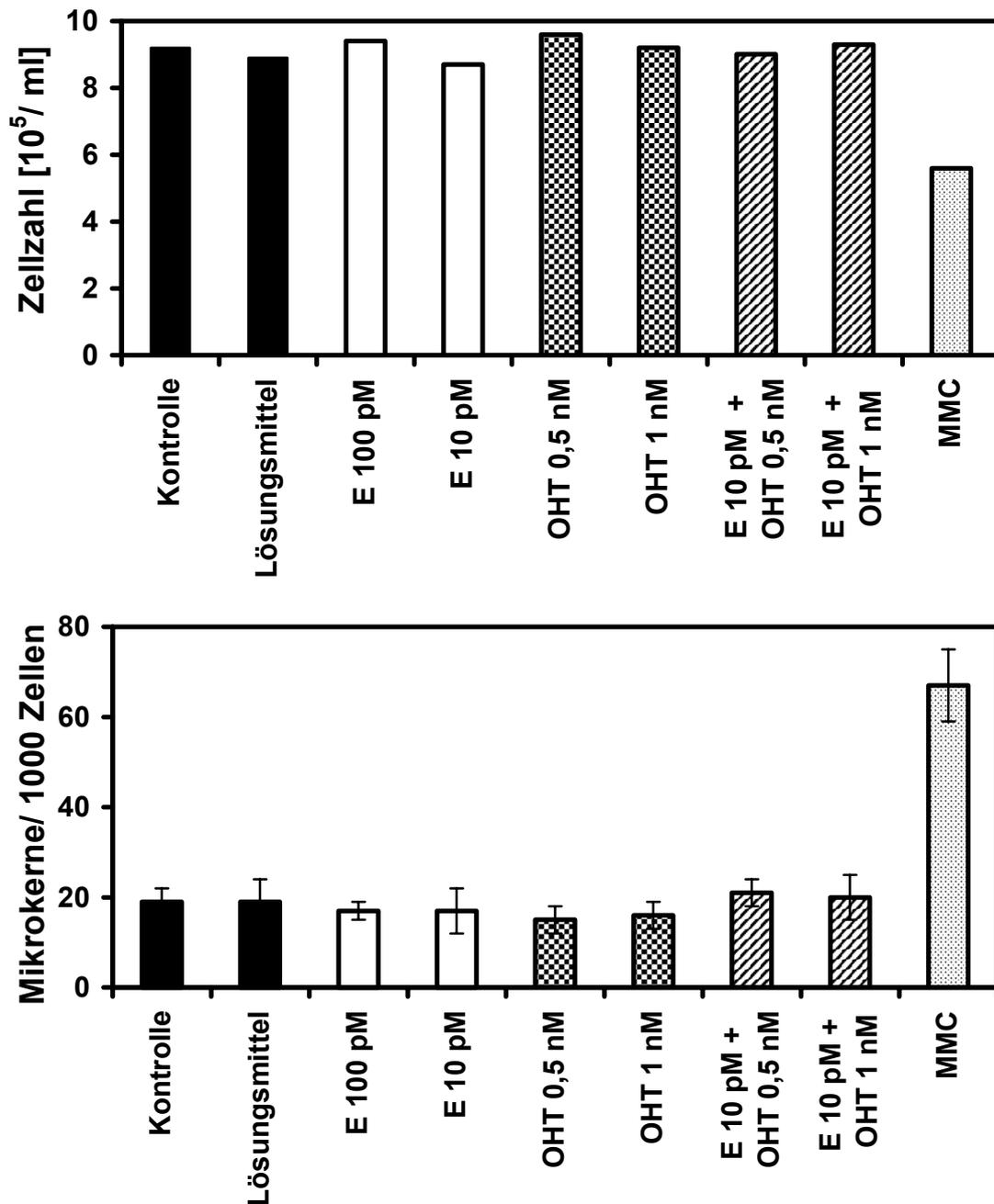


Abbildung 8: Zellproliferation und Mikrokerninduktion bei den östrogenrezeptornegativen UCI-107 Zellen nach Behandlung mit Lösungsmittel (0,1 % Ethanol), Östradiol (E, 100 pM und 10 pM), Hydroxytamoxifen (OHT, 0,5 nM und 1 nM) sowie Östradiol (10 pM) in Kombination mit Hydroxytamoxifen (E+OHT) oder 20 µg/ml Mitomycin (MMC, Positivkontrolle). Die Zellen wurden für 96 Stunden mit den Testsubstanzen in reduziertem Medium inkubiert. Nach der Ablösung der Zellen, Zellzahlmessung und anschließender Fixierung der Zellen auf Objektträgern fand die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der mit Acridin -Orange gefärbten Mikrokernpräparate statt. Es wurden von 3 x 1000 Zellen die mikrokernhaltigen Zellen gezählt und der Mittelwert (+/- Standardabweichung) gebildet. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit konsistenten Ergebnissen (siehe Anhang Tab. 6).

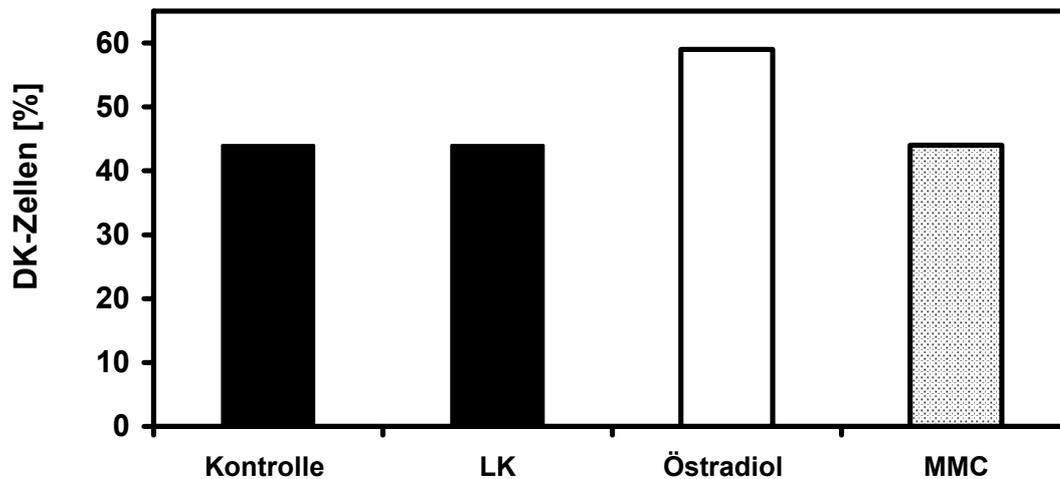
3.3 Inhibierung der Zytokinese

Bei diesen Versuchen wurde die Auswertung der Mikrokerne bei den östradiolstimulierten und den unbehandelten Zellen auf jene Zellen normiert, die genau eine Zellteilung durchgeführt hatten. Durch die Zugabe des Zytokineseinhibitors Cytochalasin B entstehen bei einer Zellteilung doppelkernige Zellen, weil die sich an die Mitose anschließende Zytokinese verhindert wird. Die Mikrokernelauszählung erfolgte nur bei den doppelkernigen Zellen, wodurch sicher davon ausgegangen werden konnte, dass die Mikrokernelrate der Zellen bestimmt wurde, die sich während der Zeit der Test- und Cytochalasin B - Zugabe genau einmal geteilt hatten.

Der Anteil an doppelkernigen Zellen lag bei den stimulierten Zellen höher als bei den unbehandelten und lösungsmittelbehandelten Kontrollen (Abb. 9 a). Eine Steigerung der Proliferationsrate war also nur bei den östradiolstimulierten Zellen nachweisbar. Die Proliferationsrate ergab sich aus dem ermittelten Verhältnis aus einkernigen und doppelkernigen Zellen. Von den Zellen, die mit Östradiol stimuliert wurden, hat in derselben Zeit (48 h) ein erhöhter Anteil an Zellen, eine Mitose mit dem davor stattfindenden Zellzyklus durchgeführt als bei den unbehandelten Zellen. Ebenso wiesen die mit Östradiol stimulierten Zellen der östrogenrezeptorpositiven BG-1 Zelllinie im Vergleich zu den unbehandelten und den mit Lösungsmittel behandelten BG-1 Zellen eine um einen Faktor von 1,5 erhöhte Mikrokernelfrequenz auf (Abb. 9 b).

Bei der östrogenrezeptornegativen Zelllinie UCI-107 zeigte sich nach der Durchführung des vergleichbaren Versuches das gleiche Verhältnis von doppelkernigen zu einkernigen Zellen sowohl bei den unbehandelten als auch bei den östradiolstimulierten Zellen. Es fand sich keine Mikrokernelerhöhung bei den stimulierten UCI-107 Zellen. Die Ergebnisse sind im Anhang dargestellt (siehe Anhang Tab. 8).

a



b

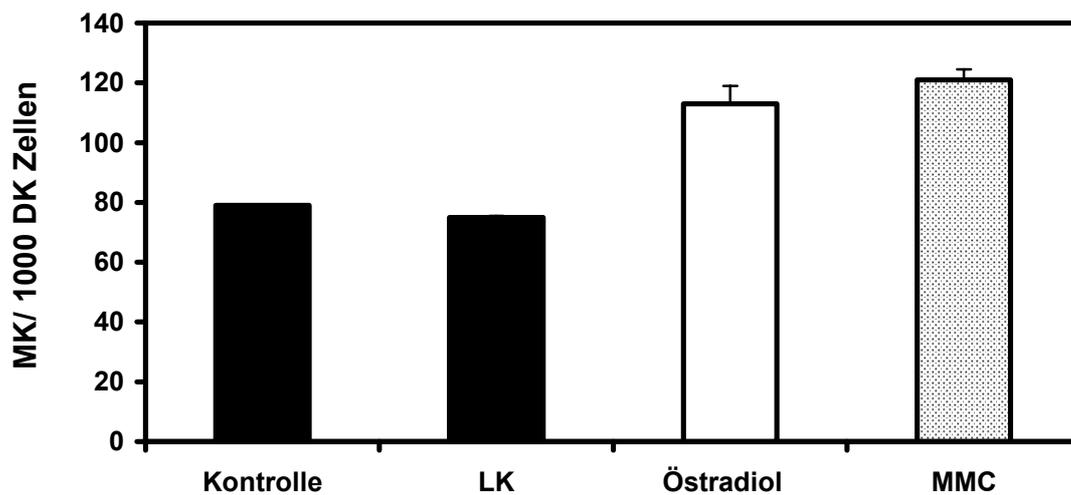


Abbildung 9: Prozentualer Anteil an doppelkernigen Zellen (a) und Mikrokerninduktion bei den doppelkernigen Zellen (b) der östrogenrezeptorpositiven BG-1 Zelllinie nach Behandlung mit Cytochalasin B (2 $\mu\text{g/ml}$), alleine (Kontrolle, unbehandelt), zusammen mit Lösungsmittel (LK, 0,1 % Ethanol), 17- β Östradiol (100 pM) oder Mitomycin C (MMC, 0,02 $\mu\text{g/ml}$, Positivkontrolle). Die Zellen wurden für 48 Stunden in reduziertem Medium (DCC-FBS, phenolrotfrei) inkubiert. Nach der Ablösung der Zellen und Zellzahlbestimmung wurden Mikrokernpräparate angefertigt und die Objektträger für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung mit Acridin -Orange gefärbt. Es wurden 3 x 1000 Zellen gezählt, davon der Anteil der Doppelkernigen bestimmt und die Mikrokernrate der doppelkernigen Zellen analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse eines repräsentativen Experiments mit zwei unabhängig voneinander durchgeführten Replika. Die Ergebnisse eines dritten Versuchs sind im Anhang wiedergegeben (siehe Anhang Tab. 7). DK= doppelkernige Zellen; MK= mikrokernhaltige Zellen

3.4 Langzeitproliferation und Zellzyklusanalyse der BG-1 Zellen

Ziel dieses weiteren Experimentes war es, den Wachstumsverlauf sowie parallel dazu die Verlauf der Mikrokernrate der BG-1 Zelllinie über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Zusätzlich sollte mittels eines FACScans (fluoreszenzaktiviertes Zellanalyse-Gerät) der Einfluss der Proliferationsteigerung durch Östradiol bei den rezeptorpositiven BG-1 Zellen auf die Zellzyklusphasen (G1/G0-, S- und G2/M- Phase) analysiert werden. Man erhielt Informationen über Veränderungen der Zellzyklusphasenanteile der stimulierten und unbehandelten Zellen zu den Messzeitpunkten.

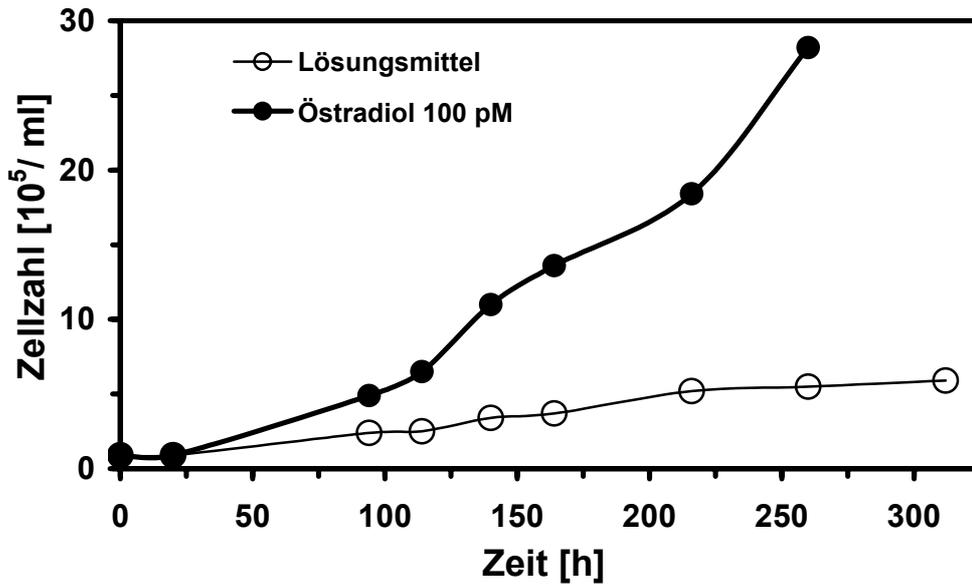
Bei der experimentellen Durchführung wurden die BG-1 Zellen über einen Zeitraum von 312 Stunden in phenolrotfreiem reduziertem Medium inkubiert, wobei ein Teil der Zellen mit 100 pM 17- β -Östradiol stimuliert, der andere Teil der Zellen mit Lösungsmittel (0,1% Ethanol) behandelt wurde. Alle 24 bis 48 Stunden erfolgte, neben der Zellzahlmessung und Mikrokernauswertung, die Zellzyklusanalyse mit den Zellen.

3.4.1 Langzeitproliferation

Aus der Wachstumskurve lässt sich eine beschleunigte Proliferation der östradiolstimulierten BG-1 Zellen erkennen, was sich im steileren Verlauf der Kurve zeigt (Abb.10 a). Während diese Zellen schon nach 94 Stunden Wachstumszeit, nachdem die Zellen für 72 Stunden mit Östradiol behandelt waren, eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ ml erreichten, wurde diese Zellzahl von den mit Lösungsmittel behandelten Zellen erst nach 216 Stunden erreicht. Die östradiolstimulierten Zellen hatten nach 114 Stunden ihren ersten exponentiellen Proliferationsanstieg, bei 140 Stunden befanden sie sich in der Plateauphase, wobei sie nach 216 Stunden erneut eine exponentielle Proliferation zeigten. Lichtmikroskopisch beurteilt, zeigten die Zellen ab 140 Stunden einen konfluenten Zellrasen, danach wuchsen die Zellen in dicht gelagerten Zellnestern übereinander weiter. Der Wachstumsfaktor der östradiolstimulierten Zellen entwickelte sich von 2,1 bei 94 Stunden, über 2,5 bei 114 Stunden, erreichte bei 140 Stunden einen Wert von 3,3 und stieg entsprechend der überschüssigen Proliferation danach bis auf 5,1 bei 260 Stunden.

Die Zugabe der Testsubstanzen fand 24 Stunden nach Aussaat der BG-1 Zellen statt. Davor erfolgte die erste Präparation und Auswertung der Mikrokerne (20 Stunden). Zu dieser Zeit zeigte sich eine sehr hohe `spontane` Mikrokernrate bei den frisch ausgesäten noch unbehandelten Zellen (Abb.10 b). Nach den ersten 72 Stunden Behandlung mit Lösungsmittel oder Östradiol sank die Mikrokernzahl bei den mit Lösungsmittel behandelten Zellen auf einen Wert von 28, wohingegen bei den östradiolstimulierten Zellen eine Mikrokernzahlerhöhung auf 38 zu beobachten war. Im weiteren Verlauf zeigte sich bei den zur Proliferation stimulierten „Östradiol“-Zellen stetig eine erhöhte Mikrokernfrequenz. Die Mikrokernzahlen der Lösungsmittel behandelten Zellen blieben auf dem niedrigen Niveau.

a



b

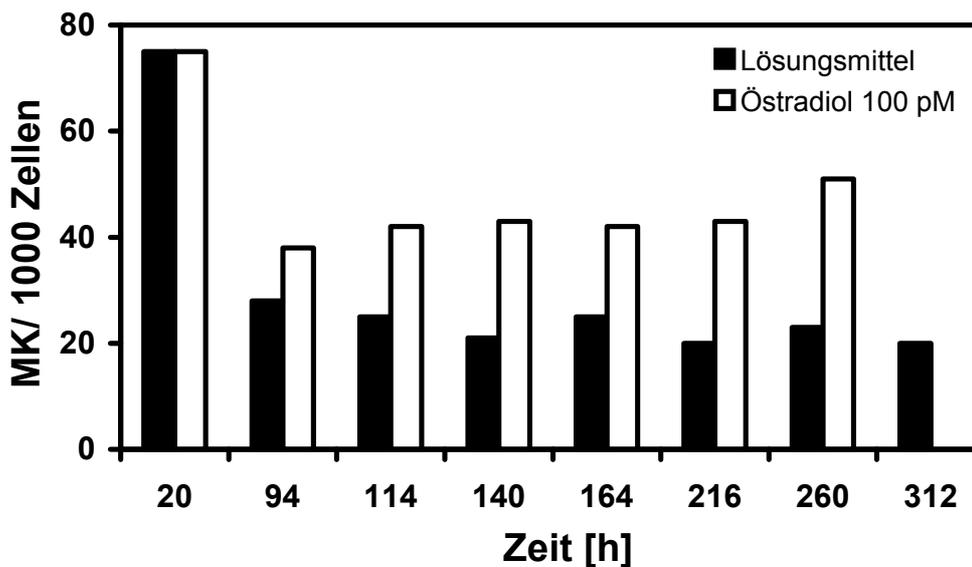


Abbildung 10: Zellproliferation (a) und Mikrokerninduktion (b) bei der östrogenrezeptorpositiven Ovarialtumorzelllinie BG-1 nach Behandlung mit Lösungsmittel (0,1% Ethanol) oder Östradiol (100 pM). Die BG-1 Zellen wurden mit einer Zellzahl von $0,9 \times 10^5$ Zellen/ ml in 5 ml reduziertem Medium (DCC-FBS, phenolrotfrei) ausgesät und über einen Zeitraum von 312 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert. Der erste Mediumwechsel mit Zugabe der Testsubstanzen erfolgte nach 24 Stunden und wiederholte sich im weiteren Verlauf alle 72 Stunden. Zu den angezeigten Zeiten fand nach der Ablösung der Zellen, die Zellzahlmessung und anschließende Fixierung der Zellen auf Objektträgern statt. Die Auswertung der Mikrokern wurde nach Acridin- Orange- Färbung der Objektträger mit dem Fluoreszenzmikroskop bei 500-facher Vergrößerung durchgeführt. Es wurden von 3 x 1000 Zellen die mikrokernhaltigen Zellen gezählt und der Mittelwert gebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes mit zwei unabhängigen Replika von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen (siehe Anhang Tab. 9).

Im Folgenden (Abb. 11) wurden die zwei Zeitpunkte: 114 Stunden [1] und 216 Stunden [2] während des Wachstumsverlauf der BG-1 Zellen hinsichtlich ihrer Proliferation und der Mikrokerninduktion genauer analysiert.

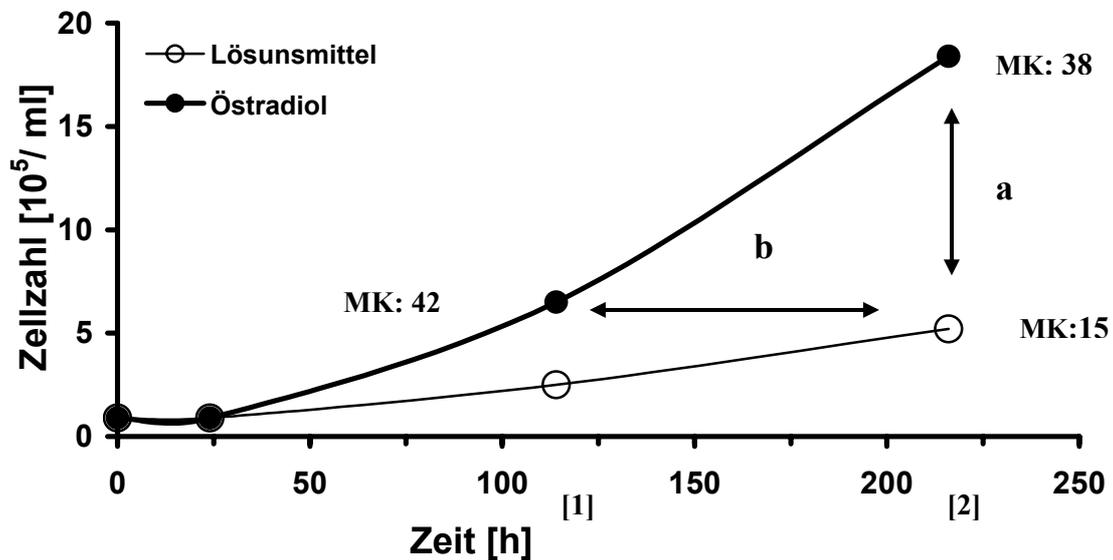


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Proliferation und Mikrokernauswertung zu den Zeitpunkten [1] 114 Stunden und [2] 216 Stunden bei den östrogenrezeptorpositiven BG-1 Zellen nach Behandlung mit 17- β -Östradiol (100 pM) oder Lösungsmittel (0,1 % Ethanol); a: häufigere Zellteilungen bei den östradiolstimulierten Zellen b: gleiche Anzahl von Zellteilungen bei den östradiolstimulierten Zellen und bei der Lösungsmittelkontrolle; MK: mikrokernhaltige Zellen/ 1000 Zellen

Zum Zeitpunkt [1] (114 h) wiesen die mit Östradiol stimulierten im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Zellen eine höhere Zellzahl auf. Der Wachstumsfaktor betrug hier 2,5. Dies zeigte ein schnelleres Wachstum der stimulierten Zellen an. In derselben Zeit (114 h) fanden mehr Zellteilungen statt, was eine kürzere Zellteilungsdauer bedeutet.

Die mit Lösungsmittel behandelten Zellen erreichten zum Zeitpunkt [2] (216 h) ungefähr die gleiche Zellzahl wie die stimulierten Zellen nach 114 Stunden. Diese Zellen benötigten mehr Zeit, um dieselbe Anzahl von Zellteilungen durchzuführen. Die Proliferation war langsamer.

Analysierte man parallel dazu die Mikrokernzahlen, so zeigte sich bei den östradiolstimulierten Zellen zu beiden Zeitpunkten (1 und 2) eine erhöhte Mikrokernfrequenz, Der Vergleich der Mikrokernzahlen zum selben Zeitpunkt (Abb. 11 Pfeil a) zeigte bei den stimulierten Zellen neben der erhöhten Zellzahl ebenso eine

erhöhte Mikrokernzahl (38 bei den östradiolstimulierten Zellen im Gegensatz zu 25 bei der Lösungsmittelkontrolle). Beim Vergleich der Mikrokernzahlen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, aber bei Erreichen der gleichen Zellzahl (Pfeil b) war die Mikrokernrate weiterhin bei den östradiolstimulierten Zellen erhöht (42 bei Östradiolstimulation im Gegensatz zu 25 bei Lösungsmittelbehandlung).

3.4.2 Zellzyklusanalyse

Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse, welche für die Zeit zwischen 94 und 240 Stunden dargestellt sind (Abb. 12), zeigten in der G1/G0-Phase (Abb. 12 a) zu allen Zeitpunkten einen geringfügig erhöhten Anteil an Zellen, die mit Lösungsmittel behandelt wurden, gegenüber östradiolstimulierten Zellen. Im Durchschnitt befanden sich aber bei beiden Zellpopulationen etwa 65 % der sich im Wachstum befindlichen Zellen in der G1/G0-Zellen.

In der S-Phase (Abb. 12 b) befanden sich durchgehend mehr Zellen der östradiolstimulierten Zellpopulation, was für eine erhöhte DNA- Replikationsrate und damit für eine höhere und schnellere Zellteilungsaktivität dieser Zellen im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Zellen spricht. Auffällig war dabei der große Anteil von 29% der östradiolstimulierten Zellen zum Zeitpunkt 114 Stunden. Betrachtet man parallel dazu die Wachstumskurve (Abb. 10) der mit Östradiol behandelten Zellen, so ist diese Beobachtung mit dem steilen Proliferationsanstieg zu dieser Zeit zu erklären. Bei 164 Stunden erreichten die „Östradiol-Zellen“ im Proliferationsverlauf eine kurze Plateauphase. Dies ist mit einer Reduktion des S-Phasen Anteils dieser Zellen auf 10 % vereinbar. Die durchgehend niedrigen Anteile von 2-11% der mit Lösungsmittel behandelten Zellen in der S-Phase spiegeln die langsamere Proliferation dieser Zellen wieder.

In der G2/M-Phase (Abb.12 c) lag während der gesamten Wachstumszeit der Anteil der Zellen, die mit Lösungsmittel behandelt wurden, konstant über dem Anteil der östradiolstimulierten Zellen. Im Durchschnitt betrug der Anteil ersterer 26 %, wohingegen der Anteil der östradiolstimulierten Zellen in der G2/M-Phase bei 20 % lag.

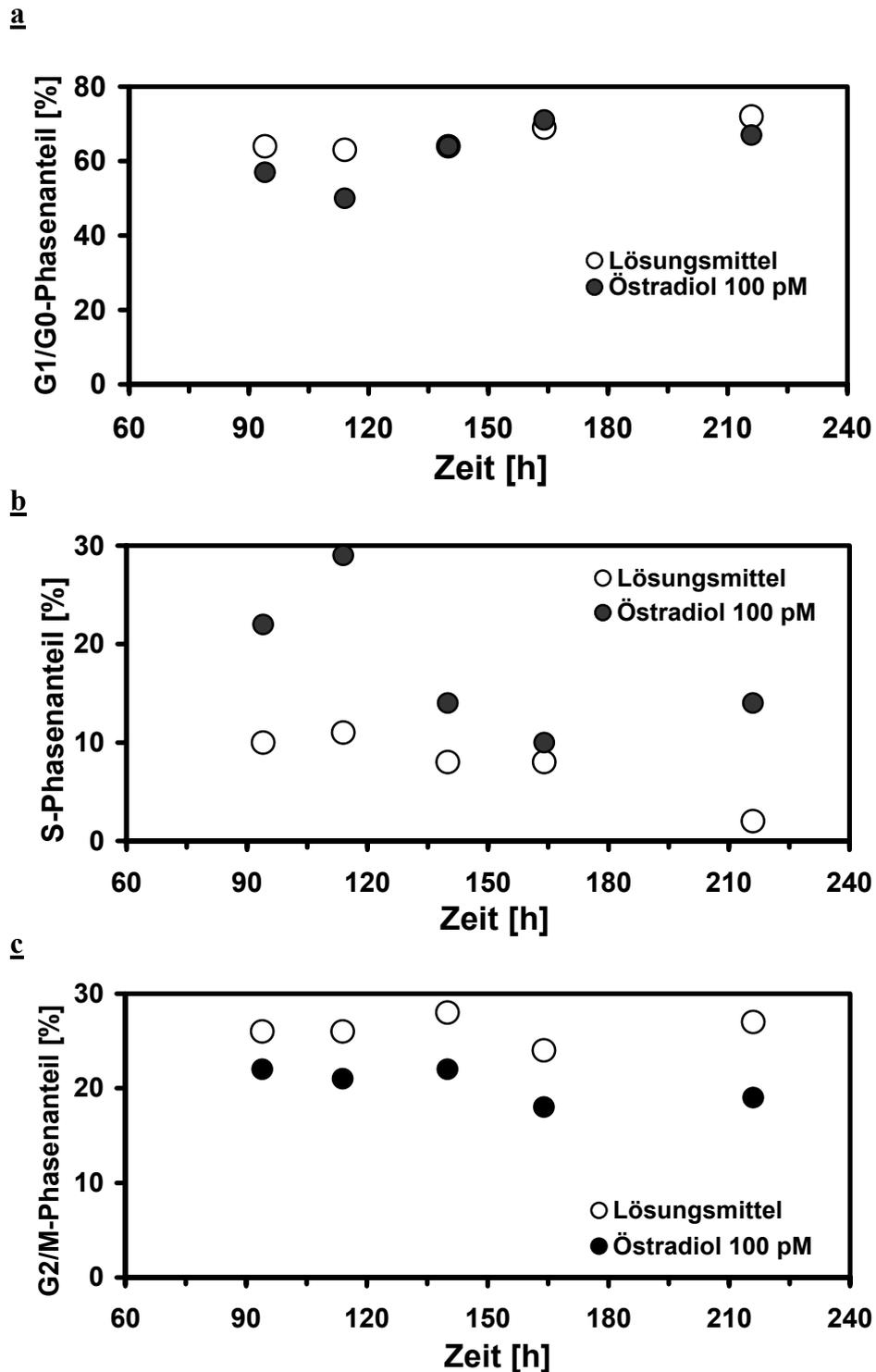


Abbildung 12 a-c: Anteile von Zellen [%] der BG-1 Zelllinie in der G1/ G0- (a), S- (b) oder G2/ M-Phase (c) des Zellzyklus während der Wachstumszeit zwischen 94 bis 240 Stunden nach Behandlung mit Lösungsmittel (0,1% Ethanol) oder 17- β -Östradiol (100 pM). Die Zellen wurden zu den angezeigten Zeiten nach erfolgter Zellzahlmessung und Mikrokernpräparation für die Zellzyklusanalyse vorbereitet. Die Auswertung der mit Propidiumiodid gefärbten Zellen fand mit Hilfe des computergestützten Analyse-Programms CellQuest statt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes mit zwei unabhängigen Replika von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen (siehe Anhang Tab. 9).

Die Ermittlung der Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen erfolgte durch Multiplikation der Gesamtdauer eines Zellzyklus mit den gemessenen prozentualen Phasenanteilen. Mit Hilfe der Formel $t = \ln 2 (t_2 - t_1) / \ln N_2 - \ln N_1$ (t = Zeitpunkt; N = Zellzahl) wurde die Dauer des gesamten Zellzyklus berechnet. Die Anwendung der Formel ist auf die logarithmische Wachstumsphase (von 114 bis 164 Stunden) begrenzt.

Die berechnete relative Gesamtzellzyklusdauer der östradiolstimulierten BG-1 Zellen war zu allen Zeitpunkten kürzer als die Dauer eines gesamten Zellzyklus der lösungsmittelbehandelten Zellen (Tab. 1). Bei der Berechnung der einzelnen Zellzyklusphasenzeiten zeigten die Zellen, die mit Östradiol stimuliert wurden, entsprechend in jeder Phase eine kürzere Dauer.

Tabelle 1: Berechnete Zellzyklusdauer [h], gemessene Zellzyklusphasenanteile [%] und Dauer [h] der einzelnen Phasen (G1/G0-, S- und G2/M-Phase) der BG-1 Zellen zu den Zeiten 114, 140 und 164 Stunden nach Behandlung mit Lösungsmittel (LK; 0,1 % Ethanol) oder Östradiol (E, 100 pM); Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes mit zwei unabhängigen Replika von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen (siehe Anhang Tab. 9).

Zeit [h]	Zellzyklusdauer [h]		Phasenanteile [%]						Phasendauer [h]					
			LK			E			LK			E		
	LK	E	G1/G0	S	G2/M	G1/G0	S	G2/M	G1/G0	S	G2/M	G1/G0	S	G2/M
114	224	49	63	11	26	50	29	21	140	26	58	25	14	10
140	59	33	63	8	28	64	14	22	38	5	16	21	5	8
164	197	83	69	8	23	72	11	18	135	16	46	59	9	15

LK: Lösungsmittelkontrolle; E: Östradiol

4 Diskussion

Ein Zusammenhang zwischen der Zellproliferation und dem Auftreten von Genomschäden und damit ein möglicher Mechanismus im Prozess der Tumorentstehung wurde schon in vielen Arbeiten diskutiert (z.B. Key, 1995; Barret, 1993; Preston-Martin et al., 1990; Henderson et al., 1982). Dabei wurde die Proliferation von Zellen im Rahmen des Mehrstufenmodells der Karzinogenese meist als Promotionsfaktor angesehen. Es liegen bisher aber noch kaum Arbeiten vor, welche die Proliferation als initiierenden Faktor im Prozess der Krebsentwicklung untersuchen.

In einer sich teilenden Zelle besteht ein Gleichgewicht zwischen dem Auftreten eines DNA-Schadens und der Reparatur dieses Schadens. Wird dieses Gleichgewicht durch die Stimulation der Zellproliferation in Richtung Zellteilung und beschleunigte Proliferation verschoben, tritt eine Situation ein, in der die Zelle möglicherweise nicht mehr in der Lage ist, den aufgetretenen Schaden suffizient zu reparieren, so dass dieser bei den folgenden Zellteilungen an die Tochterzellen weitergegeben würde. Als Gründe wären sowohl ein Zeitmangel als auch Defekte in den Zellzyklusregulations- und/ oder Reparatursystemen infolge der Proliferationsstimulation denkbar. Dies würde in der Folge zu einer genetischen Instabilität führen. Eine genetische Instabilität drückt sich unter anderem in der Bildung von Mikrokernen aus, so dass die Vergrößerung des Schadens in einer Erhöhung der Mikrokernrate feststellbar wäre.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte dieser Zusammenhang zwischen einer erhöhten Teilungsaktivität und dem Auftreten einer chromosomalen Instabilität untersucht werden. Dazu wurde die östrogenrezeptorpositive Ovarialtumorzelllinie BG-1 mit 17- β Östradiol zu einer Steigerung der Proliferation stimuliert. Im Anschluß daran wurden die BG-1 Zellen auf eine Vermehrung des Genomschadens überprüft. Das hierfür verwendete Testsystem, der Mikrokerntest, stellt ein sensitives Verfahren dar, mit dem relativ einfach der Nachweis von Chromosomenschäden erbracht werden kann. Die Bildung von Mikrokernen wird als gentoxischer Endpunkt bei in vitro und in vivo Tests genutzt (Stopper und Müller, 1997).

Im ersten Teil der Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass die dosisabhängige Erhöhung der Proliferationsrate durch Stimulation der östrogenrezeptorpositiven BG-1

Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an 17- β Östradiol zu einer Erhöhung der Mikrokernformation führte. Eine Steigerung der Proliferation um den Faktor 3,4 bzw. 2,6 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Wachstumsfaktor 1,0) wurde beispielsweise beim Einsatz von 10 pM bzw. 100 pM Östradiol erzielt. Die Mikrokernfrequenz stieg hierbei um einen Faktor von 1,4 bzw. 1,6. Die eingesetzten Konzentrationen von Östradiol lagen im Bereich von 1 pM bis 10 nM. Eine Konzentration von 100 pM entspricht etwa der Konzentration an Östrogenen im Blut (Plasmaspiegel) einer Frau im gebärfähigen Alter. In dem gewählten Konzentrationsbereich kann Östradiol als nicht chromosomenschädigend beurteilt werden (Fischer et al., 2001). Der Nachweis einer fehlenden Genotoxizität von Östradiol in den eingesetzten Konzentrationen konnte zusätzlich dadurch erbracht werden, dass sich bei der östrogenrezeptornegativen Ovarialtumorzelllinie UCI-107 nach Behandlung mit den gleichen Konzentrationen an 17- β Östradiol keine erhöhte Mikrokernrate feststellen ließ. Bei den UCI-107 Zellen ließ sich ebenso keine gesteigerte Proliferation nachweisen.

Es wird jedoch auch von einer mutagenen Aktivität von Östradiol in diesen physiologischen Konzentrationen berichtet (Kong et al., 2000). In dieser Studie wurden Genmutationen (Deletionen und Punktmutationen) in Chinesischen Hamsterzellen V79, induziert durch Östradiol im niedrigem Konzentrationsbereich, detektiert. Derartige Mutationen werden aber durch den Mikrokerntest nicht erfasst, so dass die von Kong et al. gezeigten Effekte nicht für die Beobachtungen der hier vorliegenden Arbeit verantwortlich sind. Ab einer Konzentration von $> 10 \mu\text{M}$ konnten Veränderungen der Chromosomenzahlen (Aneuploidie oder numerische Chromosomenaberrationen) beobachtet werden (Cavalieri et al., 2000; Schuler et al., 1998; Wheeler et al., 1986). Eine Mikrokerninduktion durch Östradiol auf Grund von Mitosestörungen, wodurch ebenfalls Chromosomenzahlveränderungen auftreten, wurde in einer anderen Arbeit bei Konzentrationen $> 20 \mu\text{M}$ beschrieben (Eckert und Stopper, 1996). Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer Arbeit von Banduhn und Obe (1985) sowie von Schuler et al. (1989), welche eine Genotoxizität von Östradiol erst im mikromolaren Konzentrationsbereich nachweisen konnten (Banduhn und Obe, 1985; Schuler et al., 1989).

Die festgestellte Mikrokerninduktion bei einer gleichzeitigen Proliferationssteigerung bei den östradiolstimulierten BG-1 Zellen deutet also auf einen Zusammenhang zwischen der Proliferation und dem Auftreten von Mikrokernen hin.

Auf Grund dieser Ergebnisse galt es daraufhin sicher zu stellen, dass der beobachtete Effekt der Mikrokernerhöhung rezeptorvermittelt ist. Deshalb wurde zusätzlich zu Östradiol der spezifische Östrogenrezeptorantagonist 4-Hydroxytamoxifen eingesetzt. Die gleichzeitige Behandlung der rezeptorpositiven BG-1 Zellen mit Östradiol (10 pM) und Hydroxytamoxifen (0,5 nM und 1 nM) führte sowohl zur Reduktion der Zellzahl als auch zu einer Verminderung der Mikrokernrate. Hydroxytamoxifen alleine zeigte keinen Effekt. Ebenso konnten diese Effekte nicht bei der östrogenrezeptorinsensitiven UCI-107 Zelllinie beobachtet werden. Die Behandlung der rezeptornegativen UCI-Zellen mit 4-Hydroxytamoxifen und anschließende Mikrokernauswertung diente darüber hinaus wiederum zum Ausschluss einer Genotoxizität von Hydroxytamoxifen in den eingesetzten Konzentrationen.

Somit scheint nicht Östradiol selbst, sondern vielmehr die rezeptorabhängige Proliferationssteigerung durch Östradiol die Mikrokernentstehung zu verursachen. Diese Ergebnisse bestätigen eine vorangegangene Studie zu dieser Fragestellung, in der eine Korrelation zwischen der Zellproliferation und dem Auftreten von Mikrokernen in der Brusttumorzelllinie MCF-7 nach hormoneller Wachstumsstimulierung festgestellt wurde (Fischer et al., 2001). Davis et al. konnten ebenso eine Erhöhung Benzo[a]pyrene-induzierter Mikrokernraten bei einer gesteigerter Proliferation von MCF-7 Zellen durch Östradiolstimulation nachweisen (Davis et al., 2002).

Eine Erklärung für die Gründe und Ursachen einer erhöhten Mikrokernfrequenz nach Stimulation der hormonsensitiven Zellen zu einer gesteigerten Teilungsaktivität liegt möglicherweise in den Prozessen der Zellteilungs- und/ oder Zellzyklusregulation. Die Frage, ob und inwiefern sich die Zellteilungen der unbehandelten Zellen von denen der östradiolstimulierten Zellen unterscheiden, wurde daher in weiteren Experimenten versucht zu beantworten.

Bei diesen Experimenten wurden die Zellen gleichzeitig mit Östradiol und dem Zytokineseinhibitor Cytochalasin B behandelt. Durch die Inkubation der Zellen mit

Cytochalasin B entstehen bei einer Zellteilung doppelkernige Zellen (Fenech, 1993). Die Mikrokernauswertung erfolgte nur bei den doppelkernigen Zellen, wodurch sicher gestellt werden konnte, dass sich diese Zellen während der Testsubstanzzugabe genau einmal geteilt hatten. Es konnte davon ausgegangen werden, dass der 'spontane' chromosomale Schaden bei den unbehandelten Kontrollzellen und den stimulierten Zellen vor der Behandlung der Zellen mit Östradiol gleich hoch war. Deshalb müsste die Auswertung der Mikrokernrate nach genau einer Zellteilung bei beiden Zellpopulationen, den unbehandelten und den östradiolstimulierten Zellen, die gleiche Anzahl von Mikrokernen ergeben. Bei den durchgeführten Versuchen konnte jedoch bezogen auf jeweils 1000 Zellteilungen - es wurde die Mikrokernrate von 1000 doppelkernigen Zellen analysiert- wiederum nur eine Erhöhung der Mikrokernfrequenz bei den mit Östradiol behandelten Zellen festgestellt werden. Im Vergleich dazu lag die Mikrokernrate bei den unbehandelten Kontrollzellen auf dem Niveau der Spontanrate. Dieses Experiment unterstützt somit die Hypothese, dass Östradiol stimulierte Zellen eine „andere Art der Zellteilung“ durchführen als Kontrollzellen.

Neben der Mikrokerninduktion in den doppelkernigen Zellen wurde auch die Proliferation nach Östradiol- und Cytochalasin B - Behandlung analysiert. Dazu wurden 3 x 1000 Zellen gezählt und davon der Anteil der doppelkernigen Zellen bestimmt. Dabei zeigte sich bei den östradiolstimulierten Zellen ein um 1,5-fach höherer Anteil an Doppelkernigen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Von den Zellen, die mit Östradiol stimuliert wurden, hat in derselben Zeit ein erhöhter Anteil an Zellen, eine Mitose, mit dem davor stattfindenden Zellzyklus durchgeführt als bei den unbehandelten Zellen. Die Proliferation war beschleunigt. Diese Beobachtung lässt eine Beeinflussung oder Veränderung des Zellzyklus durch die Östradiolbehandlung vermuten, was für das Auftreten von Mikrokernen von Bedeutung zu sein scheint.

Hierdurch wurde die Frage nach der Bedeutsamkeit der zur Verfügung stehenden Zeit für den Durchlauf eines Zellzyklus in einer Situation der beschleunigten Teilungsaktivität in Bezug auf die Ursache einer genetischen Instabilität aufgeworfen.

Mit dem daraufhin erfolgten Zellzyklusanalyse-Experiment mit den BG-1 Zellen konnte ein Unterschied in der Länge der einzelnen Zellzyklusphasen bei den stimulierten und

unbehandelten Zellen gezeigt werden. Nach Ermittlung der Gesamtzellzyklusdauer aus den sich durch die Zellzahlmessungen ergebenden Wachstumskurven der östradiolstimulierten und lösungsmittelbehandelten Zellpopulationen wurde mit Hilfe der Ergebnisse der Zellzyklusanalyse die relative Dauer berechnet, welche die Zellen für die einzelnen Zellzyklusphasen benötigten (Alberts et al., 1986). Dabei bestätigte sich die naheliegende Annahme, dass die stimulierten Zellen auf Grund der deutlich verkürzten Gesamtzellzyklusdauer auch weniger Zeit für jede einzelne Zellzyklusphase benötigten. Eine verkürzte Gesamtzellzyklusdauer der stimulierten Zellen resultierte aus der hormonell induzierten Proliferationssteigerung. Während die mit Lösungsmittel behandelte Zellpopulation für die S-Phase durchschnittlich 10 % der Zeit der Gesamtzyklusdauer und für die G2/ M- Phase etwa 26 % der Zeit benötigte, betrug die Zeit der östradiolstimulierten Zellen für die S- Phase im Durchschnitt 18 % und für die G2/M- Phase 20 % der Gesamtzellzyklusdauer. Die verkürzte Verweildauer in der G2/M- Phase könnte zur Folge haben, dass die stimulierten, sich häufiger und schneller teilenden Zellen weniger Zeit für die Reparatur von aufgetretenen Genomschäden haben. Somit unterstreichen diese Ergebnisse des Zellzyklusanalyse-Experimentes noch einmal die Bedeutsamkeit der Zellteilungshäufigkeit und insbesondere der Dauer einer Zellteilung für die Ausbildung von Mikrokernen.

Neben dem Zeitfaktor im System der Zellzykluskontrolle und -regulation, in dem bei einem Zeitmangel eine suffiziente Reparatur möglicherweise nicht stattfindet, stellt sich jedoch ebenso die Frage nach der Funktion der Kontrollpunkte und Reparatursysteme innerhalb des Zellzyklus.

Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse gaben Informationen über die prozentualen Anteile der sich im Wachstum befindlichen Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen (G1/G0-, S- und G2/M-Phase). Im Verlauf der 312-stündigen Proliferationszeit gab es in der G1/G0- Phase nur einen geringen Unterschied zwischen den östradiolstimulierten und lösungsmittelbehandelten Zellen, wohingegen sich stets ein deutlich höherer Anteil an Zellen, die mit Östradiol behandelt wurden, in der S-Phase des Zellzyklus befand. Dieser Befund steht im Einklang mit der erhöhten Proliferationsrate, durch die stetig eine vermehrte DNA-Synthese stattfinden muss. Im Gegensatz dazu lag der Anteil an östradiolstimulierten Zellen in der G2/M-Phase während der gesamten Wachstumszeit

deutlich unter dem Anteil der unbehandelten Zellen. Der konstant um 6 % geringere Anteil an Zellen der östradiolstimulierten Zellpopulation in der G2/M-Phase und der Befund einer stetig erhöhten Mikrokernrate bei den stimulierten Zellen gegenüber den Lösungsmittelbehandelten Zellen im Verlauf dieses Experimentes passt zu der Annahme einer Störung des Checkpoints innerhalb der G2 -Phase, der für eine chromosomale Intaktheit des Genoms vor Beginn der Mitose verantwortlich ist. Möglicherweise ist dieser Kontrollpunkt bei einer beschleunigten Proliferation nicht voll funktionsfähig, so dass geschädigte Zellen ohne eine suffizient stattgefundene Reparatur in die Mitose übergehen. Dadurch steigen die Mikrokernzahlen.

Zhou et al. (2000) konnten zeigen, dass Koffein den G2/M-Checkpoint im Zellzyklus aufhebt (Zhou et al., 2000). In Übereinstimmung damit beschrieben Suganuma et al. (1999), dass eine Aufhebung des G2/M-Phasen Checkpoints Zellen empfindlicher gegenüber einer Induktion von DNA-Schäden machte (Suganuma et al., 1999). Dieser ist unter anderem für die Reparatur von aufgetretenen DNA-Schäden aus der zuvor stattfindenden S-Phase verantwortlich. Eine Störung im Ablauf des Zellzyklus als Grund für eine erhöhte Mikrokernrate hatten ebenso Stopper et al. (1994) in einer Arbeit angenommen (Stopper et al., 1994). Ein fehlendes Verharren von Zellen in der G1-Phase, also einem Überlaufen dieses Checkpoints, zeigte sich bei reparaturdefekten Zellen (Kastan et al., 1992). Dadurch werden aufgetretene DNA-Schäden nicht repariert und die Zellen führen ohne Behebung dieses Schadens die S-Phase durch.

Die Inzidenz von Mikrokernen scheint des weiteren von vielschichtigen DNA-Reparaturprozessen beeinflusst zu werden. Bei einer Inhibition der DNA-Reparatur, beispielsweise durch die Substanz Cytosin-Arabinosid, welche den DNA-Polymerisationsschritt der Exzisionsreparatur hemmt, konnte eine erhöhte Mikrokerninduktion festgestellt werden (Fenech und Neville, 1992). Ebenso wurde die Mikrokernrate in Zellen, welche durch chemische Karzinogene induziert wurde, bei gleichzeitiger Behandlung mit Koffein gesteigert (Kiefer und Wiebel, 1998). Die Autoren nehmen an, dass die DNA-Reparatur innerhalb des Zellzyklus durch Koffein beeinträchtigt ist. Eine verminderte DNA-Reparatur wurde auch nach Behandlung hormonabhängiger Leydig- Zellen mit DES (Diethylstilböstrol) beobachtet (DuMond et al., 2001). Zusätzlich beschrieben sie eine Verkürzung der Zellzyklusdauer.

Möglicherweise wurde die DNA- Reparatur direkt gehemmt oder es stand wegen der verkürzten Zellzyklusdauer für eine ausreichende Reparatur zu wenig Zeit zur Verfügung. Östradiol selbst wirkt aber nicht reparaturinhibierend (Coibion et al., 1989; Epstein und Smith, 1988). Somit lässt die hervorgerufene Situation beschleunigt durchgeführter Zellteilungen der östradiolstimulierten Zellen in der hier vorliegenden Arbeit ebenso eine Beeinträchtigung wichtiger Reparaturprozesse innerhalb des Zellzyklus mit der Folge einer erhöhten Mikrokernfrequenz vermuten.

Es gilt als allgemein anerkannt, dass Mikrokerne entweder aus Chromosomenbrüchen oder aus der Fehlverteilung eines oder mehrerer Chromosomen im Verlauf einer Mitose resultieren (Stopper und Müller, 1997). Beide Ereignisse sind für die Zelle mit dem Verlust von DNA aus dem Kern verbunden. Im ersten Fall finden sich Chromosomenfragmente, im zweiten ganze Chromosomen in den Mikrokernen. Der Nachweis einer dieser Möglichkeiten mit Hilfe der Methode der Immunfluoreszenzfärbung von Kinetochorproteinen lässt also Rückschlüsse auf die mögliche Entstehungsursache der Mikrokerne zu (Kirchner et al., 1995; Antoccia et al., 1991; Degrassi und Tanzarella, 1988). Diese Färbung kann die Kinetochorregion der Chromosomen - ein Proteinkomplex am chromosomalen Zentromer - mit Antikörpern aus dem Serum von Scleroderma Patienten, die an einem CREST-Syndrom erkrankt sind, und nachfolgender Bindung eines fluoreszenzmarkierten Anti- Human-Antikörpers darstellen. Somit kann gezeigt werden, ob sich ganze Chromosomen bzw. Chromatiden (Kinetochornachweis positiv) oder nur Bruchstücke davon (Kinetochornachweis negativ) in den Mikrokernen befinden. Der Nachweis von ganzen Chromosomen würde auf eine Störung des Spindelapparates während der Chromosomenverteilung in der Mitose hinweisen, Chromosomenfragmente deuten eher auf eine Störung im Ablauf der Zellzyklusphasen, möglicherweise insbesondere der G2-Phase.

Die genauere Untersuchung der Mikrokerne bei der östrogensensitiven Ovarialtumorzelllinie BG-1 fand nach Stimulation der Zellen mit Östradiol in niedriger, nicht toxischer, aber proliferationssteigernder Konzentration (100 pM) statt. Dabei zeigten sich 16,7 % kinetochorpositive Mikrokerne. Nach Inkubation der Zellen mit einer gentoxischen Konzentration Östradiol (30 μ M) ergaben sich 63,6%

kinetochorpositive Mikrokerne (Stopper et al., 2003). Zusätzlich wurden Mikrokerne nach Behandlung der Zellen mit dem in den Spindelapparat eingreifenden Hormon Diethylstilbestrol (DES) auf Kinetochorproteine untersucht. Dabei zeigten sich erwartungsgemäß 60,2% kinetochorpositive Mikrokerne. Aus der Literatur ist bekannt, dass Östradiol in hohen Konzentrationen ($>10 \mu\text{M}$) den Spindelapparat hemmt und zu Veränderungen der Chromosomanzahlen führt (Schuler et al., 1998; Wheeler et al., 1986; Eckert und Stopper, 1996). Diese Art des Genomschadens kann also getrennt werden von der Art von Genomschädigung, welche durch die Proliferationsstimulation mit niedrigen Konzentrationen an Östradiol mit Hilfe der Mikrokernauswertung in den BG-1 Zellen bei dieser Arbeit detektiert wurde. Die Theorie einer Störung in der G2-Phase ließe sich weiter untermauern.

Bei der Bildung von Mikrokernen auf Grund einer hohen Proliferationsrate besteht die Möglichkeit, dass es auf diese Weise zum Verlust wichtiger Gene kommt, welche für Proteine bzw. Enzyme kodieren, die für die Zellzyklusregulation oder Reparatur bedeutsam sind und infolge dieses Genverlustes überhaupt erst eine Dysregulation dieser Systeme auftreten kann. Denkbar wäre beispielsweise der Einschluss des p53 Gens oder Teilen davon in Mikrokernen. Dieses Tumorsuppressorgen besitzt eine zentrale Bedeutung u. a. im Bereich molekularer Vorgänge des Zellzyklus, der DNA-Reparatur, der Apoptose und damit der Mutagenese und Kanzerogenese (Soussi et al., 1994). Es ist bekannt, dass über 50 % aller menschlichen Tumoren ein mutiertes p53-Gen aufweisen. Neben dem p53-abhängigen G1-Phasen Stop nach DNA-Schädigung, spielt dieses Tumorsuppressorgen genauso eine Rolle bei den Signalwegen des G2/M-Phasen Checkpoints. Es wurde postuliert, dass p53 u.a. für die Dauer eines G2/M-Phasen Stops nach zytotoxischer Behandlung von Zellen verantwortlich sei (Hirose et al. 2001). Dies bedeutet, dass nach Ausfall der normalen p53-Funktion und somit einer Störung in der G2-Phase des Zellzyklus das Genom destabilisiert würde. Die Konsequenz daraus wäre ein gehäuftes Auftreten von Mutationen in verschiedenen Genen, was für die Tumorentstehung eine essentielle Bedeutung hat (Greenblatt et al., 1994).

Alle diese Erkenntnisse verdeutlichen noch einmal die Wichtigkeit einer funktionierenden Zellzyklus- und Zellteilungsregulation und damit im Zusammenhang stehend die Intaktheit der Reparatursysteme.

Daraus ergibt sich auch die Bedeutsamkeit der Aufklärung möglicher Veränderungen bei den molekularen Vorgängen der Signaltransduktion einer Zelle im Verlauf der Zellteilung und der einzelnen Zellzyklusphasen sowie das Interesse an Untersuchungen der phasenspezifischen Genregulationsmechanismen in einer Situation der erhöhten Teilungsaktivität durch hormonelle Proliferationsstimulierung. Es stellt sich die Frage, ob und welche Enzyme oder Proteine, die für die Regulation der Zellzykluskontrolle und/ oder der Reparatur von DNA-Schäden von eine Rolle spielen, bei einer beschleunigten Proliferation durch Aktivierung oder Repression bestimmter Gene hoch- oder herunterreguliert werden. Es wird z.B. eine Überexpression verschiedener Cykline in Tumoren beobachtet, woraus eventuell ursächlich Defekte bei den Zellzykluskontrollpunkten resultieren. Park et al. (2000) konnten in einer Arbeit nachweisen, dass eine Überexpression der Proteine cdc2 und cyclin B 1 zu einer Aktivierung der cdc2 Kinase führt, wodurch der p53 vermittelte G2/M-Arrest überlaufen wird (Park et al., 2000). Ebenso soll die Überexpression von Cdc25A, eine Phosphatase im Signaltransduktionsweg beim Übergang von der G1- in die S-Phase, den G1/S- Phasencheckpoint aufheben (Mailand et al., 2000). Die Identifikation und molekulare Analyse solcher Regulationsgene in einer Situation der gesteigerten, beschleunigten Proliferation muss zukünftig noch detailliert durchgeführt werden.

Die Arbeit versucht durch den Nachweis einer chromosomalen Instabilität infolge hormoneller Proliferationsstimulierung, einen Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese hormonabhängiger Tumoren zu leisten. Auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit sowie der bereits durchgeführten Studie mit der östrogenrezeptorpositiven Brusttumorzelllinie MCF-7 zu diesem Thema (Stopper et al., 2003; Fischer et al., 2001) stellt sich nun die Frage, ob eine chromosomale Instabilität nur durch die hormonelle Stimulation hormonsensitiver Zellen zur vermehrten und beschleunigten Zellteilung verursacht wird oder ob sich die Hypothese auch auf Situationen und Gewebe ausweiten lässt, in denen die Zellen durch andere Stimulatoren und Einflüsse eine gesteigerte Proliferation zeigen und infolgedessen vermehrt Chromosomenschäden entstehen. Aus der Literatur gibt es Hinweise dafür, dass sich sowohl die östrogenrezeptorpositive Brusttumorzelllinie MCF-7 als auch die BG-1 Zelllinie mit anderen Wachstumsfaktoren, zum Beispiel IGF (insulin- like- growth- factor) und EGF (epidermal- growth- factor), zu einer erhöhten Teilungsaktivität stimulieren lassen, da die Zellen auch Rezeptoren für diese Faktoren

besitzen (Baldwin et al., 1998; Hankinson et al., 1998; Dickson und Lippman, 1995). Der Nachweis einer Erhöhung der Mikrokernrate bei einer gleichzeitigen Zellzahlerhöhung durch Proliferationsstimulation mit Hilfe der Wachstumsfaktoren IGF und EGF wird im Labor dieser Arbeitsgruppe bereits untersucht. Ziel weiterer Forschungen wird es somit sein, zu prüfen, ob es ein allgemeingültiges Prinzip ist, und auch in anderen stark proliferierenden Geweben vermehrt Genomschäden auftreten, die ursächlich zur Entstehung von Krebs führen können. Die Tatsache, dass in den Lymphozyten von Patienten mit einer chronischen Immunerkrankung, deren B-Lymphozyten einem stetigen Proliferationsreiz ausgesetzt sind, eine erhöhte Mikrokernfrequenz nachgewiesen werden konnte (Herrström et al., 1998), spräche für einen solchen allgemeingültigen Zusammenhang zwischen der Teilungsaktivität und einer erhöhten chromosomalen Instabilität. Dazu passen auch die Beschreibungen eines erhöhten Brustkrebs- und Lymphomrisikos sowie erhöhter Tumorraten im blutbildenden System bei Allergikern (Mills et al., 1992; Mcworther, 1988). Bei diesen Studien und zahlreichen anderen epidemiologischen Untersuchungen, zum Beispiel über die Risikoabschätzungen der hormonabhängigen Krebsarten von Brust, Endometrium, Ovarien und Prostata, wurde die Proliferation mit einer Tumorentwicklung bereits kausal in Zusammenhang gebracht. In dieser Arbeit wurde jedoch versucht, mechanistische Zusammenhänge genauer aufzuzeigen. Damit konnten die Grundlagen geschaffen werden, molekulare Ursachen und Mechanismen der rezeptorabhängigen Karzinogenese zukünftig noch detaillierter zu analysieren.

5 Zusammenfassung

Ergebnisse vieler epidemiologischer Studien über die Risikoabschätzungen von Tumoren in hormonabhängiger Gewebe legen einen deutlichen Zusammenhang zwischen den Hormonen und dem Auftreten dieser Tumoren nahe. Dabei wird der zellproliferationssteigernde Effekt der Hormone im Rahmen des Mehrstufenkonzeptes der Kanzerogenese meist als Promotionsfaktor beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, dass die hormonelle Induktion einer erhöhten Zellteilungsrate auch primär zu einer genetischen Instabilität beiträgt, mit dem Ziel einen weiteren Mechanismus in der Pathogenese hormonabhängiger Tumoren aufzuklären.

Die östrogenrezeptorpositive Ovarialtumorzelllinie BG-1 und die rezeptornegativen UCI-107 Zellen wurden zunächst mit 17- β Östradiol in Konzentrationen von 0,1 pM bis 10 nM behandelt und anschliessend mit Hilfe des Mikrokerntests auf chromosomale Schäden untersucht. Die Anzahl der Mikrokerne diente als Maß für den chromosomalen Schaden. Die Bestimmung der Mikrokernrate bei den östrogensensitiven BG-1 Zellen zeigte, dass mit steigender Proliferationsinduktion auch die Mikrokernfrequenz konzentrationsabhängig erhöht war. Bei der Behandlung der BG-1 Zellen mit 17- β Östradiol in Kombination mit dem spezifischen Östrogenrezeptorantagonisten 4-Hydroxytamoxifen wurde die östradiolinduzierte rezeptorabhängige Proliferationsstimulation durch Hydroxytamoxifen gehemmt. Parallel dazu sank auch die Mikrokernrate. Bei vergleichbaren Versuchen mit der östrogeninsensitiven UCI-107 Zelllinie, bei der keine Effekte auf die Proliferation bei Behandlung der Zellen mit 17- β Östradiol alleine sowie in Kombination mit 4-Hydroxytamoxifen detektiert werden konnten, wurde auch keine Mikrokerninduktion beobachtet. Die Mikrokernauswertung bei der UCI-107 Zelllinie diente zum Ausschluss einer Genotoxizität von 17- β Östradiol und 4-Hydroxytamoxifen in den eingesetzten Konzentrationen. Diese Beobachtungen stellten sicher, dass sowohl die Proliferationssteigerung als auch die Mikrokerninduktion über einen rezeptorabhängigen Prozeß ablaufen und machten den Zusammenhang zwischen der Proliferation und dem Auftreten von Mikrokerneln deutlich.

Eine erhöhte Mikrokernfrequenz konnte wiederum ausschließlich in den östradiolstimulierten BG-1 Zellen festgestellt werden, als durch den Einsatz des Zytokineseinhibitors Cytochalasin B die Auswertung der Mikrokern auf jene Zellen normiert wurde, die genau eine Zellteilung durchgeführt hatten. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die östradiolstimulierten Zellen auf Grund der beschleunigten Proliferation eine „andere Art von Zellteilung“ durchführen.

In einem weiteren Abschnitt der Arbeit wurde der Einfluss der Östradiolstimulierung auf den Zellzyklus untersucht. Mittels eines FACScans konnten die prozentualen Zellzyklusphasenanteile (G1/ G0-, S- und G2/ M- Phase) der BG-1 Zellen zu verschiedenen Zeiten des Wachstums bestimmt werden. In der G1/ G0-Phase zeigte sich während der gesamten Proliferationszeit nur ein geringer prozentualer Unterschied zwischen den östradiolstimulierten und lösungsmittelbehandelten Zellpopulationen. In der S-Phase befand sich durchgehend ein höherer Anteil an östradiolstimulierten Zellen als an lösungsmittelbehandelten Zellen. Dieser Befund steht im Einklang mit der höheren und schnelleren Zellteilungsaktivität dieser Zellen, d.h. einer erhöhten DNA-Replikationsrate. Der Anteil an Zellen der östradiolstimulierten Zellpopulation in der G2/ M Phase war jedoch durchgehend um 6-8 % geringer gegenüber dem Anteil an Zellen, die mit Lösungsmittel behandelt wurden. Möglicherweise ist dies der Erklärungsansatz für das vermehrte Auftreten von Mikrokernen bei Östradiolstimulierung, da bekannt ist, dass es in der G2/ M-Phase einen wichtigen Kontrollpunkt innerhalb des Zellzyklus zur Detektion und Reparatur chromosomaler Schäden gibt. Zusätzlich ergab die Berechnung der Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen, dass die Zellen, die mit Östradiol stimuliert wurden, für jede Phase deutlich weniger Zeit benötigten. Die relative Gesamtzellzyklusdauer der östradiolstimulierten BG-1 Zellen war entsprechend auch kürzer als die Dauer eines Zellzyklus der mit Lösungsmittel behandelten Kontrollzellen, was erneut die schnellere Proliferation, die beschleunigte Zellteilung der Zellen durch die Östradiolstimulation zum Ausdruck brachte.

Unter der Annahme, dass die Zellen auf Grund der hormonellen Proliferationsstimulation durch den Zellzyklus „gejagt“ werden und demzufolge wichtige „Checkpoints“ im Zellzyklus überlaufen, ist eine gesteigerte Proliferationsrate somit für das Auftreten einer genetischen Instabilität mitverantwortlich.

6 Literatur

Adami, H.O., Persson, I., Ekblom, A., Wolk, A., Ponten, J., Trichopoulos, D. (1995) The aetiology and pathogenesis of human breast cancer. *Mutat. Res.*, 333, 29-35.

Adashi, E.Y. The ovarian cycle. In: Yen, S.S.C. and Jaffe, R.B. (eds), *Reproductive Endocrinology*, 181-237, W.B. Saunders, Philadelphia, PA, 1992.

Alberts, B., Bran, D., Lewis, L., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D.: *Zellwachstum und Zellteilung*. In: *Molekularbiologie der Zelle*, 679-747, VCH Verlagsgemeinschaft mbH, Weinheim, Deutschland, 1986.

Antoccia, A., Degrossi, F., Battistoni, A., Ciliutti, P., Tanzarella, C. (1991) In vitro micronucleus test with kinetochore staining: evaluation of test performance. *Mutagenesis*, 6 (4), 319-24.

Baldwin, W.S., Curtis, S.W., Cauthen, C.A., Risinger, J.I., Korach, K.S., Barrett, J.C. (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth in vitro. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 34 (8), 649-54.

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

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

Barrett, J.C. (1995) Mechanisms for species differences in receptor-mediated carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 333 (1-2), 189-202.

Beato, M. (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell.*, 56 (3), 335-44.

Benner, S.E., Wargovich, M.J., Lippman, S.M., Hong, W.K. (1993) Micronuclei: a potential intermediate marker for chemoprevention of aerodigestive tract cancer. *J. Cell. Biochem. Suppl.*, 17 F, 250-4.

- Berthois, Y., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S. (1986) Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83 (8), 2496-500.
- Bolton, J.L., Pisha, E., Zhang, F., Qiu, S. (1998) Role of quinoids in estrogen carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.*, 11 (10), 1113-27.
- Boyd, J.A., Barrett, J.C. (1990) Genetic and cellular basis of multistep carcinogenesis. *Pharmacol. Ther.*, 46 (3), 469-86.
- Cavalieri, E., Frenkel, K., Liehr, J.G., Rogan, E., Roy D. (2000) Estrogens as endogenous genotoxic agents- DNA adducts and mutations. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, (27), 75 - 93
- 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 labelling 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 intramembraneous inhibitors of lipidperoxidation. Evidence for peroxy 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.
- Degrassi, F., Tanzarella, C. (1988) Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the detection of aneuploidy. *Mutat. Res.*, 203 (5), 339-45.
- Dickson, R.B., Lippman, M.E. (1995) Growth factors in breast cancer. *Endocr. Rev.*, 16 (5), 559-89.

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. *Mutat. Res.*, 483 (1-2), 27-33.

Eckert, I., Stopper, H. (1996) Genotoxic effects induced by β -oestradiol In Vitro. *Tox. In Vitro*, 10, 637-42.

Elledge, S.J. (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*, 274 (5293), 1664-72.

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 Res.*, 48 (2), 297-303.

Feigelson, H.S. and Henderson, B.E. (1996) Estrogens and breast cancer. *Carcinogenesis*, 17, 2279-84.

Fenech, M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.*, 285 (1), 35-44.

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, W.H., 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), 209-12.

Garewal, H.S., Ramsey, L., Kaugars, G., Boyle, J. (1993) Clinical experience with the micronucleus assay. *J. Cell. Biochem. Suppl.*, 17F, 206-12.

Geisinger, K.R., Kute, T.E., Pettenati, M.J., Welander, C.E., Dennard, Y., Collins, L.A., Berens, M.E. (1998) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors. *Cancer*, 63 (2), 280-8.

Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., Harris, C.C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, 54 (18), 4855-78.

Hanawalt, P., Sarasin, A. (1986) Cancer-prone hereditary diseases with DNA processing abnormalities. *Trends Genet.*, 2, 124-9.

Hankinson, S.E., Willett, W.C., Colditz, G.A., Hunter, D.J., Michaud, D.S., Deroo, B., Rosner, B., Speizer, F.E., Pollak, M. (1998) Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet.*, 351,(9113), 1393-6.

Hartwell, L.H., Kastan, M.B. (1994) Cell cycle control and cancer. *Science*, 266 (5192), 1821-8.

Henderson, B.E., Ross, R.K., Pike, M.C., Casagrande, J.T. (1982) Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res.*, 42 (8), 3232-9.

Herrström, P., Bratt, I., Holmen, A., Hogstedt, B. (1998) Micronuclei in lymphocyte subsets in relation to immune proteins and allergic disease. *Mutat. Res.*, 405 (1), 35-40.

Highman, B., Greenman, D.L., Norvell, M.J., Farmer, J., Shellenberger, T.E. (1980) Neoplastic and preneoplastic lesions induced in female C3H mice by diets containing diethylstilbestrol or 17 beta-estradiol. *Int. J. Oncol.*, 17 (6), 1141-9.

Hirose, Y., Berger, M.S., Pieper, R.O. (2001) Abrogation of the Chk1-mediated G(2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells. *Cancer Res.*, 61 (15), 5843-9.

Kastan, M.B., Zhan, Q., El-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkert, B.S., Vogelstein, B., Fornace, A.J. Jr. (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 71 (4), 587-97.

Key, T.J. (1995) Hormones and cancer in humans. *Mutat. Res.*, 333 (1-2), 59-67.

Key, T.J. (1999) Serum estradiol and breast cancer risk. *Endocr. Relat. Cancer*, 6 (2), 175-80.

Kiefer, F., Wiebel, F.J. (1998) Caffeine potentiates the formation of micronuclei caused by environmental chemical carcinogens in V79 Chinese hamster cells. *Toxicol. Lett.*, 96-97, 131-6.

Kupfer, D., Mani, C., Lee, C.A., Rifkind, A.B. (1994) Induction of tamoxifen-4-hydroxylation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), beta-naphthoflavone (beta NF), and phenobarbital (PB) in avian liver: identification of P450 TCDDAA as catalyst of 4-hydroxylation induced by TCDD and beta NF. *Cancer Res.*, 54 (12), 3140-4.

Liehr, J.G. (2000) Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr. Rev.* 21 (1), 40-54.

Liehr, J.G., Stancel, G.M., Chorich, L.P., Bousfield, G.R., Ulubelen, A.A. (1986) Hormonal carcinogenesis: separation of estrogenicity from carcinogenicity. *Chem. Biol. Interact.*, 59 (2), 173-84.

Lopez-Otin, C., Diamandis, E.P. (1998) Breast and prostate cancer: an analysis of common epidemiological, genetic, and biochemical features. *Endocr. Rev.*, 19 (4), 365-96.

Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Welcker, M., Bartek, J., Lukas, J. (2000) Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science*, 288 (5470), 1425-9.

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

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.

Mitelmann, F. Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer. Wiley- Liss., N.Y. 1991

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. *Eur. J. Cancer*, 16 (12), 1583-9.

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

Park, M., Chae, H.D., Yun, J., Jung, M., Kim, Y.S., Kim, S.H., Han, M.H., Shin, D.Y. (2000) Constitutive activation of cyclin B1-associated cdc2 kinase overrides p53-mediated G2-M arrest. *Cancer Res.*, 60 (3), 542-5.

Pavlik, E.J., Nelson, K., van Nagell, J.R. Jr., Gallion, H.S., Donaldson, E.S., DePriest, P., Meares, K., van Nagell, J.R.3rd. (1991) The growth response of BG-1 ovarian carcinoma cells to estradiol, 4OH-tamoxifen, and tamoxifen: evidence for intrinsic antiestrogen activation. *Gynecol. Oncol.*, 42 (3), 245-9.

Peltomaki, P. (2001) Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum. Mol. Genet.*, 10 (7), 735-40.

Peltomaki, P. (2001) DNA mismatch repair and cancer. *Mutat. Res.*, 488 (1), 77-85.

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.

Rosin, M.P. (1993) Genetic alterations in carcinogenesis and chemoprevention. *Environ. Health Perspect.*, 101 Suppl 3, 253-6.

Roy, D., Liehr, J.G. (1999) Estrogen, DNA damage and mutations. *Mutat. Res.*, 424 (1-2), 107-15.

Royer, H.D., Grinstein, E., Janz, M. (1999) Regulation des Zellzyklus und therapeutische Implikationen. *Onkologe*, 5, 884-90.

Sager, R. (1989) Tumor suppressor genes: the puzzle and the promise. *Science*; 246 (4936), 1406-12.

Schiffmann, D., De Boni, 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.

Shimizu, H., Ross, R.K., Bernstein, L., Pike, M.C., Henderson, B.E. (1990) Serum oestrogen levels in postmenopausal women: comparison of American whites and Japanese in Japan. *Br. J. Cancer*, 62 (3), 451-3.

Schmitt, E., Dekant, W., Stopper, H. (2001) Assaying the estrogenicity of phytoestrogens in cells of different estrogen sensitive tissues. *Tox. In Vitro*, 15, 167-73.

Schmuck, G., Lieb, D., Wild, D., Schiffmann, D., Henschler, D. (1988) Charakterization of an in vitro micronucleus assay with Syrian hamster embryo fibroblasts. *Mutat. Res.*, 246, 113-22.

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 beta-estradiol in cultured human lymphocytes using multicolor fluorescence in situ hybridization. *Environ. Mol. Mutagen.*, 31 (3), 263-73.

Shackelford, R.E., Kaufmann, W.K., Paules, R.S. (1999) Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect.*, 107 Suppl 1, 5-24.

Shelby, M.D. (1988) The genetic toxicity of human carcinogens and its implications. *Mutat. Res.*, 234, 3-5.

Soussi, T., Legros, Y., Lubin, R., Ory, K., Schlichtholz, B. (1994) Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int. J. Cancer.*, 57 (1), 1-9.

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), 243-7.

Stopper, H., Müller, S.O. (1997) Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview. *Tox. In Vitro*, 11, 661-7.

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.

Strauss, G.H.S. (1991) Non random cell killing in cryopreservations: implication for performance of the battery of leukocyte tests (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat. Res.*, 283, 21-8.

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 Res.*, 59 (23), 5887-91.

Tsutsui, T., Maizumi, H., McLachlan, J.A., Barrett, J.C. (1983) Aneuploidy induction and cell transformation by diethylstilbestrol: a possible chromosomal mechanism in carcinogenesis. *Cancer Res.*, 43 (8), 3814-21.

Tucker, R.W., Barrett, J.C. (1986) Decreased numbers of spindle and cytoplasmic microtubules in hamster embryo cells treated with a carcinogen, diethylstilbestrol. *Cancer Res.*, 46 (4 Pt 2), 2088-95.

Wagener, C.: Entstehung und Progression maligner Tumoren. In: *Molekulare Onkologie: 2. Aufl.*, Georg Thieme Verl., Stuttgart, New York, 1999.

Weinberg, R.A. (1989) Oncogene, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.*, 49, 3713-23.

Weinert, T. (1998) DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair. *Cell.*, 94 (5), 555-8.

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, 1995. *CA Cancer J. Clin.*, 45 (1), 8-30.

Zhou, B.B., Chaturvedi, P., Spring, K., Scott, S.P., Johanson, R.A., Mishra, R., Mattern, M.R., Winkler, J.D., Khanna, K.K. (2000) Caffeine abolishes the mammalian G(2)/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-teleangiectasia-mutated kinase activity. *J. Biol. Chem.*, 275 (14), 10342-8.

7 Anhang

7.1 Optimierung des Phenolrot-Gehalts im Medium der BG -1 Zellen

Tabelle 2: Zellzahlen [10^5 Zellen/ ml] der östrogenrezeptorpositiven BG-1 Zelllinie bei Kultivierung der Zellen in fünf verschiedenen Medien bei Veränderung des Mischungsverhältnisses des phenolrotfreien und phenolrothaltigen Anteils im Medium und Inkubation der Zellen mit 200 pM 17- β Östradiol (E)

		Medium [% phenolrotfrei/ % phenolrothaltig]									
		100%/ 0%		90%/ 10%		75%/ 25%		50%/ 50%		0%/ 100%	
Zeit [h]	Zellzahl [10^5 / ml]										
	K	E	K	E	K	E	K	E	K	E	
0	0,74	0,74	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,62	0,74	
50	-	-	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,2	-	-	
97	-	-	1,3	2,4	1,9	2,7	1,9	2,7	-	-	
142	1,52	7,6	-	-	-	-	-	-	4,6	6,2	
167	-	-	3,3	8,8	4,6	8,8	4,9	8,1	-	-	
214	-	-	5,7	17,5	9,5	18,8	11,3	16	-	-	
265	-	-	8,9	20,8	15,5	26,5	17,2	22,4	-	-	

K: Kontrolle unbehandelt; E: 17- β -Östradiol (200 pM)

7.2 Proliferationsexperimente

Tabelle 3: Absolute Zellzahlen, Wachstumsfaktoren (Proliferation östradiolstimulierte/ unbehandelte Zellen) und Mikrokernzahlen der Wiederholungsversuche der Proliferationsstimulationsexperimente mit der östrogenrezeptorpositiven Ovarialtumorzelllinie BG-1

Substanz	Konzentration	Versuchs- Wdh.	Zellzahl [10 ⁵ / ml]	Wachstums- faktor	MK/ 1000 Zellen
Kontrolle	unbehandelt	1	2,3	1,0	27
		2	2,0	1,0	27
LK	0,1 % Ethanol	1	1,9	0,8	26
		2	1,7	0,9	32
Östradiol	1 pM	1	3,1	1,7	27
		2	3,9	1,6	28
	10 pM	1	6,3	2,7	39
		2	7,2	3,6	26
	100 pM	1	5,8	2,5	44
		2	9,3	4,7	49
	1000 pM	1	5,4	2,3	38
		2	8,4	4,2	38
10 nM		1	-	-	-
		2	-	-	-
MMC	0,02 µg/ ml	1	1,0	0,5	157
		2	1,9	0,97	43

Versuchs- Wdh.: Versuchswiederholung; LK: Lösungsmittelkontrolle; MMC: Mitomycin C, Positivkontrolle; MK: Mikrokerne/ 1000 Zellen

Tabelle 4: Absolute Zellzahlen, Wachstumsfaktoren (Proliferation östradiolstimulierte/ unbehandelte Zellen) und Mikrokernzahlen der Wiederholungsversuche der Proliferationsstimulationsexperimente mit der östrogenrezeptornegativen Ovarialtumorzelllinie UCI-107

Substanz	Konzentration	Versuchs- Wdh.	Zellzahl [10 ⁵ / ml]	Wachstums- faktor	MK/ 1000 Zellen
Kontrolle	Unbehandelt	1	8,7	1	17
		2	7,5	1	17
LK	0,1 % Ethanol	1	9,6	1,1	17
		2	9,1	1,2	18
Östradiol	1 pM	1	-	-	-
		2	-	-	-
	10 pM	1	-	-	-
		2	-	-	-
	100 pM	1	8,4	0,97	13
		2	8,8	1,2	23
	1000 pM	1	9,2	1,1	13
		2	9,3	1,24	19
10 nM		1	7,9	1,1	24
		2	-	-	-
MMC	0,02 µg/ ml	1	8,7	1	34
		2	8,6	1,2	29

Versuchs- Wdh.: Versuchswiederholung; LK: Lösungsmittelkontrolle; MMC: Mitomycin C, Positivkontrolle; MK: Mikrokerne/ 1000 Zellen

7.3 Einsatz des Östrogenrezeptorantagonisten 4-Hydroxytamoxifen

Tabelle 5: Zellproliferation und Mikrokerninduktion bei der östrogenrezeptorpositiven Ovarialtumorzelllinie BG-1; Darstellung der Ergebnisse des ersten Versuchs (Nr. 1), die im Ergebnisteil nicht abgebildet wurden, sowie der Ergebnisse des Wiederholungsexperiments (Nr. 2)

Substanz	Konzentration	Versuchs- Wdh.	Zellzahl [10 ⁵ / ml]	Wachstums- faktor	MK/ 1000 Zellen
Kontrolle	Unbehandelt	2	1,8	1,0	23
LK	0,1 % Ethanol	2	1,7	0,9	25
E	10 pM	2	5,3	2,9	42
	100 pM	2	7,1	4	44
OHT	0,1 nM	1	0,9	0,9	-
		2	1,8	1	-
	0,5 nM	2	2,5	1,4	26
	1,0 nM	2	2,3	1,3	28
E + OHT	10 pM + 0,1 nM	1	3,2	3,2	-
		2	-	-	-
	10 pM + 0,5 nM	2	3,1	1,7	26
	10 pM + 1,0 nM	2	2,8	1,6	25
	100 pM + 0,1 nM	1	4,3	4,3	-
		2	5,7	3,2	-
	100 pM + 0,5 nM	1	3,8	3,8	-
		2	5,5	3,1	-
	100 pM + 1,0 nM	1	4,5	4,5	-
		2	5,9	3,3	-
MMC	0,02 µg/ ml	2	2,6	1,4	70

LK: Lösungsmittelkontrolle; OHT: 4-Hydroxytamoxifen; E: 17-β Östradiol; MMC: Mitomycin C, Positivkontrolle; MK: Mikrokerne/ 1000 Zellen; Wachstumsfaktor: Proliferation östradiolstimulierte/ unbehandelte Zellen = relative Proliferation

Tabelle 6: Zellproliferation und Mikrokerninduktion bei der östrogenrezeptornegativen Ovarialtumorzelllinie UCI-107; Darstellung der Ergebnisse des ersten Versuchs (Nr. 1), die im Ergebnisteil nicht abgebildet wurden, sowie der Ergebnisse des Wiederholungsexperiments (Nr. 2).

Substanz	Konzentration	Versuchs- Wdh.	Zellzahl [10⁵/ ml]	Wachstums- faktor	MK/ 1000 Zellen
Kontrolle	unbehandelt	2	3,7	1,0	26
LK	0,1 % Ethanol	2	28	1,0	28
Östradiol	10 pM	2	3,9	1,04	22
	100 pM	2	3,6	0,98	27
OHT	0,1 nM	1	9,04	1,0	-
		2	3,9	1,03	-
	0,5 nM	2	4,0	1,07	20
	1,0 nM	2	3,9	1,03	22
E + OHT	10 pM + 0,1 nM	1	9,8	1,1	-
		2	3,9	1,05	-
	10 pM + 0,5 nM	2	4,1	1,09	20
	10 pM + 1,0 nM	2	4,1	1,09	28
	100 pM + 0,1 nM	1	9,8	1,1	-
		2	3,9	1,04	-
	100 pM + 0,5 nM	1	10,0	1,1	15
		2	3,9	1,04	21
	100 pM + 1,0 nM	1	9,8	1,1	15
		2	3,9	1,04	25
MMC	0,02/ ml	2	3,9	1,04	52

LK: Lösungsmittelkontrolle; OHT: 4-Hydroxytamoxifen; E: 17- β Östradiol; MMC: Mitomycin C, Positivkontrolle; MK: Mikrokern/ 1000 Zellen; Wachstumsfaktor: Proliferation östradiolstimulierte/ unbehandelte Zellen = relative Proliferation

7.4 Inhibierung der Zytokinese mit Cytochalasin B

Tabelle 7: Wiederholungsversuch des 'Cytochalasin B- Experiments' mit den BG-1 Zellen; Die Zellen wurde mit Cytochalasin B in einer Konzentration von 0,2 ng/ ml in Kombination mit den Testsubstanzen behandelt.

Cytochalasin B + Testsubstanz	Konz.	einkernige Zellen	doppelkernige Zellen	Anteil DK [%]	MK/ 1000 DK Zellen
Kontrolle	unbehandelt	385	570	59	64
Lösungsmittel	0,1% Ethanol	358	664	65	69
Östradiol	100 pM	327	698	69	108
Mitomycin C	0,02 µg / ml	328	662	67	88

Mitomycin C: Positivkontrolle; DK: doppelkernige Zellen; MK: Mikrokerne

Tabelle 8: Ergebnisse der 'Cytochalasin B- Versuche' mit der östrogenrezeptornegativen UCI-107 Zelllinie, welche im Ergebnisteil nicht dargestellt wurden. Die Zellen wurden mit Cytochalasin B in einer Konzentration von 0,2 ng/ ml in Kombination mit den Testsubstanzen behandelt.

Cytochalasin B + Testsubstanz	Nr.	Konz.	einkernige Zellen	doppelkernige Zellen	Anteil DK [%]	MK/ 1000 DK
Kontrolle	1	unbehandelt	221	729	69	52
	2		190	701	70	44
Lösungsmittel	1	0,1%Ethanol	225	727	70	59
	2		205	728	70	45
Östradiol	1	100 pM	208	726	69	54
	2		232	743	69	47
Mitomycin C	1	0,02 µg/ ml	229	720	70	80
	2		212	796	74	61

Nr.: Versuchswiederholungsnummer; Konz.: Konzentration; Mitomycin C: Positivkontrolle; DK: doppelkernige Zellen; MK: Mikrokerne

7.5 Zellzyklusanalyse

Tabelle 9: Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse des Wiederholungsversuchs mit zwei unabhängigen Replika von dem Zellzyklusanalyse- Experiment mit der östrogenrezeptorpositiven BG-1 Zelllinie; Die Zellen wurden mit Lösungsmittel (0,1 % Ethanol) oder mit 17- β Östradiol (100 pM) behandelt. Zu den angezeigten Zeiten erfolgte die Zellzahlmessung, die Mikrokernauswertung und die Zellzyklusanalyse.

Zeit [h]	Zellzahl [10^5 / ml]		Wachstumsfaktor		MK/ 1000 Zellen		Zellzyklusphasenanteil [%]					
	LK	E	LK	E	LK	E	G1/G0	S	G2/M	G1/G0	S	G2/M
	LK	E	LK	E	LK	E	LK			E		
0	0,88	0,88	-	-	-	-	40	16	44	40	16	44
22	1,04	1,04	1	1	66	66	-	-	-	-	-	-
96	3,2	6,22	1	2	23	38	65	8	27	65	19	16
118	2,3	4,9	1	2,1	19	31	61	12	27	50	34	17
148	3,3	9,01	1	2,8	25	42	66	9	25	62	18	20
167	3,12	13,2	1	4,2	19	31	69	1	31	74	5	22
218	7,1	21,7	1	3,1	17	38	72	0,1	27	68	12	21
260	7,7	41,9	1	5,4	18	47	77	0	23	75	7	17
309	8,5	-	-	-	18	-	75	0	25	-	-	-
355	7,34	-	-	-	-	-	75	2	23	-	-	-
427	7,0	-	-	-	-	-	74	0	27	-	-	-

MK: Mikrokerne/ 1000 Zellen; LK: Lösungsmittelkontrolle (0,1% Ethanol); E: 17- β Östradiol (100 pM)
Wachstumsfaktor: Proliferation östradiolstimulierte/ unbehandelte Zellen = relative Proliferation

Danksagung

Die vorliegende Promotionsarbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg, Lehrstuhl für Toxikologie (Vorstand: Professor Dr. W. K. Lutz) unter der Anleitung von Frau Professor Dr. Stopper durchgeführt.

Mein größter Dank gilt Frau Professor Helga Stopper und Privatdozent Dr. Wolfgang Fischer, den Initiatoren dieser Arbeit, für die hervorragende, intensive und geduldige Betreuung, sowie für die vielen wertvollen und hilfreichen Gespräche. Ihre Bereitschaft, für Probleme, Fragen und Ergebnisse meiner Arbeit immer ansprechbar gewesen zu sein, war für mich eine bedeutende Unterstützung und Erleichterung.

Bedanken möchte ich mich besonders herzlich bei Dr. rer. nat. Elmar Schmitt, der mich während der praktischen Arbeitszeit im Labor betreut hat. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat hilfreich zur Seite. Die Planung und Durchführung der zahlreichen Experimente lief Hand in Hand. Die Zusammenarbeit mit Elmar hat großen Spaß gemacht.

Des weiteren danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Professor Stopper und PD Dr. Fischer, die mich ebenso stets bei allen Problemen und Fragen tatkräftig unterstützten und die für die freundschaftliche und herzliche Atmosphäre im Labor sorgten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Caroline Göntje Eliza Gregor
Geburtsdatum: 11.03.1976
Geburtsort: Berlin
Familienstand: ledig
Wohnort: Im Rotbad 15
D-72076 Tübingen
Eltern: Professor Dr. med. Michael Gregor; Arzt
Gundalena Gregor, geb. Brandi; Ärztin
Geschwister: Christiane, Sebastian und Nikolas

Schulische Ausbildung

08/ 1982 - 07/ 1988 Rothenburggrundschule in Berlin- Steglitz
08/ 1988 - 02/ 1993 Fichtenberg-Gymnasium in Berlin- Steglitz
02/ 1993 - 06/ 1995 Kepler-Gymnasium in Tübingen, Abschluss Abitur

Berufliche Ausbildung

11/ 1995 - 05/ 1996 Freiwilliges Soziales Jahr mit Einsatz in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik in Tübingen
05/ 1996 - 04/ 1999 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
03/ 1998 Ärztliche Vorprüfung
03/ 1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit 05/ 1999 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
04/ 2000 - 09/ 2001 Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg (Lehrstuhl für Toxikologie)
03/ 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/ 2002 - 04/ 2003 Praktisches Jahr in Würzburg, Brixen (Südtirol) und Aarau (Schweiz)
05/ 2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
ab 09/ 2003 Tätigkeit als Ärztin im Praktikum (ÄIP) am Krankenhaus Barmherzige Brüder Regensburg, Abteilung für Internistische Onkologie und Hämatologie

Würzburg, 25. Juni 2003