

**Einfluss einer definierten
Enzymausstattung auf die Mutagenität
von 17 β -Estradiol und dessen
Metaboliten**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Staatl. gepr. Dipl.-Lebensmittelchemikerin

Daniela Martínez Jaramillo

aus Quito-Ecuador

Würzburg 2013



Einfluss einer definierten Enzymausstattung auf die Mutagenität von 17 β -Estradiol und dessen Metaboliten

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Staatl. gepr. Dipl.-Lebensmittelchemikerin

Daniela Martínez Jaramillo

aus Quito-Ecuador

Würzburg 2013

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter: Prof. Dr. L. Lehmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. M. Metzler

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: Prof. Dr. L. Lehmann
2. Prüfer: Prof. Dr. Dr. M. Metzler
3. Prüfer: Prof. Dr. H. Stopper

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Erklärung

gemäß § 4 Abs. 3 Nr. 3, 6 und 9 der Promotionsordnung für die Fakultät für Chemie und Pharmazie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vom 1. Oktober 2001, geändert durch Satzung vom 7. Oktober 2002 und durch Satzung vom 14. November 2005

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate deutlich kenntlich gemacht zu haben.

Weiterhin erkläre ich, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsfach vorgelegen hat.

Ich erkläre außerdem, dass ich außer dem im Zulassungsgesuch urkundlich nachgewiesenen akademischen Grad keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den 09.12.2013

Daniela Martínez Jaramillo

Danksagung

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Leane Lehmann für die Überlassung des interessanten Themas, die sehr lehrreiche Zeit und die wertvollen Anregungen und Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Harald Esch für seinen Rat bei technischen und fachlichen Fragen.

Katja Schmalbach, Sabrina Jäger, Anne Schlechtweg (für ihre Hilfe bei der Zellzahlbestimmung und Zellfixierung im Rahmen der HPRT-Tests), Jan Fuchs (der bei allen Computerproblemen eine Lösung wusste), Carolin Pfenning (für ihre Hilfe bei den HPLC-Messungen und die Erklärung der Software), Markus Zettner (für die Einweisung in die GC/MS/MS), Susanne Futh (für ihre Hilfe bei der Reparatur und Wartung der GC/MS/MS, bei Analytikfragen und für die tolle Zeit im Labor und Büro), und insbesondere Annette Albrecht (meine HPRT-Partnerin, die mit mir viele Stunden in der Zellkultur verbracht hat, für ihre Hilfe bei Partec-, Endnote- Powerpoint- und Originfragen, das Korrekturlesen mehrerer Passagen dieses Manuskripts und das stets offene Ohr für Problemen aller Art).

Meinen F-Praktikanten Sabrina Kern und Bernhardt Falk sowie meinen WAASIS Gabriele Gofferjé, Michaela Kübler, Nicolai Höfert und Tina Simon für ihre engagierte Mitarbeit im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeiten.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion.

Meinen Eltern, die immer an mich geglaubt haben.

Joachim für seine Geduld und Fürsorge während der Entstehung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Estrogen-vermittelte Kanzerogenese in der Brust.....	1
1.2 Mutagenitätstests	6
1.2.1 Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Test.....	6
1.2.2 Mikrokerntest.....	7
2 Problemstellung.....	9
3 Material und Methoden.....	11
3.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen.....	11
3.1.1 Geräte.....	11
3.1.2 Chemikalien.....	13
3.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	15
3.1.4 Puffer und Lösungen	16
3.1.5 Zellkultur.....	20
3.2 Methoden	21
3.2.1 Auftauen von V79-Zellen.....	21
3.2.1.1 Lösungen	21
3.2.1.2 Durchführung	21
3.2.2 Passagieren von V79-Zellen	21
3.2.2.1 Lösungen	21
3.2.2.2 Durchführung	21
3.2.3 Elektronische Zellzahlbestimmung mittels CASY.....	22
3.2.3.1 Lösungen	22
3.2.3.2 Durchführung	22
3.2.4 Ausstreuen von V79-Zellen.....	23
3.2.4.1 Lösungen	23
3.2.4.2 Durchführung	23
3.2.5 Inkubieren von V79-Zellen.....	24
3.2.5.1 Lösungen	24
3.2.5.2 Durchführung	24
3.2.6 Bestimmung der Spontanmutantenfrequenz.....	24
3.2.6.1 Lösungen	24
3.2.6.2 Durchführung	25
3.2.7 Hemmung der COMT-Aktivität mittels OR-486	25
3.2.7.1 Lösungen	25
3.2.7.2 Durchführung	26
3.2.8 HPRT-Test.....	26
3.2.8.1 Lösungen	26

Inhaltsverzeichnis

3.2.8.2	Durchführung	26
3.2.9	Modifizierter HPRT-Test	28
3.2.9.1	Lösungen	28
3.2.9.2	Durchführung	28
3.2.10	Mikrokerntest	30
3.2.10.1	Lösungen	30
3.2.10.2	Durchführung	30
3.2.11	Bestimmung der Zellzyklusverteilung	31
3.2.11.1	Lösungen	31
3.2.11.2	Durchführung	31
3.2.12	Aufarbeitung der Proben mittels Festphasenextraktion	32
3.2.12.1	Lösungen	32
3.2.12.2	Durchführung	32
3.2.13	Synthese der Methylcatechole	33
3.2.13.1	Lösungen	33
3.2.13.2	Durchführung	33
3.2.14	Analyse von E1, E2 und dessen Metaboliten mittels GC/MS/MS	35
3.2.14.1	Analysebedingungen	35
4	Ergebnisse und Diskussion	38
4.1	Vorversuche zum HPRT-Test	38
4.1.1	Zytotoxizität von 4-HO-E2 in V79-Zellen	39
4.1.2	Zytotoxizität von 2-HO-E2 in V79-Zellen	40
4.1.3	Koloniebildungsfähigkeit und Spontanmutantenfrequenz von V79-Zellen, V79 hCYP1A1- und V79 hCYP1B1-Zellen	41
4.1.4	Bestimmung der Response von E2, dessen Catecholderivaten und Methylcatecholen	43
4.1.5	Interne Standards zur Quantifizierung von E2, dessen Catecholderivaten und Methylcatecholen	44
4.1.5.1	Synthese eines Standardgemisches aus 2-HO-, 2-MeO- und 3-OMe-2-HO-E2	46
4.1.5.2	Synthese eines Standardgemisches aus 4-HO-, 4-MeO- und 3-OMe-4-HO-E2	48
4.1.5.3	Wiederfindung der internen Standards	50
4.1.6	Metabolitenverteilung zwischen Zellen und Kulturmedium	53
4.1.7	Optimierung des Probevolumens für die Festphasenextraktion	56
4.1.8	Hemmung der COMT-Aktivität	59
4.1.8.1	Zytotoxizität von OR-486 in V79-Zellen	61
4.1.8.2	Ermittlung einer OR-486-Konzentration zur maximalen Reduktion der COMT-Aktivität in V79-Zellen	62
4.2	HPRT-Test	64
4.2.1	HPRT-Test mit 2-HO-E2	66
4.2.1.1	Akute Zytotoxizität	66

Inhaltsverzeichnis

4.2.1.2	Zellproliferation bis zum Zeitpunkt der Selektion	68
4.2.1.3	Mutantenfrequenz und Plating Efficiency 2	69
4.2.2	HPRT-Test mit 4-HO-E2	72
4.2.2.1	Akute Zytotoxizität	72
4.2.2.2	Zellproliferation bis zum Zeitpunkt der Selektion	75
4.2.2.3	Mutantenfrequenz und Plating efficiency 2	76
4.2.3	HPRT-Test mit E2	78
4.2.3.1	Akute Zytotoxizität	81
4.2.3.2	Zellproliferation bis zum Zeitpunkt der Selektionen	81
4.2.3.3	Mutantenfrequenz und Plating efficiency 2	83
	Mutantenfrequenz und Plating efficiency 2 nach Behandlung mit 0,1 μ M E2	84
4.3	Bestimmung des Metabolitenprofils im Kulturmedium	87
4.3.1	Metabolitenprofil in V79-Zellen nach Behandlung mit 2-HO-E2	88
4.3.2	Metabolitenprofil in V79-Zellen nach Behandlung mit 4-HO-E2	94
4.3.3	Metabolitenprofil in V79 hCYP1A1-Zellen nach Behandlung mit E2	98
	4.3.3.1 Metabolitenprofil in V79 hCYP1A1-Zellen nach Behandlung mit 0,1 μ M E2	105
4.4	Mikrokerntest	109
4.4.1	Induktion von Mikrokernen durch 2-HO-E2	109
4.4.2	Induktion von Mikrokernen durch 4-HO-E2	112
4.4.3	Induktion von Mikrokernen durch E2	114
4.5	Zellzyklusverteilung	117
4.5.1	Einfluss von 2-HO-E2 auf den Zellzyklus	118
4.5.2	Einfluss von 4-HO-E2 auf den Zellzyklus	121
4.5.3	Einfluss von E2 auf den Zellzyklus	124
5	Zusammenfassung	128
6	Summary	132
Anhang	VII
Literaturverzeichnis	XLVI
Lebenslauf	LIV

Abkürzungsverzeichnis

2-HO-E2	2-Hydroxyestradiol
4-HO-E2	4-Hydroxyestradiol
2-MeO-E2	2-Methoxyestradiol
4-MeO-E2	4-Methoxyestradiol
3-OMe-2-HO-E2	3-O-Methyl-2-Hydroxyestradiol
3-OMe-4-HO-E2	3-O-Methyl-4-Hydroxyestradiol
6-TG	6-Thioguanin
Abb.	Abbildung
Ade	Adenin
AP-Stelle	Apurine/Apyrimidine Stelle
ATP	Adenosintriphosphat
BaP	Benzo[a]pyren
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid + 1% Trimethylchlorsilan
ChAN	Cholestan
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COMT ^L	<i>low activity</i> COMT
COMT ^H	<i>high activity</i> COMT
CYP	Cytochrom P450- abhängige Monooxygenase
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E1	Estron
E2	17 β -Estradiol
E2-2,3-Q	17 β -Estradiol-2,3-Chinon
E2-3,4-Q	17 β -Estradiol-3,4-Chinon
EC ₅₀	Effektive Konzentration
engl.	Englisch
ER	Estrogen-Rezeptor
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
Gua	Guanin
h	human
HELA-Zellen	Menschliche Zellen des Zervixkarzinoms

Abkürzungsverzeichnis

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
M	Mol/l
MDA	Malondialdehyd
MB-COMT	Membrangebundene (<i>membrane bound</i>)COMT
MeOH	Methanol
MK	Mikrokern
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MF	Mutantenfrequenz
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
n.a.	nicht auswertbar
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ EDTA	Dinatriummethylen-diamintetraacetat
n.b.	nicht bestimmt
n.n.	nicht nachgewiesen
NQO	4-Nitrochinolin-N-oxid
OR-486	3,5-Dinitrocatechol
8-Oxo-dG	8-Oxo-7,8-Dihydrodeoxy-Guanosin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBS-CMF	Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Calcium und Magnesium (<i>phosphate-buffered-saline-calcium magnesium free</i>)
PE	Koloniebildungsfähigkeit (<i>Plating efficiency</i>)
PVF	Peakflächenverhältnis
Q	Chinon
SAM	S-Adenosylmethionin
S-COMT	Lösliche (<i>soluble</i>) COMT
SD	Sprague Dawley
SHE-Zellen	Syrische Hamsterembryozellen
SMF	Spontanmutantenfrequenz
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis (<i>signal to noise</i>)
SPE	Festphasenextraktion (<i>solid phase extraction</i>)

Abkürzungsverzeichnis

SQ	Semichinon
STABW	Standardabweichung
SULT	Sulfotransferase
UG	Uridin-5'-Diphospho-Glucuronosyl-Transferase
UV	Ultraviolett
V	Versuch
V79-Zellen	Lungenfibroblasten männlicher chinesischer Hamster
VF	Verdünnungsfaktor

1 Einleitung

Jährlich sterben weltweit circa 500 000 Frauen an den Folgen von Brustkrebs (IARC, 2010). Eine wichtige Rolle bei der Entstehung dieser Krankheit spielt die kumulative Exposition gegenüber dem weiblichen Sexualhormon 17β -Estradiol (E2). Mögliche Mechanismen sind zum einen die Estrogenrezeptor-vermittelte Stimulierung der Zellproliferation und zum anderen die brustgewebsspezifische Bildung reaktiver Metaboliten. Letztere können entweder indirekt (über Redox Cycling und die daraus entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies) oder direkt (durch Adduktbildung mit der DNA) genotoxisch und/oder mutagen wirken (zusammengefasst von Cavalieri und Rogan, 2011). Sowohl auf die brustgewebsspezifische Bildung dieser Metabolite als auch deren Wirkung wird im Folgenden näher eingegangen.

1.1 Estrogen-vermittelte Kanzerogenese in der Brust

In extrahepatischem Gewebe, wie der Brust, wird E2 durch die humanen Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP) Isoenzyme 1A1 (hCYP1A1) und 1B1 (hCYP1B1) zu 2- und 4-HO-E2 oxidiert (Abb. 1) und vorrangig durch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) zu 2-Methoxy-E2 (2-MeO-E2), 3-OMethyl-2-HO-E2 (3-OMe-2-HO-E2), 4-MeO-E2 und 3-OMe-4-HO-E2 entgiftet (zusammengefasst von Cavalieri und Rogan, 2011).

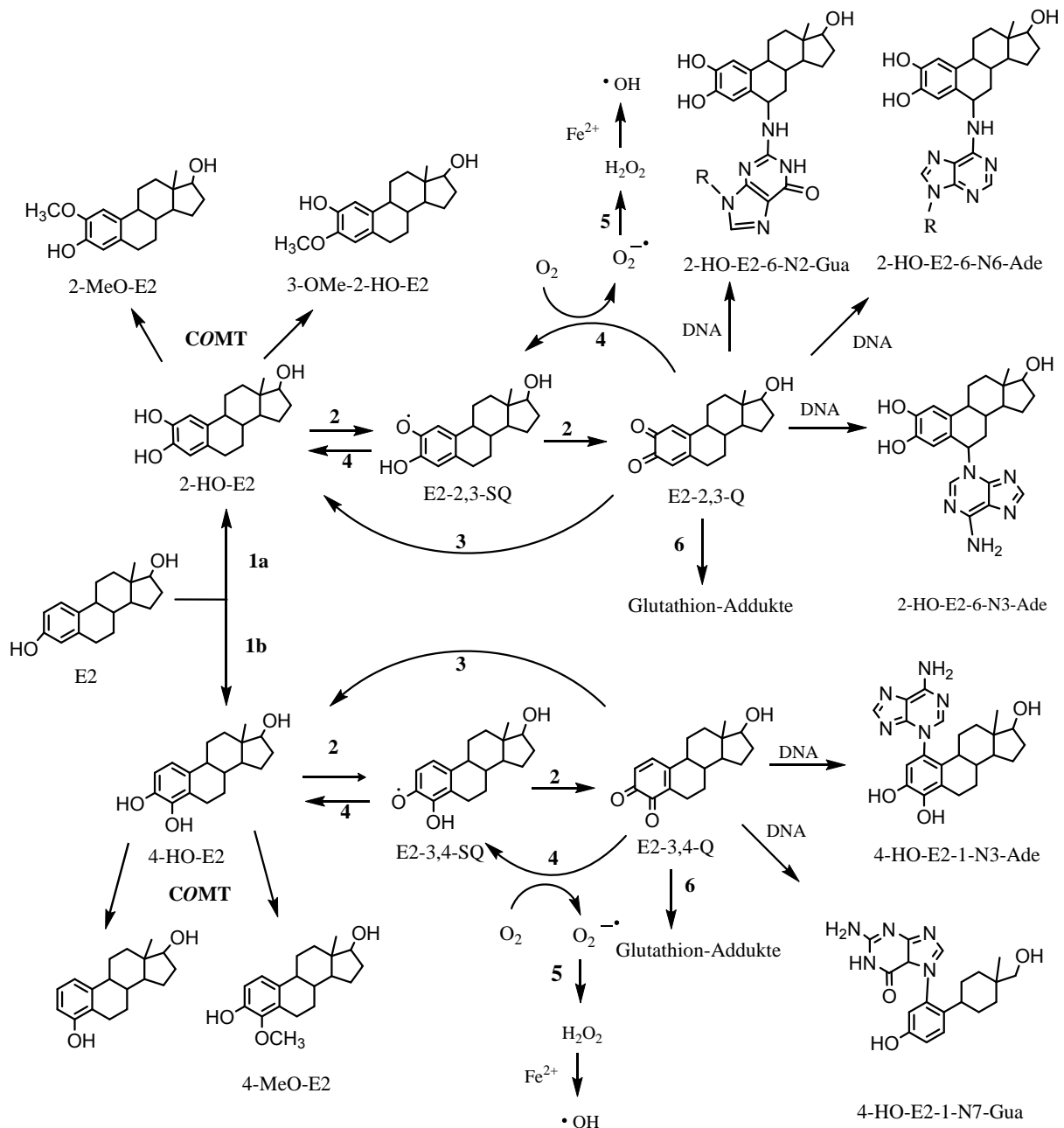


Abb. 1: Schema des E2-Metabolismus in der Brust, modifiziert nach Cavalieri und Rogan (2011) und Stack et al.(2008). **1a**: CYP1A1, **1b**: CYP1B1, **2**: Peroxidasen, CYPs oder Cu^{2+} -Ionen, **3**: Chinon-Reduktase, **4**: CYP-Reduktase, **5**: Superoxid-Dismutase, **6**: Glutathion-S-Transferase.

Wenn die Konjugation dieser Catecholestrogene über O-Methylierung unzureichend wird, können radikalische Intermediate (Semichinone) gebildet werden, die aufgrund ihrer Struktur Redox Cycling betreiben können. Hierbei übertragen sie ihr ungepaartes Elektron auf molekularen Sauerstoff, wobei Superoxidradikal-Anionen ($\text{O}_2^{\bullet -}$) entstehen (Abb. 1). Durch Superoxid-Dismutase werden diese abgefangen, indem sie zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid umgesetzt werden. Letzteres kann über die Fenton Reaktion, unter der katalytischen Wirkung von Fe^{2+} , in hochreaktive Hydroxylradikale überführt werden

(zusammengefasst von Fussell et al., 2011). Diese sind in der Lage, zelluläre Bestandteile, wie Lipide (Marnett, 1999), Proteine und DNA (Marnett et al., 2003) zu schädigen.

So entsteht zum Beispiel bei der Hydroxylradikal-vermittelten Lipidperoxidation Malondialdehyd (MDA), welches mit der DNA Addukte bildet. MDA-DNA-Addukte wurden in der Niere und Leber syrischer Hamster nach E2-Behandlung (Wang und Liehr, 1995) und in Brustgewebe von Krebspatienten (in statistisch signifikant erhöhter Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe) nachgewiesen (Wang et al., 1996).

Ferner können Hydroxylradikale mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA reagieren und hierbei die Entstehung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen induzieren (Marnett, 2000). So induzierte E2 DNA-Einzelstrangbrüche *in vivo*, in der Niere und Prostata von Hamstern und Ratten (Han und Liehr, 1994b; Ho und Roy, 1994), und *in vitro*, beispielsweise in MCF-7 Zellen (Han und Liehr, 1994b). Auch 4-HO-E2, jedoch nicht 2-HO-E2, induzierte DNA-Einzelstrangbrüche in der Niere syrischer Hamster. *In vitro* wurde die Induktion von Einzelstrangbrüchen durch beide Catechole beispielsweise in ER-positiven und -negativen Brustkrebszelllinien nachgewiesen (Rajapakse et al., 2005).

Darüber hinaus führen Hydroxylradikale zur Oxidation von DNA-Basen in folgender Reihenfolge: Guanin > Adenin > Cytosin > Thymin (Melvin et al., 1998). Guanin wird bevorzugt oxidiert, da es das niedrigste Ionisierungspotential besitzt (Cadet et al., 1999). Hierbei entsteht 8-Oxo-7,8-Dihydrodeoxy-Guanosin (8-Oxo-dG, zusammengefasst von Marnett, 2000), welches sich als Biomarker für oxidative Schäden eignet. Erhöhte 8-Oxo-dG-Spiegel wurden zum Beispiel *in vivo*, in der Niere syrischer Hamster, nach Behandlung mit 4-HO-E2, jedoch nicht mit 2-HO-E2 beobachtet (Han und Liehr, 1994a). Auch *in vitro* wurden erhöhte 8-Oxo-dG-Spiegel nach Umsetzung von mikrosomaler Hamster-DNA mit 4-HO-E2, jedoch nicht mit 2-HO-E2, induziert (Han und Liehr, 1995).

Die zuvor genannten DNA-Läsionen (Einzel-, Doppelstrangbrüche und die Oxidation von DNA-Basen) sind insofern relevant, dass sie in der Lage sind, mutagene Veränderungen im Genom hervorzurufen, die letztendlich die Tumorentstehung begünstigen können (zusammengefasst von Roy und Liehr, 1999).

Eine weitere Reaktionsmöglichkeit der Semichinone ist ihre weitere Oxidation zu den entsprechenden Chinonen (2-HO-E2 zu E2-2,3-Chinon (E2-2,3-Q) und 4-HO-E2 zu E2-3,4-Q, Abb. 1). Diese kann sowohl enzymatisch, durch CYPs und/oder Peroxidasen (Liehr, 1990), als auch nicht-enzymatisch, zum Beispiel durch Cu^{2+} -Ionen (Li et al., 1994; Wang et al., 2010), erfolgen. Anschließend können die gebildeten Catecholestrogen-Chinone durch Konjugation mit Glutathion entgiftet werden oder aber mit der DNA reagieren und damit die Brustkrebsentstehung fördern (zusammengefasst von Cavalieri und Rogan, 2011).

So reagiert E2-3,4-Q über eine 1,4-Michael-Addition mit der DNA, bei der $\geq 99\%$ Addukte am N3 von Adenin (Ade) und am N7 von Guanin (Gua) gebildet werden (Abb. 1). Während das N7-Gua-Addukt eine Halbwertszeit von 6-7 h aufweist, wird das N3-Ade-Addukt sofort aus dem DNA-Rückgrat entfernt und führt dadurch zur Entstehung apuriner Stellen (AP-Stellen). Durch Fehlreparatur dieser AP-Stellen kann es zur Entstehung von Mutationen kommen, die die Krebsinitiation begünstigen (zusammengefasst von Cavalieri und Rogan, 2010; IARC, 2012). Um die Mutagenität der oben genannten Addukte nachzuweisen, untersuchten Chakravarti et al. (2001) und Mailander et al. (2006) die DNA-Adduktspiegel sowie die Mutationenspektren im *H-ras* Gen von SENCAR-Mäusen und ACI-Ratten nach Behandlung mit E2-3,4-Q. Obwohl in beiden Tiermodellen die depurinierenden N3-Ade- und N7-Gua-Addukte zu etwa gleichen Anteilen gebildet wurden, wies deren Mutationsspektrum vorrangig A:T \rightarrow G:C Mutationen auf, was für das höhere mutagene Potential des N3-Ade-Addukts spricht. Die hier gezeigte Mutagenität der depurinierenden Addukte von E2-3,4-Q deckt sich mit Beschreibungen von Zhao et al. (2006), nach denen seine Vorläufersubstanz, 4-HO-E2, schwach mutagen in Big Blue® Ratten und in Big Blue® Rattenembryozellen wirkte. Auch hier wies das Mutationsspektrum der behandelten Tiere beziehungsweise Zellen überwiegend Mutationen in den A:T-Basenpaaren auf. Dass 4-HO-E2 nicht nur mutagen, sondern auch kanzerogen ist, wurde in verschiedenen Nagetier-Modellen und –Organen gezeigt, unter anderem im Uterus weiblicher neugeborener CD1-Mäuse und in der Niere männlicher syrischer Hamster (zusammengefasst von Cavalieri und Rogan, 2011). Die Datenlage ist aber auch widersprüchlich. So induzierte 4-HO-E2 keine Tumoren in der Brustdrüse von ACI-Ratten (Turan et al., 2004) und im *hprt*-Lokus von Embryozellen syrischer Hamster (SHE-Zellen, Tsutsui et al., 2000b).

Im Gegensatz zur Umsetzung von DNA mit E2-3,4-Q werden bei der Umsetzung von DNA mit E2-2,3-Q vorwiegend DNA-Addukte mit den exozyklischen Aminogruppen von Ade und Gua (2-HO-E2-6-N6-Ade und 2-HO-E2-6-N2-Gua, Abb. 1) gebildet. Im Vergleich zu den depurinierenden Addukten werden diese Addukte über eine 1,6-Michael-Addition gebildet und bleiben kovalent an der DNA gebunden, weswegen sie als stabile Addukte bekannt sind. Sie induzieren *in vitro* vorrangig G \rightarrow T und A \rightarrow T Mutationen und können somit auch zur

Krebsentstehung beitragen (IARC, 2012). Zusätzlich zu den stabilen Addukten wurde bei der Reaktion von DNA mit E2-2,3-Q auch ein depurinierendes N3-Ade-Addukt (2-HO-E2-6-N3-Ade) nachgewiesen, jedoch war die gebildete Menge, die über ³²P-Postlabeling quantifiziert wurde (4 µmol/mol DNA-³²P), signifikant geringer als die Menge an depurinierenden Addukten (280 µmol/mol DNA-³²P), die bei der Reaktion von DNA mit E2-3,4-Q entstand. Auch bei Umsetzungen von DNA mit Mischungen aus E2-2,3-Q und E2-3,4-Q (Mischungsverhältnis: 3:1, 1:1 und 1:3) überwogen in allen Mischungsverhältnissen die depurinierenden Addukte von E2-3,4-Q, weswegen von dessen größeren Reaktivität gegenüber DNA im Vergleich zu E2-2,3-Q ausgegangen wird (Zahid et al., 2006). Die Reaktivität dieser Catecholestrogen-Chinone scheint hierbei in einigen Tiermodellen und Säugerzellen mit der Mutagenität und Kanzerogenität der entsprechenden Vorläufersubstanzen zu korrelieren. So ist 4-HO-E2 in der Regel stärker mutagen und kanzerogen als 2-HO-E2 (Tab. 1.).

Tab. 1: Mutagenität und Kanzerogenität von 2- und 4-HO-E2 in verschiedenen Testsystemen.

Testsystem	4-HO-E2	2-HO-E2	Quelle
Big Blue® Ratten-Embryozellen	schwach mutagen	nicht mutagen	(zusammengefasst von Cavalieri und Rogan, 2011)
männliche syrische Goldenhamster (Niere)	kanzerogen	nicht kanzerogen	(zusammengefasst von Cavalieri und Rogan, 2011)
CD1-Mäuse (Uterus)	Adenokarzinome bei 66% der behandelten Tiere	Adenokarzinome bei 12% der behandelten Tiere	(Newbold und Liehr, 2000)
ACI-Ratten (Brustdrüse)	nicht kanzerogen	nicht kanzerogen	(Turan et al., 2004)
SHE-Zellen (<i>hprt</i> -Lokus)	nicht mutagen	nicht mutagen	(Tsutsui et al., 2000b)

Was E2, die Muttersubstanz der beiden Catecholestrogene, betrifft, so ist diese nicht mutagen im Ames-Test. Im HPRT-Test hingegen wurde eine sehr schwache Induktion von Genmutationen nach 4-tägiger Behandlung von V79-Zellen mit 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻¹⁰ und 10⁻¹¹ M E2, aber nicht mit 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹² und 10⁻¹³ M E2 beobachtet (zusammengefasst von Liehr, 2001). Dass E2 nicht nur mutagen, sondern auch kanzerogen ist, wurde in mehreren Nagetier-Modellen, wie zum Beispiel Meerschweinchen, Mäusen, Ratten und Hamstern beschrieben. Zu den Organen, in denen eine Tumor-induzierende Wirkung festgestellt wurde, gehören unter anderem die Brust, die Hirnanhangdrüse, die Hoden, Knochen und Nieren (zusammengefasst von Liehr, 2000).

Ein wichtiger Faktor, der die Mutagenität und Kanzerogenität von E2 und dessen Catecholestrogenen beeinflusst, ist deren Entgiftung mittels COMT. Eine verminderte COMT-Aktivität (beispielsweise aufgrund von Polymorphismen oder durch Wechselwirkung von Nahrungsbestandteilen mit dem Enzym selbst oder seiner Genexpression) führt zu einer unzureichenden Methylierung der Catecholestrogene, folglich zu einer erhöhten Oxidation zu den Catecholestrogen-Chinonen und dadurch zu einer vermehrten Bildung von DNA-Addukten, welche letztendlich die Entstehung von Mutationen und Krebs begünstigen könnten. In der Brustepithel-Zelllinie MCF-10F wurde zwar gezeigt, dass die Inhibierung der COMT-Aktivität zu einem erhöhten Spiegel an depurinierenden Addukten nach Behandlung mit 4-HO-E2 führt (Zahid et al., 2007). Ob die COMT-Hemmung tatsächlich einen Einfluss auf die Mutagenität der Catecholestrogene und der Muttersubstanz E2 hat, ist allerdings unklar und stellt daher einen Ansatzpunkt der weiteren Forschung dar. Welche Testsysteme sich hierfür eignen, wird im Folgenden erläutert.

1.2 Mutagenitätstests

Für E2 und dessen Catecholestrogene ist die Induktion von Genmutationen beschrieben (Kap. 1.1). Diese können anhand des Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)-Tests bestimmt werden.

Des Weiteren ist bekannt, dass E2, dessen Catecholestrogene und Methylcatechole, hierbei insbesondere 2-MeO-E2, eine Störung des mitotischen Spindelapparates hervorrufen (Aizu-Yokota et al., 1995) und somit aneugen wirken. Sie induzieren zudem DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche und die Ausbildung von AP-Stellen nach Depurinierung der von ihnen gebildeten DNA-Addukten (Kap. 1.1). Als Folge dieser DNA-Läsionen führen sie zu Chromosomenbrüchen und wirken dadurch klastogen. Wenn es hierbei durch längere Deletionen zu einer irreparablen Schädigung des genetischen Materials kommt, kann dies zum Zelltod führen. In diesem Fall bleiben Mutationen im *hprt*-Lokus unerkannt und das Ergebnis des HPRT-Tests fällt folglich negativ aus (Davies et al., 1993). Der einzige *in vitro* Test, der eine effiziente Detektion von aneugenem und klastogenem Substanzen ermöglicht, ist der Mikrokern (MK)-Test (EFSA, 2011). Demnach ist für eine bessere Interpretation der Ergebnisse des HPRT-Tests und eine umfangreiche Genotoxizitätsbestimmung die Durchführung eines MK-Tests nötig.

1.2.1 Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Test

Bei dem HPRT-Test handelt es sich um ein von Chu und Malling (1968) entwickeltes *in vitro*-Testsystem zur quantitativen Erfassung von Genmutationen in Säugerzellen, welches

heutzutage als Screeningmethode auf potentielle Säugermutagene und -kanzerogene breiten Einsatz findet (OECD, 1997).

Der HPRT-Test beruht auf einer Vorwärtsmutation im *hprt*-Gen, welche entweder mit dem Verlust oder mit der starken Abnahme der HPRT-Aktivität einhergeht.

Die HPRT katalysiert die Übertragung von Ribosephosphat (aus 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat) auf die Purinbasen Hypoxanthin und Guanin. Unter Abspaltung von Pyrophosphat werden die entsprechenden Nukleotide gebildet und stehen dann für die DNA-Synthese zur Verfügung. Durch diesen als *Salvage Pathway* bekannten Stoffwechselweg werden beim Menschen 90% der aus dem Nukleinsäureabbau stammenden freien Purinbasen wieder verwendet (Stout und Caskey, 1985). Neben den zuvor genannten Purinbasen kann eine Reihe toxischer Guanin-Analoga, wie 6-Thioguanin (6-TG) oder 8-Azaguanin (Krenitsky et al., 1969), von der HPRT zu den entsprechenden Nukleotiden umgesetzt und in die DNA eingebaut werden, was zur DNA-Destabilisierung und letztendlich zum Zelltod führt. Diese Tatsache wird beim HPRT-Test zur Mutantenselektion ausgenutzt.

Zellen mit einer Mutation im *hprt*-Lokus können aufgrund des Verlustes beziehungsweise der starken Abnahme der HPRT-Aktivität keinen *Salvage Pathway* betreiben. Folglich sind sie resistent gegenüber toxischen Guanin-Analoga wie 6-TG und können, anders als Zellen mit funktionsfähiger HPRT, in Anwesenheit von 6-TG überleben, da sie ihre DNA-Synthese ausschließlich durch die *De-novo*-Purinsynthese aufrechterhalten.

Da der Verlust der HPRT-Aktivität kein tödliches Ereignis darstellt (Walker et al., 1999), kann mit Hilfe des HPRT-Tests ein breites Mutationsspektrum erfasst werden. Hierzu zählen Basenpaarsubstitutionen, Leserasterverschiebungen, kleinere Deletionen und auch Chromosomentranslokationen in strukturellen und regulatorischen Genen (Bradley et al., 1981).

Beim HPRT-Test werden in der Regel V79-Zellen verwendet. Da es sich hierbei um männliche Zellen handelt und das *hprt*-Gen bei Menschen und Nagern auf dem x-Chromosom lokalisiert ist, ist diese Zelllinie hemizygot bezüglich des *hprt*-Gens. Somit reicht theoretisch eine Mutation aus, um zur Inaktivierung der HPRT-Aktivität zu führen. Des Weiteren besitzen V79-Zellen eine schnelle Verdopplungszeit (circa 12 h), was eine schnelle Fixierung der Mutationen im Genom ermöglicht, eine hohe Klonierungseffizienz (75-95%) und einen stabilen Karyotyp (Bradley et al., 1981).

1.2.2 Mikrokerntest

MK sind chromatinhaltige Strukturen im Zytoplasma, die während der Mitose entstehen, von einer eigenen Kernmembran umgeben sind und keine Verbindung zum Zellkern aufweisen.

Zur Durchführung des MK-Tests werden die Zellen nach erfolgter Substanzexposition fixiert, gefärbt und auf das Vorhandensein von MK untersucht (OECD, 2010).

Aneugen-induzierte MK (MK mit ganzen Chromosomen) können in der Regel bereits nach wenigen Stunden erfasst werden, da sie nach einer direkten Störung der Mitose entstehen, während zur Detektion von Klastogen-induzierten MK (bestehend aus Chromosomenfragmenten ohne Zentromer) das Durchlaufen eines oder mehrerer Zellzyklen bis zur Schadenmanifestation erforderlich ist (zusammengefasst von Stopper und Muller, 1997).

2 Problemstellung

Der brustgewebsspezifische Metabolismus des weiblichen Sexualhormons 17β -Estradiol spielt eine wichtige Rolle bei der Brustkrebsentstehung. In der Brust wird 17β -Estradiol durch die humanen Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenase Isoenzyme 1A1 und 1B1 zu 2- und 4-Hydroxyestradiol oxidiert. Bei unzureichender Konjugation dieser Catecholestrogene können sie weiter zu Chinonen oxidiert werden und mit der DNA reagieren. Hierbei kann die Entstehung von Mutationen und somit die Brustkrebsinitiation begünstigt werden.

Die genotoxische Wirkung von 17β -Estradiol und dessen beiden Catecholestrogenen ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen worden. Was die Mutagenität betrifft, so sind alle drei Verbindungen nicht mutagen im Ames-Test. Im *hprt*-Lokus weist keines der Catecholestrogene mutagenes Potential auf. Bei 17β -Estradiol hingegen wurde eine sehr schwache Induktion von Genmutationen nach 4-tägiger Behandlung von V79-Zellen mit 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-10} und 10^{-11} M, aber nicht mit 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-12} und 10^{-13} M beobachtet.

In extrahepatischem Gewebe, wie der Brust, stellt die O-Methylierung durch die Catechol-O-Methyltransferase den dominierenden Entgiftungsweg für Catechole dar. Eine niedrige Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität, beispielsweise durch Polymorphismen oder durch Wechselwirkung von Nahrungsbestandteilen mit dem Enzym selbst oder seiner Genexpression, könnte somit die Entstehung elektrophiler Estrogenchinone und dadurch eventuell auch die Induktion von Mutationen begünstigen. Ob die Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität tatsächlich zur Induktion von Genmutationen bei den Catecholestrogenen führt, beziehungsweise das schwach mutagene Potential von 17β -Estradiol verstärkt, bedarf weiterer Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit soll daher der Einfluss der Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität auf die Mutagenität von 17β -Estradiol und dessen Catecholestrogenen untersucht werden. Als Endpunkte sollen die Induktion von Genmutationen im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen sowie die Induktion von Chromosomen- und Genommutationen bestimmt werden. Hierfür sollen der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Test und der Mikrokerntest angewendet werden. Zur Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität soll 3,5-Dinitrocatechol eingesetzt werden.

Die Mutagenitätstests sollen in kultivierten Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters durchgeführt werden. Dabei werden die Catecholestrogene den Zellen zum einen exogen zugegeben, und zum anderen durch eine stabile Transfektion mit den Isoenzymen endogen produziert.

Um einen validen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Test durchzuführen, müssen die einzusetzenden Zelllinien proliferieren und Kolonien bilden können, sowie die Detektion schwacher Mutagene ermöglichen. Zudem soll die Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität durch 3,5-Dinitrocatechol erfolgreich gehemmt sein.

Um dies zu gewährleisten, sollen die Zelllinien eine Koloniebildungsfähigkeit von mindestens 0,7 und eine Spontanmutantenfrequenz zwischen 1 und 20 aufweisen. Zudem soll die eingesetzte Konzentration an 3,5-Dinitrocatechol die Enzymaktivität möglichst stark reduzieren, ohne dabei zytotoxisch auf die Zellen zu wirken. Als Maß für die Zytotoxizität sollen die Zellzahl und die Koloniebildungsfähigkeit und als Maß für die Reduktion der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität die statistisch signifikante Verschiebung des Metabolitenprofils zugunsten des freien Catechols dienen. Letztere soll anhand von Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie bestimmt werden.

Hierzu ist es im Vorfeld notwendig zu bestimmen, ob die Testsubstanzen und deren Metabolite im Medium oder in den Zellen nachweisbar sind. Da eine Probenaufarbeitung mittels Festphasenextraktion geplant ist, soll zudem ermittelt werden, welches Mindestvolumen an Probe hierfür erforderlich ist. Da die Bestimmung der Metabolitenmenge über das Peakflächenverhältnis des jeweiligen Analyten zum korrespondierenden internen Standard erfolgen soll, ist es zudem notwendig, geeignete interne Standards zu synthetisieren und deren Wiederfindung zu ermitteln. Hierzu soll das Peakflächenverhältnis zum internen Gerätestandard Cholestan mit und ohne Aufarbeitung bestimmt und miteinander verglichen werden.

Ferner soll zur Überprüfung der Zellproliferation, welche unerlässlich zur Überführung genetischer Schäden in Mutationen ist, die Zellzyklusverteilung direkt nach Behandlung mit den Testsubstanzen durchflusszytometrisch bestimmt werden.

3 Material und Methoden

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgelistet sowie die angewandten Methoden näher erläutert.

3.1 Geräte, Chemikalien und Lösungen

3.1.1 Geräte

Analysenwaage:	Mettler AE-240-S (Mettler Toledo GmbH, Gießen); Art.-Nr. 702498
Biofreezer:	Typ 6483 (GFL – Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel); Art.-Nr. 73537
Brutschränke:	HERAcell® 150i, 240i (Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold) CO ₂ -Inkubator CB 150 (Binder GmbH, Tuttlingen)
Casy® Cell Counter:	Modell DT (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim); Art.-Nr. 2501125
Einkanalpipetten:	Eppendorf Research® (Eppendorf AG, Hamburg) 100-1000 µl Art.-Nr. 3111 000. 149 500-5000 µl Art.-Nr. 3111 000. 173 Discovery Comfort (ABIMED Analysen-Technik GmbH, Langenfeld) 0,5-10 µl (DV10C) Art.-Nr. 4042 10-100 µl (DV100C) Art.-Nr. 4044 20-200 µl (DV200C) Art.-Nr. 4045 100-1000 µl (DV1000C) Art.-Nr. 4046 1000-5000 µl (DV5000C) Art.-Nr. 4048
Evaporatoren:	Speed Vac Concentrator Savant, Typ SPD 111V (Thermo Fisher Scientific, Bonn), Art. –Nr. SPD111V-230 und Rotations-Vakuum-Konzentrator, Typ RVC 2-25 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode), Art.-Nr. 101225
GC/MS:	Varian 450 GC/ Gas Chromatograph (Agilent Technologies® Deutschland GmbH, Böblingen); Art.-Nr. GC 0905B064

	Varian 300-MS/ TQ Mass Spectrometer (Agilent Technologies ® Deutschland GmbH, Böblingen); Art.-Nr. MS 0908W028
	Varian CP 8400 Autosampler (Agilent Technologies ® Deutschland GmbH, Böblingen)
HPLC:	Antec Leyden Alexys® 100 LC-System (Antec BV, Niederlande); Art.-Nr. 180.0036 mit HPLC System Data Acquisition Controller AC 100
	Autosampler: AS 100 LC 100 HPLC System Pump
	Detektor: Linear UVIS 200 (Knauer GmbH, Berlin)
	Säulen:
	Luna 5u C18 (2), 100A; 250 x 4,60 mm; C18 with TMS endcapping (Phenomenex, USA); Art.-Nr.: 00G-4252-E0
	Luna 5u C18 (2), 100A; 250 x 10,00 mm; C18 with TMS endcapping (Phenomenex, USA); Art.-Nr.: 00G-4252-N0
Magnetrührer:	IKA ® RCT basic (IKA Labortechnik, Staufen); Art.-Nr. 3810000
pH-Meter:	inoLab pH 720 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH (WTW), Weilheim); Art.-Nr. 1A10-1112
Präzisionswaage:	Denver Instrument (Denver Instrument GmbH, Göttingen); Modell: SI-2002
SPE-Kammer:	Visiprep SPE Vacuum Manifold; 12-Port Model (Sigma Aldrich Chemie GmbH Geschäftsbereich Supelco, Deisenhofen); Art.-Nr. 5-7030
Sterile Werkbank:	Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, Klasse 2 (INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald); Typ: Nu-480
Vortex:	Vortex Genie 2 (Scientific Industries Si TM , USA); Art.-Nr. 2-146860; Modell: G560E
Wasserbad:	Waterbath WNB 10 (Mettler GmbH + Co.KG, Schwabach); Art.-Nr. 8419 8998
Zentrifugen:	Multifuge 3 SR plus, Heraeus (Thermo Scientific, England)
	Fresco 21 Centrifuge; Heraeus (Thermo Scientific, England)

Tischzentrifuge Combi Spin FVL-2400 mit Vortex (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen); Art.-Nr. 560812005

Ultrazentrifuge (Beckman®, USA); Modell: L8-60M

3.1.2 Chemikalien

5 α -Cholestan: \geq 97%, GC (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim); Art.-Nr. C8003-100MG

17 β -Estradiol > 98%, cell culture tested (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim); Art.-Nr. E2758-1G

Ameisensäure: 98%, reinst (Grüssing GmbH, Filsum); Art.-Nr. 10124

Dimethylsulfoxid (DMSO): >99,9%; ACS, spektrophotometrische Qualität (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim); Art.-Nr. 154938-100ML

Dinatriumhydrogenphosphat: >99%, p.a., ACS, wasserfrei (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe); Art.-Nr. P030.1

Dinatrium-ethylendiamintetraacetat-

Dihydrat: \geq 99% p.a., ACS (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe); Art.-Nr. 8043.1

3,5-Dinitrocatechol (OR-486): (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim); Art.-Nr. D131-50MG

Essigsäure: Rotipuran® 100%, p.a. (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe); Art.-Nr. 3738.1

Ethanol: >99,5%, Ph. Eur., reinst (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe); Art.-Nr. 5054.2

99,9% (vergällt, Chemikalienausgabe Uni Würzburg), Art. Nr. 1877

Färbelösung für DNA/Proteine CyStain DNA/Protein 2 colours (Partec GmbH, Münster), Art.-Nr 05-5006

Fetales Kälberserum: (Invitrogen, GIBICO®, UK); Chargen-Nr. 41A1692K; Art.-Nr. 10270

Glycerin: Rotipuran® \geq 99,5%, p.a. wasserfrei (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe); Art.-Nr. 3783.1

n-Heptan: Rotipuran® >99%, reinst (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe); Art.-Nr. T174.1

	Rotisolv® > 99%, Pestilyse (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe); Art.-Nr. X878.1
	Chromasolv® plus for HPLC > 99% (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim); Art.-Nr. 650536-1L
2-Hydroxyestradiol:	95,5% Purity (HPLC, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim); Art.-Nr. H3131
4-Hydroxyestradiol	(Steraloids, Newport), Art.-Nr.: E2500
Kaliumchlorid (KCl):	>99%, Cell culture tested (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim); Art.-Nr. P5405-250G
Kaliumdihydrogenphosphat:	≥99%, p.a., ACS (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe); Art.-Nr. 3904.1
L-(+)-Ascorbinsäure:	AnalaR Normapur (VWR International GmbH, Darmstadt); Art.-Nr. 20150.231
Kulturmedium für V79-Zellen:	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim); Art.-Nr. D6429
Methanol (MeOH):	Chromasolv®; for HPLC (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim); Art.-Nr. 34860
	LiChrosolv®, gradient grade for HPLC (Merck KGaA, Darmstadt); Art.-Nr.: 1.06007.2500
Natriumchlorid (NaCl):	Cell culture tested (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim); Art.-Nr. S5886-500G
Natriumdihydrogenphosphat x H ₂ O:	99% reinst (Grüssing GmbH, Filsum); Art.-Nr. 12299
N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid mit Trimethylchlorsilan (BSTFA):	für die GC mit 1% TMCS (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim); Art.-Nr. 100960670
Penicillin-Streptomycin (P/S):	Cell culture tested (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim); Art.-Nr. P4458-100 ML
TRIS:	Pufferan ® ≥ 99,9% p.a. (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe); Art.-Nr. 4855.2
Trypsin:	10x Solution (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim); Art.-Nr. T4549

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Casy ® clean:	Kapillar- und Systemreiniger (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim); Art.-Nr. 05 651 786 001
Casy ® cups:	(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim); Art.-Nr. 05 651 794 001
Casy ® ton:	Isotone Salzlösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim); Art.-Nr. 05 651 808 001
Einwegpipetten:	aus LD-PE (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht); Art.-Nr. 86.1171
Kanülen:	100 Sterican ®, Einmal-Injektions-Kanüle (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe); Art.-Nr. C721.1
Mikrotest Platte 96 Well:	(Sarstedt AG & Co., Nümbrecht); Art.-Nr. 82.1581
Pasteurpipetten:	(Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe); Art. - Nr. 4518
Pipettenspitzen:	Spitzen ohne Filter (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht); Art.-Nr. 70.762 (1000µl); 70.760.002 (200µl), 70.1115 (10µl)
Reagenzgläser:	Starkwandig, ca. 40 x 8 mm Ø (Assistent – Karl Hecht GmbH & Co.KG, Sondheim); Art.-Nr.: 2775/2 mit glattem Rand, 100 x16 mm Ø (Brand GmbH & Co. KG, Wertheim); Art.-Nr.: 114115 mit glattem Rand, 125 x16 mm Ø (Brand GmbH & Co. KG, Wertheim); Art.-Nr.: 114120
Röhrchen für Durchflusszytometrie:	Röhren für CyFlow, 3,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht), Art.-Nr. 55.484
SPE-Säulen:	Bond Elut ® (Agilent Technologies ® Deutschland GmbH, Böblingen); Art.-Nr. 12102025 Supelclean™ C-18 SPE Tubes, 3 ml (Supelco Analytical, Bellefonte, PA); Art.-Nr. 57012
Verdrängungspipetten:	Microman ® (Gilson ® Inc., Frankreich); Art.-Nr. F148505 und F148506 Capillary Piston for Microman ® (Gilson ® Inc., Frankreich); Art.-Nr. F148014 und F148560
Vials:	Gewindeflasche (CZT Klaus Trott Chromatographie-Zubehör, Kriftel); Art.-Nr. 451301212 und 451101211 Schraubkappe (CZT Klaus Trott Chromatographie-Zubehör, Kriftel); Art.-Nr. 3413S2022 und 3011S1015

	Mikroeinsätze, konisch (CZT Klaus Trott Chromatographie-Zubehör, Kriftel); Art.-Nr. 501105031
	Federn (CZT Klaus Trott Chromatographie-Zubehör, Kriftel); Art.-Nr. 501167011
Zentrifugenröhrchen:	15 ml (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht); Art.-Nr. 62.554.502
	15 ml (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen); Art.-Nr. 188 261
	50 ml (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen); Art.-Nr. 227 270
Zellkulturflaschen:	Cellstar 550 ml, 175 cm ² , steril (Greiner Bio-One, Frickenhausen). Art.-Nr. 660175
	Cellstar 550 ml, 75 cm ² , steril (Greiner Bio-One, Frickenhausen). Art.-Nr. 658175
Zellkulturschalen:	Cellstar® Cellculture Dishes, 94x16 mm (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen); Art.-Nr.: 633 171
	Cellstar® Tissue Culture Dishes. 145x20 mm (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen); Art.-Nr.: 639 160
Kapillarsäulen:	Varian Factor Four™ VF-5 ms, 30 m x 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm; Säulenmaterial: 5% Phenyl-, 95% Dimethylpolysiloxan (Agilent Technologies ®, Niederlande); Art.-Nr.: CP8944.
	Supelco SLB-5ms Kapillarsäule (30 m x 0,25 mm, Filmdicke: 0,25 µm), Säulenmaterial: 5% Phenyl-, 95% Dimethylpolysiloxan (Supelco Analytical, Bellefonte, PA), Art.-Nr.: 28471-4

3.1.4 Puffer und Lösungen

2-HO-E2-Lösungen

1 mg 2-HO-E2 werden in 115,7 µl DMSO gelöst (c = 30 mM). Aus dieser Stammlösung werden verschiedene 2-HO-E2-Standardlösungen nach folgendem Pipettierschema erstellt:

30 mM // 20 µl /30 µl	(c = 20,0 mM)
30 mM // 10 µl /30 µl	(c = 10,0 mM)
30 mM // 10 µl /60 µl	(c = 5,0 mM)
30 mM // 10 µl /120 µl	(c = 2,5 mM)
30 mM // 10 µl /150 µl	(c = 2,0 mM)

2-HO-E2- beziehungsweise 4-HO-E2-Lösung für cytosolische Umsetzung

Jeweils 130 µg von 2-HO-E2 und 4-HO-E2 werden in 45 µl Dimethylsulfoxid ($c = 10 \text{ mM}$) gelöst. Die Lösungen werden im Gefrierschrank bei -24°C aufbewahrt.

5 α -Cholestan-Lösungen

4,44 mg 5 α -Cholestan (ChAN) werden in 1480 µl n-Heptan gelöst ($c = 3 \text{ mg/ml}$). Aus dieser Stammlösung wird eine 5 α -Cholestan-Standardlösung der Konzentration 0,3 ng/µl nach folgendem Pipettierschema erstellt:

3 mg/ml // 10 µl /1000 µl // 100 µl /1000 µl // 100 µl /1000 µl ($c = 0,3 \text{ ng/}\mu\text{l}$)

BaP (0,5 mM)

0,189 mg BaP werden in 15 µl DMSO gelöst ($c = 50 \text{ mM}$) und wie folgt verdünnt:

50 mM // 10 µl / 1000 ($c = 0,5 \text{ mM}$)

E2-haltiges Kulturmedium

500 ml Kulturmedium für V79-Zellen werden unter sterilen Arbeitsbedingungen mit 50 ml FKS und 100 ml P/S versetzt. Hiervon werden 240 ml entnommen und 120 µl einer 2 mM E2-Lösung rein pipettiert ($c(\text{E2}) = 1 \text{ }\mu\text{M}$).

500 ml Kulturmedium für V79-Zellen werden unter sterilen Arbeitsbedingungen mit 50 ml FKS und 100 ml P/S versetzt. Hiervon werden 240 ml entnommen und 120 µl einer 0,2 mM E2-Lösung rein pipettiert ($c(\text{E2}) = 0,1 \text{ }\mu\text{M}$).

E2- und OR-486-haltiges Kulturmedium

500 ml Kulturmedium für V79-Zellen werden unter sterilen Arbeitsbedingungen mit 50 ml FKS und 100 ml P/S versetzt. Hiervon werden 240 ml entnommen und anschließend 60 µl einer 4 mM E2-Lösung und 60 µl einer 80 mM OR-486-Lösung rein pipettiert ($c(\text{E2}) = 1 \text{ }\mu\text{M}$, $c(\text{OR-486}) = 20 \text{ }\mu\text{M}$).

500 ml Kulturmedium für V79-Zellen werden unter sterilen Arbeitsbedingungen mit 50 ml FKS und 100 ml P/S versetzt. Hiervon werden 240 ml entnommen und anschließend 60 µl einer 0,4 mM E2-Lösung und 60 µl einer 80 mM OR-486-Lösung rein pipettiert ($c(\text{E2}) = 0,1 \text{ }\mu\text{M}$, $c(\text{OR-486}) = 20 \text{ }\mu\text{M}$).

E2-Lösungen

0,106 mg E2 werden in 97,5 µl DMSO gelöst (c = 4 mM). Diese Stammlösung wird wie folgt verdünnt:

4 mM // 30 µl /60 µl (c = 2 mM) // 13 µl /130 µl (c = 0,2 mM)

Millipore-Wasser mit pH 3

Der pH-Wert von Millipore-Wasser wird mit Ameisensäure auf 3 eingestellt.

Millipore-Wasser mit 1% Ameisensäure

In einem 100 ml Messkolben wird 1 ml Ameisensäure mit Millipore-Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

NQO (2 mM)

0,190 mg NQO werden in 100 µl DMSO gelöst (c = 10 mM) und wie folgt verdünnt:

10 mM // 20 µl / 100 µl (c = 2 mM)

OR-486-Lösungen

2 mg OR-486 werden in 83 µl DMSO gelöst. Die erhaltene Stammlösung ist 120 mM. Aus dieser werden folgende Verdünnungen mit DMSO erstellt:

120 mM // 20 µl /30 µl (c = 80 mM)

120 mM // 20 µl /60 µl (c = 40 mM)

120 mM // 10 µl /60 µl (c = 20 mM)

20 mM // 10 µl /100 µl//10 µl/100 µl (c = 200 µM)

200 µM // 10 µl /100 µl//10 µl/100 µl (c = 2 µM)

OR-486-haltiges Kulturmedium

Für HPRT (Vorinkubation) und modifizierten HPRT

500 ml Kulturmedium für V79-Zellen werden unter sterilen Arbeitsbedingungen mit 50 ml FKS und 100 ml P/S versetzt. Hiervon werden 240 ml entnommen und anschließend 120 µl einer 40 mM OR-486-Lösung rein pipettiert (c (OR-486) = 20 µM).

Für HPRT (Co-Inkubation mit Testsubstanz)

500 ml Kulturmedium für V79-Zellen werden unter sterilen Arbeitsbedingungen mit 50 ml FKS und 100 ml P/S versetzt. Hiervon werden 130 ml entnommen und 32,5 µl einer 80 mM

OR-486-Lösung rein pipettiert ($c(\text{OR-486}) = 20 \mu\text{M}$). Von diesem OR-486-haltigen Medium werden pro Zellkulturflasche 20 ml benötigt

PBS-CMF (pH 7,4)

80,01 g NaCl (1370 mM), 2,01 g KCl (27 mM), 11,07 g Na_2HPO_4 (78 mM) und 2,04 g KH_2PO_4 (15 mM) werden unter Rühren in 1 l Millipore-Wasser gelöst und der pH-Wert mit 1 M HCl beziehungsweise 1 M NaOH auf 7,40 angepasst. Vor Gebrauch wird der Puffer 1:10 verdünnt.

Für sterile Arbeiten wird der Puffer autoklaviert.

Trypsin-Lösung

200 mg Na_2EDTA werden in 900 ml PBS-CMF (pH 7,4) gelöst und autoklaviert. Anschließend werden 100 ml Trypsinlösung (0,25%) steril zugegeben.

MeOH 20% (v/v)

2,0 ml MeOH werden mit 8,0 ml Millipore-Wasser gemischt, welches zuvor mit 1% Ameisensäure angesäuert wurde.

MeOH 60% (v/v)

6,0 ml MeOH werden mit 4,0 ml Millipore-Wasser gemischt, welches zuvor mit 1% Ameisensäure angesäuert wurde.

MeOH 85% (v/v)

8,5 ml MeOH werden mit 1,5 ml Millipore-Wasser gemischt, welches zuvor mit 1% Ameisensäure angesäuert wurde.

Kaliumphosphatpuffer (c = 200 mM, pH 7,4)

0,8702 g K_2HPO_4 werden in 25 ml Wasser gelöst.

0,6807 g KH_2PO_4 werden in 25 ml Wasser gelöst.

Die K_2HPO_4 -Lösung wird vorgelegt und der pH mit der KH_2PO_4 -Lösung auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wird im Kühlschrank bei 5°C aufbewahrt.

Magnesiumchlorid-Hexahydrat (c = 100 mM)

0,203 mg MgCl_2 werden in 1 ml Wasser gelöst. Hiervon werden 100 μl mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt ($c = 100 \text{ mM}$). Die Lösung wird im Kühlschrank bei 5°C aufbewahrt.

SAM (c = 5 mM)

10,9 mg SAM werden in 5 ml 200 mM Kaliumphosphatpuffer gelöst. Die Lösung wird im Kühlschrank bei 5°C aufbewahrt.

6-Thioguanin (c = 20 mg/ml)

20 mg 6-Thioguanin (6-TG) werden in 1 ml 1 M NaOH gelöst.

Selektionsmedium (c = 7 µg/ml)

500 ml DMEM werden mit 50 ml FKS, 10 ml P/S und 6-TG-Lösung versetzt und steril filtriert.

Antifade-Lösung

100 mg p-Phenylendiamindihydrochlorid werden in 10 ml PBS-CMF gelöst und anschließend mit 0,5 M NaHCO₃-Lösung (pH 9,0 mit NaOH eingestellt) auf pH 8,0 eingestellt. Die so erhaltene Lösung wird nachfolgend mit Glycerin auf 100 ml aufgefüllt. Daraufhin wird diese Lösung steril filtriert und bei -20°C lichtgeschützt aufbewahrt.

DAPI-Lösung

1 mg DAPI wird in 1 ml Wasser gelöst.

DAPI-Antifade-Lösung (c = 1 µg DAPI/ml)

10 µl der DAPI-Lösung werden in 10 ml Antifade-Lösung gelöst. Die so hergestellte Lösung wird aliquotiert und lichtgeschützt bei -20°C gelagert.

Carnoy's Fixans

60 ml MeOH werden mit 20 ml Eisessig gemischt und bei -20°C gelagert.

3.1.5 Zellkultur

V79-Zellen: Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters (Doehmer V79 parental vom 17.10.2004; Stammbaum: 6/98; 12/98; H/M), kultiviert in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) und 2% Penicillin/Streptomycin. Die Verdopplungszeit beträgt in etwa 12 Stunden (h).

V79 hCYP1A1-Zellen: Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters, die mit hCYP1A1 transfiziert wurden.

V79-hCYP1B1-Zellen: Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters, die mit hCYP1B1 transfiziert wurden.

Die Zellen werden in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ und bei 37°C kultiviert. Dem Medium werden Penizillin (Endkonzentration: 100 IU/ml) und Streptomycin (Endkonzentration: 100 µg/ml) zugesetzt.

3.2 Methoden

3.2.1 Auftauen von V79-Zellen

3.2.1.1 Lösungen

Kulturmedium (DMEM) siehe Kap.3.1.2

3.2.1.2 Durchführung

Zum Auftauen von V79-Zellen werden in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen 10 ml Kulturmedium vorgelegt. Die Zellen werden im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, bis nur ein Eispfropfen im Kryoröhrchen sichtbar ist. Anschließend werden sie ins Zentrifugenröhrchen mit warmem Medium überführt und 5 min bei 292 g zentrifugiert. Das überstehende Medium wird abgesaugt, das Zellpellet in 2 ml frisches, warmes Kulturmedium aufgenommen und mit einer sterilen Kunststoffpasteurpipette in eine mit Kulturmedium zuvor gefüllte Zellkulturflasche (175 cm²) überführt.

3.2.2 Passagieren von V79-Zellen

3.2.2.1 Lösungen

PBS-CMF siehe Kap. 3.1.4

Trypsin siehe Kap. 3.1.4

Kulturmedium (DMEM) siehe Kap. 3.1.2

Casyton® siehe Kap. 3.1.3

3.2.2.2 Durchführung

Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO₂ in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre kultiviert.

Die für die Zellpassage benötigten Volumina an PBS-CMF, Trypsin und Kulturmedium richten sich nach dem verwendeten Zellkulturgefäß (Tab. 2).

Tab. 2: Übersicht über die benötigten Volumina an Lösungen für die Zellpassage.

	Fläche	PBS- CMF	Trypsin	Medium
Zellkulturflaschen	175 cm ²	10 ml	10 ml	20 ml
	75 cm ²	10 ml	10 ml	10 ml
24-Wellplatte	1,9 cm ²	500 µl	300 µl	700 µl

Für die Passage wird das Medium steril abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Anschließend wird es abgesaugt und der Zellrasen mit Trypsin bedeckt. Als Nächstes wird Trypsin nahezu vollständig abgesaugt. Zur Ablösung vom Boden des Zellkulturgefäßes werden die Zellen für 3 min in den Brutschrank gestellt und anschließend wird vorsichtig gegen die Gefäßseiten geklopft.

Die Zellen werden dann in frischem Medium aufgenommen und vereinzelt. Nach elektronischer Bestimmung der Zellzahl mittels CASY (Kap. 3.2.3) werden die Zellen (1 Million bei großen Zellkulturflaschen (175 cm²) beziehungsweise 0,5 Millionen bei kleinen Zellkulturflaschen (75 cm²) in das entsprechende Volumen (20 ml beziehungsweise 10 ml) Medium weiter gesetzt.

3.2.3 Elektronische Zellzahlbestimmung mittels CASY

3.2.3.1 Lösungen

Kulturmedium (DMEM) siehe Kap. 3.1.2

Casyton® siehe Kap. 3.1.3

3.2.3.2 Durchführung

Zur Bestimmung der Zellzahl wird ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und in ein mit 10 ml Casyton® gefülltes Casycup® überführt. Die Suspension wird durchmischt und unmittelbar danach die Messkapillare des Gerätes hinein getaucht.

Für die Zellzahlbestimmung von V79-, V79hCYP1A1- und V79hCYP1B1-Zellen wird ein Größenbereich von 5,5 -100 µm eingestellt. Lebende Zellen werden im Bereich > 9,5 µm, tote Zellen im Bereich 5,5-9,5 µm und Zellfragmente im Bereich < 5,5 µm detektiert.

Je nach Aliquotvolumen, welches den 10 ml Casyton® zugeben wird, müssen am Gerät das entsprechende Ansaugvolumen und der entsprechende Verdünnungsfaktor (VF) eingestellt werden (Tab. 3). Der VF errechnet sich wie folgt: $VF = 10 \text{ ml} + \text{Aliquot in ml} / \text{Aliquot in ml}$.

Tab. 3: VF und Ansaugvolumen in Abhängigkeit des Aliquotsvolumens.

Aliquot der Zellsuspension (ml)	VF	Ansaugvolumen (µl)
20	501	200
50	201	200
100	101	200
200	51	200
500	21	400
1000	11	400

3.2.4 Ausstreuen von V79-Zellen

3.2.4.1 Lösungen

Kulturmedium (DMEM) siehe Kap. 3.1.2

Casyton® siehe Kap. 3.1.3

3.2.4.2 Durchführung

Nach elektronischer Bestimmung der Zellzahl (Kap. 3.2.3) wird ein Aliquot der Zellsuspension (mit der gewünschten Anzahl an Zellen) in ein zuvor mit Kulturmedium gefülltes Becherglas oder Zentrifugenröhrchen überführt, gründlich vereinzelt und die Zellzahl erneut bestimmt. Anschließend wird ein definiertes Volumen dieser Suspension in ein neues, mit Kulturmedium gefülltes Kulturgefäß pipettiert.

Hierbei sind aus Gründen der Vergleichbarkeit, und da im Rahmen dieser Arbeit HPRT-Tests durchgeführt werden sollen, HPRT-Bedingungen (hinsichtlich Zellzahl/Fläche und Zellzahl/Volumen) einzuhalten (Tab. 4). Die Bedingungen orientieren sich an 1,5 Millionen Zellen/20 ml Medium auf einer Fläche von 175 cm².

Tab. 4: HPRT-Bedingungen (modifiziert nach:Schumacher et al., 2005).

	Fläche	Zellzahl	Inkubationsvolumen
Zellkulturflaschen	175 cm ²	1500000	20,0 ml
	75 cm ²	642857	8,6 ml
Zellkulturschalen	165 cm ²	1414286	18,9 ml
	65 cm ²	557143	7,4 ml
24-Wellplatte	1,9 cm ²	16286	217 µl

3.2.5 Inkubieren von V79-Zellen

3.2.5.1 Lösungen

Testsubstanzen (in DMSO gelöst)	siehe Kap. 3.1.4
DMSO	siehe Kap. 3.1.2
Kulturmedium (DMEM)	siehe Kap. 3.1.2

3.2.5.2 Durchführung

Nach dem Ausstreuen (Kap. 3.2.4) lässt man die Zellen für 24 h anwachsen, um sie anschließend mit der Testsubstanz zu inkubieren.

Zu diesem Zweck wird erst die Testsubstanz in DMSO gelöst und diese Lösung mit Kulturmedium auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt (Inkubationsmedium). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass zum Erreichen der gewünschten DMSO-Endkonzentration im Inkubationsmedium (hier: 0,05%, v/v) die Testsubstanzlösung in DMSO 2000-fach konzentrierter angesetzt werden soll, als sie später zur Zellinkubation eingesetzt wird. Als Lösungsmittelkontrolle wird DMSO mitgeführt.

Das Medium steril abgesaugt und durch Inkubationsmedium ersetzt (Inkubationsvolumen: siehe Kap. 3.2.4). Hierbei ist darauf zu achten, dass der Zellrasen möglichst intakt bleibt. Anschließend werden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.2.6 Bestimmung der Spontanmutantenfrequenz

3.2.6.1 Lösungen

PBS-CMF	siehe Kap. 3.1.4
Trypsin	siehe Kap. 3.1.4
Kulturmedium (DMEM)	siehe Kap. 3.1.2

Casyton®	siehe Kap. 3.1.3
6-TG-Medium	siehe Kap. 3.1.4
EtOH 96%, vergällt	siehe Kap. 3.1.2
Kulturmedium	siehe Kap. 3.1.4
Methylenblau-Lösung	siehe Kap. 3.1.4
NaCl-Lösung	siehe Kap. 3.1.4

3.2.6.2 Durchführung

3 166 666 Zellen werden in 96 ml Selektionsmedium suspendiert und die Zellzahl dieser Suspension elektronisch mittels CASY bestimmt (Kap. 3.2.3). Anschließend werden daraus zur Bestimmung der Spontanmutantenfrequenz (SMF) je 30 ml auf drei Zellkulturschalen (165 cm², entsprechend 1 Million Zellen/ Zellkulturschale) verteilt. Aus der restlichen Suspension werden 1750 Zellen entnommen und in 35 ml Kulturmedium zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit (*plating efficiency*, PE) pipettiert. Je 10 ml dieser Zellsuspension werden in einer Zellkulturschale (65 cm²) pipettiert (entsprechend 500 Zellen/Zellkulturschale) und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Nach 7 Tagen werden die gebildeten Kolonien fixiert und mit Methylenblau gefärbt.

Fixierung und Färbung der Kolonien

Das Medium wird aus den Zellkulturschalen abgegossen und die darauf gebildeten Kolonien mit physiologischer NaCl-Lösung (0,9%) gewaschen. Im Anschluss daran werden sie mit eiskaltem 96%-igem EtOH für 15 min fixiert. Das EtOH wird daraufhin abgegossen und die Kolonien mit Methylenblau-Lösung für 30 min gefärbt. Die Färbelösung wird dann abgekippt, die Zellkulturschalen vorsichtig mit Wasser ab- und mit entionisiertem Wasser nachgespült. Zum Schluss werden die Zellkulturschalen zum Trocknen an der Luft schräg gestellt.

Auswertung

Die blau gefärbten Kolonien werden gezählt und die PE wie folgt berechnet:

PE = Anzahl der gebildeten Kolonien/ Anzahl der ausgestreuten Zellen

Zur Bestimmung der SMF, welche der Anzahl der 6-TG-resistenten Kolonien pro Million koloniebildender Zellen angibt, wird folgende Formel verwendet:

SMF = Anzahl der 6-TG-resistenten Kolonien x 10⁶ / Anzahl der ausgestreuten Zellen x PE

3.2.7 Hemmung der COMT-Aktivität mittels OR-486

3.2.7.1 Lösungen

2-HO-E2	siehe Kap. 3.1.4
---------	------------------

OR-486	siehe Kap. 3.1.4
DMSO	siehe Kap. 3.1.2
PBS-CMF	siehe Kap. 3.1.4
Trypsin	siehe Kap. 3.1.4
Kulturmedium (DMEM)	siehe Kap. 3.1.2
Casyton®	siehe Kap. 3.1.3

3.2.7.2 Durchführung

V79-Zellen werden in große Zellkulturschalen (165 cm²) unter HPRT-Bedingungen (Kap. 3.2.4.2) ausgestreut. Nach 24 h werden sie zunächst 30 min lang mit 3,8 µl der jeweiligen OR-486-Standardlösung inkubiert. Anschließend erfolgt eine 24-stündige Co-Inkubation der Zellen mit 3,8 µl der 2-HO-E2-Standardlösung (Endkonzentration: 1,25 µM), so dass der DMSO-Gehalt im Inkubationsvolumen konstant bei 0,05% (v/v) liegt.

Daraufhin werden die Zellen unsteril abtrypsiniert, mit Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.8 HPRT-Test

3.2.8.1 Lösungen

PBS-CMF	siehe Kap. 3.1.4
Trypsin	siehe Kap. 3.1.4
DMSO	siehe Kap. 3.1.2
2-HO-E2, 4-HO-E2	siehe Kap. 3.1.4
NQO	siehe Kap. 3.1.4
OR-486-haltiges Kulturmedium	siehe Kap. 3.1.4
Kulturmedium (DMEM)	siehe Kap. 3.1.4
Selektionsmedium	siehe Kap. 3.1.4

3.2.8.2 Durchführung

2 Tage vor Versuchsbeginn wird ein V79-Zellen-Stamm mit niedriger Spontanmutantenfrequenz aufgetaut.

Tag 0

Pro eingesetzte Konzentration werden 1,5 Millionen Zellen in 20 ml Kulturmedium in Zellkulturflaschen (175 cm²) ausgestreut.

Tag 1

Die Zellen werden mit jeweils 10 µl der in DMSO gelösten Testsubstanz inkubiert (0,05% DMSO Endkonzentration). Als Lösungsmittelkontrolle wird DMSO in einer Endkonzentration

von 0,05% (v/v) mitgeführt. Als Positivkontrolle wird 4-Nitrochinolin-N-oxid (NQO) in einer Endkonzentration von 1 μ M eingesetzt.

Parallel dazu werden weitere V79-Zellen, zur Hemmung der COMT-Aktivität, erst für 30 min mit OR-486-haltigem Kulturmedium vorinkubiert. Daraufhin wird das Inkubationsmedium abgesaugt, durch neues OR-486-Kulturmedium ersetzt und jeweils 5 μ l Testsubstanz in jede Zellkulturflasche rein pipettiert. Anschließend werden die Zellen 23,5 h lang inkubiert.

Tag 2

Das Inkubationsmedium wird in Kunststoff-Zentrifugenröhrchen gesammelt, mit Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung mittels SPE bei -80°C gelagert. Der Zellrasen wird zweimal mit jeweils 10 ml PBS-CMF gewaschen und die Zellen mit 10 ml Trypsin für 5 min bei 37°C im Brutschrank abtrypsinieren. Die vom Kulturflaschenboden abgelösten Zellen werden in 20 ml Kulturmedium aufgenommen, vereinzelt und anschließend wird die Zellzahl elektronisch mittels CASY bestimmt. Aus dieser Zellsuspension wird jeweils 1 Million Zellen in 20 ml Kulturmedium weitergesetzt. Die Zellzahl dieser Suspension wird erneut bestimmt und daraus Zellen zur Bestimmung der PE 1 entnommen.

PE1

Pro eingesetzte Konzentration werden 35 ml Kulturmedium vorgelegt und 1750 Zellen rein suspendiert. Je 10 ml dieser Zellsuspension werden in einer Zellkulturschale (65 cm^2) pipettiert (entsprechend 500 Zellen/Zellkulturschale). Anschließend werden die Zellen 7 Tage lang bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert.

Tag 5

Passage wie am Tag 2.

Tag 7

Selektion: Nach Abtrypsinieren und Aufnahme der Zellen in 20 ml Kulturmedium wird die Zellzahl elektronisch mittels CASY bestimmt. Daraufhin werden pro eingesetzte Konzentration 3 166 666 Zellen in 96 ml Selektionsmedium suspendiert und die Zellzahl dieser Suspension elektronisch bestimmt. Anschließend werden daraus, analog zu Tag 2, Zellen zur Bestimmung der PE2 entnommen (hierzu siehe PE1). Zur Selektion werden auf drei Zellkulturschalen (165 cm^2) je 30 ml dieser Suspension (entsprechend 1 Million Zellen/Zellkulturschale) verteilt und die Zellen bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert. Nach 7 Tagen werden die gebildeten Kolonien fixiert und mit Methylenblau gefärbt (siehe Kap.3.2.6).

Auswertung:

Die gefärbten Kolonien werden gezählt und die PE1 und PE2, wie unter Kap.3.2.6.2 beschrieben, berechnet. Zur Bestimmung der Mutantenfrequenz (MF) wird folgende Formel verwendet:

$$\text{Anzahl der 6-TG-resistenten Kolonien} \times 10^6 / \text{Anzahl der ausgestreuten Zellen} \times \text{PE2}^*$$

*: Mit Hilfe der PE2, welche in die MF direkt eingerechnet wird, wird die Koloniebildungsfähigkeit nach 5 Tagen substanzfreier Nachinkubation, also zum Zeitpunkt der Selektion, beschrieben.

3.2.9 Modifizierter HPRT-Test

3.2.9.1 Lösungen

PBS-CMF	siehe Kap. 3.1.4
Trypsin	siehe Kap. 3.1.4
DMSO	siehe Kap. 3.1.2
E2-haltiges Kulturmedium	siehe Kap. 3.1.4
E2- und OR-486 haltiges Kulturmedium	siehe Kap. 3.1.4
OR-486-haltiges Kulturmedium	siehe Kap. 3.1.4
BaP	siehe Kap. 3.1.4
Kulturmedium (DMEM)	siehe Kap. 3.1.4
Selektionsmedium	siehe Kap. 3.1.4

3.2.9.2 Durchführung

2 Tage vor Versuchsbeginn wird ein V79 hCYP1A1-Stamm mit niedriger Spontanmutantenfrequenz aufgetaut.

Tag 0

Pro eingesetzte Konzentration werden 1,5 Millionen Zellen in 20 ml Kulturmedium in Zellkulturflaschen (175 cm²) ausgestreut.

Tag 1

Das Kulturmedium wird abgesaugt und die Zellen werden in E2-haltigem Kulturmedium inkubiert (0,05% DMSO Endkonzentration). Als Lösungsmittelkontrolle wird DMSO in einer Endkonzentration von 0,05% (v/v) mitgeführt.

Parallel dazu werden weitere V79-Zellen, zur Hemmung der COMT-Aktivität, erst für 30 min in OR-486-haltigem Medium inkubiert, daraufhin das Inkubationsmedium abgesaugt und anschließend 23,5 h mit E2- und OR-486-haltigem Kulturmedium coinkubiert.

Tag 2 (Passage (P) 1)

Das Inkubationsmedium wird in Kunststoff-Zentrifugenröhrchen gesammelt, mit Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung mittels SPE bei -80°C gelagert. Der Zellrasen wird zweimal mit jeweils 10 ml PBS-CMF gewaschen und die Zellen mit 10 ml Trypsin für 5 min bei 37°C im Brutschrank abtrypsiniert. Die vom Kulturflaschenboden abgelösten Zellen werden in 20 ml E2-haltigem Kulturmedium (beziehungsweise in substanzfreiem Kulturmedium bei der Lösungsmittelkontrolle und der Positivkontrolle) aufgenommen, vereinzelt und anschließend wird die Zellzahl elektronisch mittels CASY bestimmt. Aus dieser Zellsuspension wird jeweils 1 Million Zellen in 20 ml Kulturmedium weitergesetzt, 1 Million Zellen zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung und 80000 Zellen für den MK-Test entnommen. Auf die Bestimmung der PE1 wird verzichtet.

Tag 5 (P2)

Wie P1.

Tag 7 (P3)

Passage wie am Tag 2. Zusätzlich wird aus der Lösungsmittelkontrolle eine Zellkulturflasche mit 1,5 Millionen Zellen in 20 ml Kulturmedium ausgestreut, um sie am nächsten Tag mit der Positivkontrolle ($0,25\ \mu\text{M}$ BaP) zu inkubieren.

Tag 8 (P4)

Inkubation mit BaP für 24 h.

Tag 9 (P5)

Wie P1.

Tag 12 (P6)

Wie P1.

Tag 14 (P7, Selektion 1)

Das Inkubationsmedium wird in Kunststoff-Zentrifugenröhrchen gesammelt, mit Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung mittels SPE bei -80°C gelagert. Nach Abtrypsinieren und Aufnahme der Zellen in 20 ml Kulturmedium wird die Zellzahl elektronisch mittels CASY bestimmt. Aus dieser Zellsuspension wird jeweils 1 Million Zellen in 20 ml Kulturmedium weitergesetzt. Daraufhin werden pro eingesetzte Konzentration 3 166 666 Zellen in 96 ml Selektionsmedium suspendiert und die Zellzahl dieser Suspension elektronisch bestimmt. Anschließend werden daraus, analog zu Tag 2, Zellen zur Bestimmung der PE2 entnommen. Zur Selektion werden auf drei Zellkulturschalen ($165\ \text{cm}^2$) je 30 ml dieser Suspension (entsprechend 1 Million Zellen/ Zellkulturschale) verteilt und die

Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Nach 7 Tagen werden die gebildeten Kolonien fixiert und mit Methylenblau gefärbt (siehe Kap.3.2.6).

PE2:

Pro eingesetzte Konzentration werden 35 ml Kulturmedium vorgelegt und 1750 Zellen rein suspendiert. Je 10 ml dieser Zellsuspension werden in einer Zellkulturschale (65 cm²) pipettiert (entsprechend 500 Zellen/Zellkulturschale). Anschließend werden die Zellen 7 Tage lang bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Tag 16 (P8)

Wie P1.

Tag 19 (P9)

Wie P2.

Tag 21 (P10, Selektion 2)

Wie P7.

Auswertung:

Die PE1, PE2 und MF werden, wie unter Kap. 3.2.8.2 beschrieben, berechnet.

3.2.10 Mikrokerntest

3.2.10.1 Lösungen

Kulturmedium (DMEM)	siehe Kap. 3.1.4
Carnoy's Fixans	siehe Kap. 3.1.4
DAPI-Antifade-Lösung	siehe Kap. 3.1.4

3.2.10.2 Durchführung

Aufzentrifugieren der Zellen

80000 Zellen aus dem HPRT-Test werden mit Kulturmedium auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und davon je 500 µl auf einen Polylysin beschichteten Objektträger (10 min, 6 RPM) aufzentrifugiert (entspricht 40000 Zellen pro Objektträger).

Fixierung der Zellen

Die Objektträger werden in mit Carnoy's Fixans gefüllte Coplin-Becher gestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Färbung der Objektträger

Die Objektträger werden aus den mit Carnoys Fixans gefüllten Coplin-Bechern rausgenommen und mindestens 1 h an der Luft getrocknet. Anschließend werden sie mit je 10 µl DAPI-Antifade-Lösung eingedeckt.

Auswertung

Pro Objektträger werden 2000 Zellen gezählt. Die Angabe erfolgt in Mikrokern-haltige Zellen pro 10³ Zellen.

3.2.11 Bestimmung der Zellzyklusverteilung

Die Bestimmung der Zellzyklusverteilung erfolgt anhand der durchflusszytometrischen Messung des DNA-Gehaltes. Während der Ruhephase (G₀) und der Präsynthesephase (G₁) weisen die Zellen einen diploiden Chromosomensatz auf, der sich nach der Replikationsphase (S-Phase), also in der prämitotischen Phase (G₂) und der Mitose, verdoppelt. Nach erfolgter Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI in die DNA und Anregung mit UV-Licht, kann bei jeder einzelnen Zelle die blaue Fluoreszenz der angefärbten DNA (*Longpassfilter* FL4, 435 nm) gemessen werden, woraus für jede Zellpopulation eine Zellzyklusverteilung resultiert.

3.2.11.1 Lösungen

PBS-CMF	siehe Kap. 3.1.4
Ethanol (99,9%)	siehe Kap. 3.1.2
Färbelösung CyStain DNA/Protein 2 colours	siehe Kap. 3.1.2

3.2.11.2 Durchführung

Zellfixierung

Die aus dem HPRT-Ansatz entnommene Zellsuspension (1 Million Zellen) wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt, abzentrifugiert (5 min, 300 g) und das überstehende Medium abgesaugt. Das Zellpellet wird in 300 µl PBS-CMF resuspendiert und die Zellen gut vereinzelt. Anschließend werden zur Fixierung tropfenweise 700 µl (14 x 50 µl) eiskaltem Ethanol unter Vortexen zugetropft. Die nun fixierten Zellen werden dann bis zur Färbung bei -20°C (mindestens aber für 12 h) gelagert.

Zellfärbung

Unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Messung werden die fixierten Zellen erneut zentrifugiert (5 min, 300 g). Der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet mit 1 ml CyStain 1-Step Lösung versetzt, 5 Mal vereinzelt und gevortext. Daraufhin werden 900 µl dieser

Suspension in ein Plastikröhrchen für Durchflusszytometrie überführt, erneut gevortext und durchflusszytometrisch vermessen.

Durchflusszytometrische Messung

Die Verstärkung (*gain*) wird vor Messungsbeginn so eingestellt, dass die Fluoreszenzintensität der Zellen, die sich in der G1 /G0-Phase des Zellzyklus befinden, bei 200 Einheiten liegt. Die Durchflussgeschwindigkeit (*speed*) wird so lange modifiziert, bis Messungsdauer (*acquisition time*) ≤ 90 s ist.

Auswertung

Die Auswertung der Histogramme erfolgt mit Hilfe der FloMax Software (Partec, Münster). Die Unterteilung in die einzelnen Zellzyklusphasen wird zunächst in der Kontrollpopulation manuell vorgenommen und wird dann für alle weiteren Proben einer Messreihe beibehalten. Hierzu wird zuerst das Histogramm auf der x-Achse so weit verschoben, bis die Spitze des G1/G0-Peaks eine Fluoreszenzintensität (FI) von 200 aufweist. Anschließend werden die FI-Bereiche für die einzelnen Zellzyklusphasen, das heißt für die G1/G0-Phase (RN1), für die S-Phase (RN2) und für die G2/M-Phase (RN3) eingegrenzt. Die Anzahl der Zellen (*counts*) in den einzelnen Zellzyklusphasen werden addiert, deren Summe gleich 100 Prozent gesetzt und daraus die prozentualen Anteile der einzelnen Zellzyklusphasen berechnet.

3.2.12 Aufarbeitung der Proben mittels Festphasenextraktion

3.2.12.1 Lösungen

MeOH

Millipore-Wasser

PBS-CMF siehe Kap. 3.1.4

MeOH 20% (v/v) siehe Kap. 3.1.4

MeOH 60% (v/v) siehe Kap. 3.1.4

MeOH 85% (v/v) siehe Kap. 3.1.4

ChAN siehe Kap. 3.1.4

BSTFA

n-Heptan

3.2.12.2 Durchführung

Nach Konditionieren der Säulen für die Festphasenextraktion (engl. *solid phase extraction*, SPE) mit 1 ml MeOH, werden diese mit 1 ml destilliertem Wasser gespült und mit 1 ml PBS-CMF (pH 7,4) äquilibriert. Anschließend wird die durch Inkubation von V79-Zellen mit

2-HO-E2 (Kapitel 3.2.4) sowie eventuell OR-486 (Kap. 3.2.6) erhaltene Probe in Portionen zu je 3 ml aufgegeben. Der Probenaufgabe folgt ein Spülschritt mit 1 ml PBS. Zur Abtrennung von Verunreinigungen, beispielsweise durch Proteine, werden daraufhin 2 ml 20% MeOH aufgegeben. Die Elution der 2-HO-E2-Addukte mit Glutathion oder DNA-Basen erfolgt mit 2 ml 60% MeOH, die der 2-HO-E2-Metabolite (2-Hydroxy-3-O-Methylestradiol (3-MeO-E2) und 2-MeO-E2) erfolgt mit 2 ml 85% MeOH in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen.

Das MeOH wird am Evaporator (40 mbar, RT, 2 h) abevaporiert, bis etwa 1 ml noch im Zentrifugenröhrchen ist. Daraufhin wird das gesamte Volumen ein Vial überführt, in dem zuvor 10 µl (entsprechen 3 ng) ChAN vorgelegt wurden und am Evaporator (30 mbar, RT, 6 h) bis zur Trockne abevaporiert. Anschließend wird die Probe mit 30 µl N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) derivatisiert und zusätzlich werden 30 µl n-Heptan zugegeben, um das aggressive Silylierungsreagenz zu verdünnen. So wird die GC-Säule später nicht unnötig stark belastet. Vor der Messung wird die Probe mindestens 3 h lang bei RT stehen gelassen.

3.2.13 Synthese der Methylcatechole

3.2.13.1 Lösungen

Kaliumphosphatpuffer (c = 200 mM)	Kap. 3.1.4
Magnesiumchlorid (c = 100 mM)	Kap. 3.1.4
SAM in Kaliumphosphatpuffer (c = 5 mM)	Kap. 3.1.4
2-HO-E2 (c = 10 mM)	Kap. 3.1.4
4-HO-E2 (c = 10 mM)	Kap. 3.1.4
Rattenlebercytosol (c = 41,2 mg/ml)	

3.2.13.2 Durchführung

Die Inkubationen werden in einem Gesamtvolumen von 1 ml durchgeführt. Beim Blindwert wird statt Catechol-Lösung Wasser eingesetzt. Die Inkubationen werden nach dem unter Tab. 5 dargestellten Pipettierschema durchgeführt.

Tab. 5: Pipettierschema für die cytosolische Umsetzung von 2- und 4-HOE2.

Lösung	Konzentration	Eingesetztes Volumen (µl)	Konzentration im Ansatz
Kaliumphosphatpuffer	200 mM	400	100 mM
MgCl ₂	100 mM	40	4 mM
2-HO-E2/4-HO-E2	10 mM	10	100 µM
Rattenlebercytosol	41,2 mg/ml	100	4 mg/ml
SAM	5 mM	100	500 µM
Wasser	-	350	-

Die Lösungen werden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und für 50 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 500 µL Ethylacetat abgestoppt. Nach gründlichem Mischen mittels Vortex wird zur besseren Phasentrennung zentrifugiert (2884 g, 2 min). Die obere, ethylacetathaltige Phase wird abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die untere Phase wird anschließend zweimal mit je 500 µL Ethylacetat extrahiert, gevortext, zentrifugiert und die Extrakte vereinigt. Die vereinigten Extrakte werden ca. 1,5 h bei 55 mbar und Raumtemperatur am Evaporator bis zur Trockne abgedampft. Der Rückstand wird in 1 ml MeOH aufgenommen und anschließend die Reaktionskontrolle mittels HPLC durchgeführt.

Dem methanolischen Extrakt der Umsetzung von 2-HO-E2 werden nun 2 µl einer 2-HO-E2-Lösung (c=9,5 µg/µl) zugegeben (entspricht einer Zugabe von 66 nmol). Dem methanolischen Extrakt der Umsetzung von 4-HO-E2 werden 4 µl einer 4-HO-E2-Lösung (c=4,4 µg/µl) zugegeben (entspricht einer Zugabe von 63 nmol).

Messprogramm an der HPLC mit Dioden-Array-Detektor

HPLC-Parameter:

HPLC:	Agilent Series 1200
Säule:	Phenomenex Luna 5u C18(2), 250 x 4,6 mm, 5 µm
Detektor:	Diodenarraydetektor λ _{max} = 280 nm
Probeschleife:	100 µl
Injektionsvolumen:	30 µl
Messdauer:	50 min
Fluss:	1 ml/min
Fließmittel A:	Millipore-Wasser (pH 3)
Fließmittel B:	Acetonitril
Fließmittelgradient:	Tab. 6

Tab. 6: Fließmittelgradient zur HPLC-Analyse von Catecholen und Methylcatecholen.

Zeit (min)	Fließmittel A (%)	Fließmittel B (%)
0	70	30
15	50	50
17	50	50
19	40	60
24	40	60
28	20	80
29	0	100
34	0	100
36	70	30
46	70	30

3.2.14 Analyse von E1, E2 und dessen Metaboliten mittels GC/MS/MS

Aufgrund der hohen Matrixbelastung der Proben erfolgt die Analyse von E1, E2 und deren Metaboliten im Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Modus, um eine sichere Identifizierung der Analyten sowie niedrigere Nachweisgrenzen (im Vergleich zum Full Scan Modus) zu gewährleisten.

3.2.14.1 Analysebedingungen

Gaschromatograph Varian 450-GC

Injektion:

Injektionsvolumen: 5 µl (splitless)

Injektortemperatur: 250°C

Trägergasfluss: 1 ml/min

Tab. 7: Temperaturprogramm für die gaschromatographische Analyse von E2 und dessen Metaboliten.

Temperatur (°C)	Heizrate (°C/min)	Haltezeit (min)	Gesamtzeit (min)
60	0	0	0,00
250	30	0	6,33
295	1,8	0	31,33

Massenspektrometer Varian MS-300

Tab. 8: Analysebedingungen für die massenspektrometrische Analyse von E2 und dessen Metaboliten.

Transferline-Temperatur	280°C
Ionenquelle -Temperatur	200°C
Ionisierungsart	Elektronenstoßionisation, 70 eV
Kollisionsgas	Argon
Scan time	1,6 s
Collect delay	8 min
Detektor-Spannung	EDR-Maximum

Tab. 9: MRM-Methode zur Vermessung einer nach Kap. 3.2.12 aufgearbeiteten Probe. Aufgeführt sind die vermessenen Übergänge der Analyten von Quadrupol 1 (Q1) auf Quadrupol 3 (Q3) sowie die verwendeten Kollisionsenergien und dwell times. Zur sicheren Identifizierung der Analyten wurden je zwei Übergänge pro m/z vermessen. Der intensivere Übergang (jeweils die erste Zeile pro Analyt) wurde als Quantifier verwendet.

Analyt	m/z Q1	m/z Q3	Kollisionsenergie (eV)	dwell time (s)
ChAN	372	217	10	0,08
	372	357	10	0,08
E2	416	285	20	0,08
	416	326	15	0,08
D-E2	419	285	10	0,08
	419	329	10	0,08
2-/4-HO-E2	504	325	10	0,08
	504	373	20	0,08
2-/4-HO-D-E2	507	328	20	0,08
	507	373	20	0,08
2/4-MeO-E2 und	446	315	15	0,08
3-OMe-4-/-2-HO-E2	446	325	15	0,08
2/4-MeO-D-E2 und	449	315	10	0,08
	449	328	10	0,08

Material und Methoden

E1	342	257	10	0,08
	342	218	15	0,08
2-/4-HO-E1	430	306	10	0,08
	430	345	10	0,08
2/4-MeO-E1 und	372	342	5	0,08
3-OMe-4-/2-HO-E1	372	357	5	0,08

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Vorversuche zum HPRT-Test

Für Mutagenitätstests, wie zum Beispiel der HPRT-Test, ist Zellproliferation eine unabdingbare Voraussetzung, damit genetische Schäden in Mutationen überführt werden können. Daher wurden vor Beginn des HPRT-Tests die Konzentrationsbereiche der Testsubstanzen bestimmt, in denen zytotoxische beziehungsweise wachstumshemmende Effekte auftreten. Als Maß für die Zytotoxizität dienten sowohl die Zellzahl als auch die Koloniebildungsfähigkeit (engl. *plating efficiency*, PE) direkt nach Substanzbehandlung der Zellen (PE1).

Darüber hinaus sollte bei der Durchführung eines HPRT-Tests die PE zum Zeitpunkt der Selektion (PE2) hoch genug sein (OECD, 1997) und zur Sicherstellung optimalen Zellwachstums mindestens 0,7 betragen (Li et al., 1987). Um die Detektion schwacher Mutagene zu gewährleisten, sollte zudem die Spontanmutantenfrequenz (SMF) der Zellen im Bereich 0 - 20 liegen (Li et al., 1987). Mittlerweile wird jedoch eine SMF ≥ 0 angestrebt, da bei einem Wert von 0 nicht eindeutig festgestellt werden kann, ob eine Erhöhung der Mutantenfrequenz auf ein mutagenes Potential der Testsubstanz zurückzuführen ist oder ob es sich dabei lediglich um eine Erhöhung der SMF handelt. Vor Beginn eines HPRT-Tests war es daher notwendig, die Eignung der dafür einzusetzenden Zelllinie hinsichtlich PE und SMF zu überprüfen.

Da im Rahmen dieser Arbeit unter anderem der Einfluss der COMT-Hemmung auf die MF und auf das Metabolitenprofil von E2 und dessen Catecholderivaten untersucht wurde, war es im Vorfeld notwendig, die chromatographischen Eigenschaften dieser Verbindungen und der durch die COMT daraus gebildeten Methylcatechole zu bestimmen. Für deren Quantifizierung war es zudem nötig, geeignete interne Standards zu synthetisieren und deren Wiederfindung mit und ohne SPE-Aufarbeitung zu ermitteln.

Für eine effiziente SPE-Probenaufarbeitung musste zunächst herausgefunden werden, ob E2 und dessen Catecholderivaten sowie deren intrazellulär gebildeten Metabolite im Kulturmedium oder in den Zellen nachzuweisen sind.

Des Weiteren wurde vor Beginn des HPRT-Tests nach einem COMT-Inhibitor gesucht, der die COMT-Aktivität möglichst stark reduzierte, ohne dabei zytotoxisch auf die Zellen zu wirken.

4.1.1 Zytotoxizität von 4-HO-E2 in V79-Zellen

Zur Ermittlung der Zytotoxizität von 4-HO-E2 in V79-Zellen wurden Letztere in einer 24-Wellplatte für 24 h mit 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 und 120 μM 4-HO-E2 unter HPRT-Bedingungen (16286 Zellen/Kavität) inkubiert (Kap. . Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO in einer Endkonzentration von 0,05% (v/v) mitgeführt (Kontrollpopulation). Anschließend wurden die Zellzahl und die PE1 bestimmt.

Nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit 5 μM 4-HO-E2 wurde kein statistisch signifikanter Unterschied der PE1 ($99,7\% \pm 1,2\%$) oder der Zellzahl ($93,5\% \pm 1,6\%$) im Vergleich zur Kontrollpopulation beobachtet. Im Vergleich hierzu bewirkte die Inkubation der Zellen mit 10 μM 4-HO-E2 einen Rückgang der PE1 auf $95,0\% \pm 4,4\%$ und der Zellzahl auf $77,4\% \pm 0,6\%$. Erst nach Behandlung der Zellen mit Konzentrationen $\geq 20 \mu\text{M}$ 4-HO-E2 zeigte sich eine statistisch signifikante Abnahme der PE1 und der Zellzahl im Vergleich zur Kontrollpopulation. Ab einer Konzentration von 100 μM wirkte 4-HO-E2 so stark zytotoxisch, dass die relative Zellzahl auf Werte unter 5% zurück ging und keine Koloniebildung mehr erfolgte (PE1 0, Abb. 2, Daten im Anhang, Tab. 12 und Tab. 13).

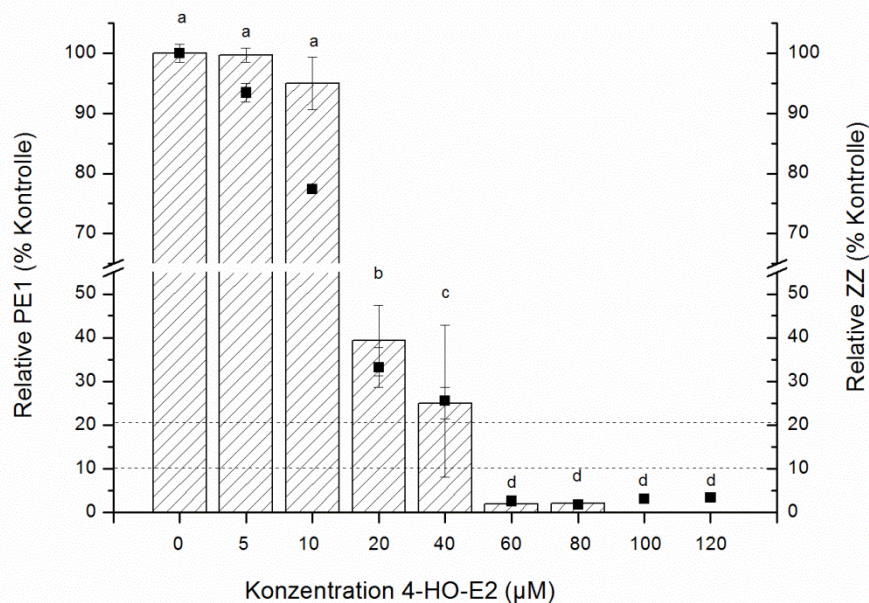


Abb. 2: PE1 (Balken, linke y-Achse) und Zellzahl (schwarze Symbole, rechte y-Achse) von V79-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 4-HO-E2 bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (0,05% DMSO, 0 μM). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von einem Versuch in 3-fach Bestimmung. Die horizontalen, gestrichelten Linien stellen die empfohlenen Unter- und Obergrenze für die relative PE1 bei der höchst einzusetzenden Konzentration im HPRT-Test dar. Unterschiedliche Buchstaben (a-d) zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA, Scheffé, $p < 0,05$). Daten im Anhang, Tab. 12 und Tab. 13.

Nach Empfehlung der OECD (1997) sollen im HPRT-Test bei der höchsten eingesetzten Konzentration 10 - 20%, jedoch nicht unter 10% der Zellen relativ zur Kontrollpopulation überleben. Da die PE1 nach Behandlung der Zellen mit Konzentrationen ab 60 μM 4-HO-E2 unter der empfohlenen Untergrenze (10%) lag, und die PE1 nach Inkubation mit 40 μM 4-HO-E2 mit $25,0\% \pm 3,6\%$ knapp über der empfohlenen Obergrenze (20%) lag, stellt 40 μM 4-HO-E2 die höchst einzusetzende Konzentration beim HPRT-Test dar. Folglich wird der HPRT-Test mit 4-HO-E2 im Konzentrationsbereich 5-40 μM durchgeführt.

4.1.2 Zytotoxizität von 2-HO-E2 in V79-Zellen

Zur Ermittlung der Zytotoxizität von 2-HO-E2 in V79-Zellen wurden Letztere in einer 24-Wellplatte für 24 h mit 0,08, 0,15, 0,3, 0,6, 1,25, 2,5, 5, 7,5, 10 und 15 μM 2-HO-E2 unter HPRT-Bedingungen (16286 Zellen/Kavität) inkubiert. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO in einer Endkonzentration von 0,05% (v/v) mitgeführt (Kontrollpopulation). Anschließend wurden die Zellzahl und die PE1 bestimmt.

Nach 24-stündlicher Inkubation der Zellen mit Konzentrationen bis 2,5 μM 2-HO-E2 war kein signifikanter Unterschied der PE1 im Vergleich zur Kontrollpopulation ($100,0\% \pm 3,8\%$) zu verzeichnen. Erst nach Behandlung der Zellen mit Konzentrationen $\geq 5 \mu\text{M}$ 2-HO-E2 erfolgte eine signifikante Reduktion der PE1. Im Vergleich hierzu wurde bei der Zellzahl erst nach Inkubation mit Konzentrationen $\geq 10 \mu\text{M}$ 2-HO-E2 ein statistisch signifikanter Rückgang der Zellzahl im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ($100,0\% \pm 9,1\%$) beobachtet (Abb. 3, Daten im Anhang, Tab. 14 und Tab. 15).

Unter Berücksichtigung der relativen Standardabweichung lag die PE1 nach Behandlung der Zellen mit 7,5 μM 2-HO-E2 ($15,2\% \pm 9,1\%$, Abb. 3) unter der empfohlenen Untergrenze für die PE1 (10%). Somit stellt 5 μM 2-HO-E2 die höchst einzusetzende Konzentration beim HPRT-Test dar. Folglich wird der HPRT-Test mit 2-HO-E2 im Konzentrationsbereich 0,08-5 μM durchgeführt.

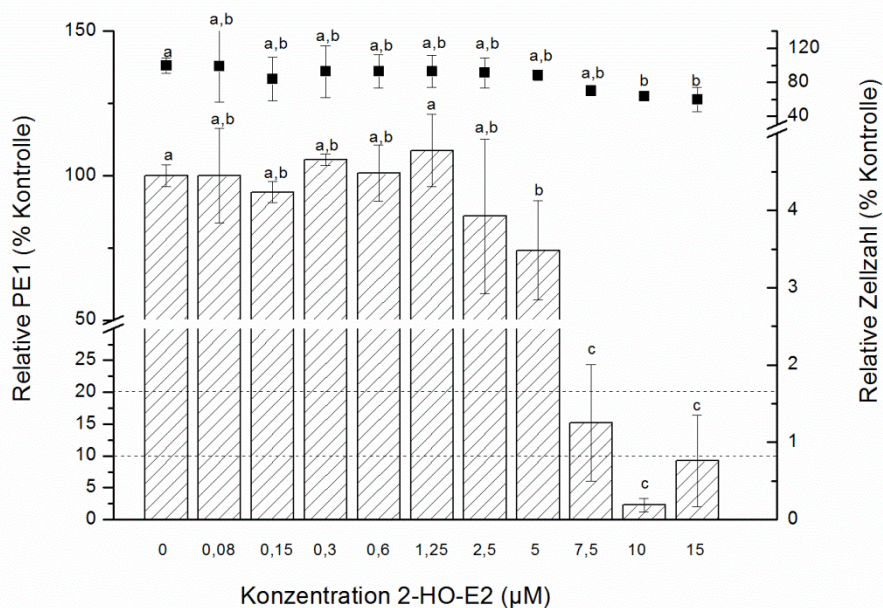


Abb. 3: PE1 (Balken, linke y-Achse) und Zellzahl (schwarze Symbole, rechte y-Achse) von V79-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 2-HO-E2 bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (0,05% DMSO, 0 µM). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von einem Versuch (0,08 - 0,3 µM), beziehungsweise zwei (15 µM), drei (7,5 und 10 µM), vier (0,6, 1,25 und 5 µM), 8 (2,5 µM) und zwölf (0 µM) unabhängigen Versuchen in je 3-fach Bestimmung. Die horizontalen, gestrichelten Linien stellen die empfohlenen Unter- und Obergrenze für die relative PE1 bei der höchst einzusetzenden Konzentration im HPRT-Test dar. Unterschiedliche Buchstaben (a-c) zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA, Scheffé, $p < 0,05$). Daten im Anhang, Tab. 14 und Tab. 15.

4.1.3 Koloniebildungsfähigkeit und Spontanmutantenfrequenz von V79-Zellen, V79 hCYP1A1- und V79 hCYP1B1-Zellen

Um eine Verstärkung des mutagenen Effekts zu bewirken und somit die Detektion schwacher Mutagene zu ermöglichen, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit neben der konventionellen Variante des HPRT-Tests, bei der die Expositionsdauer 1 Tag beträgt, eine alternative Variante mit einer Expositionsdauer von 4 Wochen durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurden die PE und die SMF der V79-Zellen sowie der V79 hCYP1A1- und der V79 hCYP1B1-Zellen über einen Zeitraum von mindestens 4 Wochen ermittelt.

Die Charakterisierung der V79-Zellen sowie der V79 hCYP1A1-Zellen hinsichtlich PE und SMF erfolgte im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Anne Schlechtweg (2011). Hierbei stellte sich heraus, dass die PE der V79-Zellen über 7 Wochen im Bereich von 0,71 bis 0,86 lag und somit ausreichend hoch war. Die SMF lag über den gesamten

Versuchszeitraum im angestrebten Bereich von 0 bis 20. Folglich waren die V79-Zellen hinsichtlich PE und SMF für die Verwendung im HPRT-Test geeignet.

Die PE der V79 hCYP1A1-Zellen lag über den gesamten Versuchszeitraum, mit Ausnahme von Passage (P) 2 (PE 0,69) und P15 (PE 0,66), an denen die PE knapp unter 0,7 lag, zwischen 0,7 und 0,8 und somit über den angestrebten Mindestwert. Die SMF unterlag vor allem in den ersten zwei Wochen nach dem Auftauen der Zellen starke Schwankungen. Sie verringerte sich von $54 \pm 7,7$ (P2) auf 17 ± 4 (P5) und blieb bis auf P15 (PE 19 ± 7) stets unter 20 (wissenschaftliche Abschlussarbeit Schlechtweg, 2011). Demzufolge eignen sich die V79 hCYP1A1-Zellen für die Verwendung im HPRT-Test, vorausgesetzt sie werden bei einer genügend hohen Passagenzahl eingesetzt und weisen eine gute PE auf.

Zur Charakterisierung der V79 hCYP1B1-Zellen hinsichtlich PE und SMF wurden diese beiden Parameter über einen Zeitraum von 4 Wochen ermittelt.

Die PE der V79 hCYP1B1-Zellen schwankte über den gesamten Versuchszeitraum zwischen 0,71 und 0,79. Lediglich einmalig bei P10 (Versuch 2, PE 0,63) und einmalig bei P13 (Versuch 1, PE 0,62) lag die PE etwa 11% unter dem angestrebten Mindestwert von 0,7 (Abb. 4). Somit war diese Zelllinie hinsichtlich PE für den Einsatz im HPRT-Test geeignet.

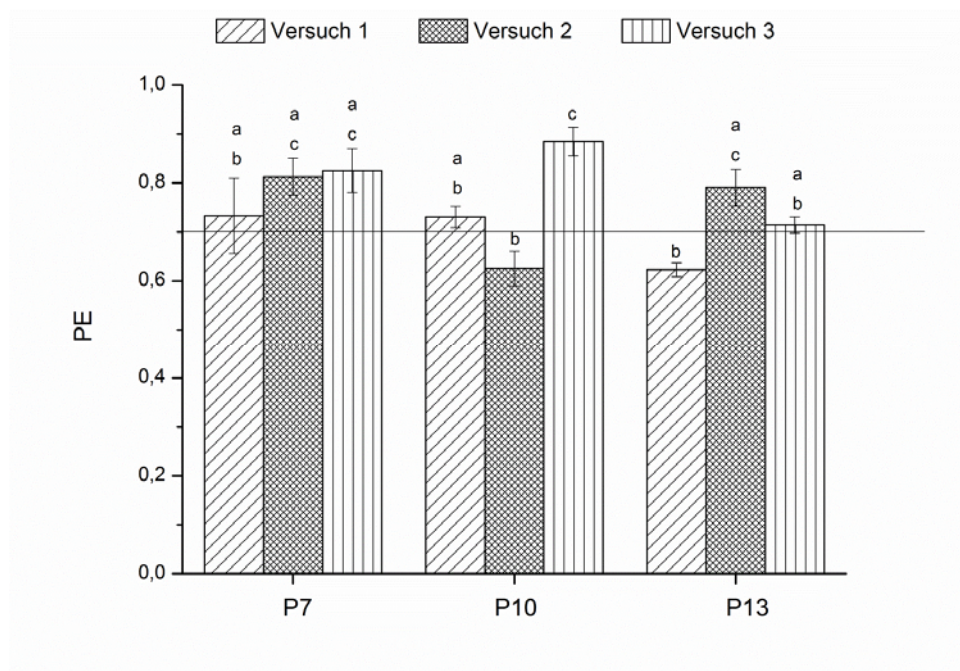


Abb. 4: PE von V79 hCYP1B1-Zellen über mehrere Passagen (P) über einen Zeitraum von 4 Wochen. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen in je 3-fach Bestimmung. Die horizontale Linie stellt den angestrebten Mindestwert für die PE dar. Unterschiedliche Buchstaben (a-c) zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA, Scheffé, $p < 0,05$).

Die SMF der V79 hCYP1B1-Zellen zeigte in allen drei Versuchen statistisch signifikante Veränderungen von Passage zu Passage. So schwankte die SMF zwischen 14 ± 1 und 72 ± 7 (P7), 9 ± 2 und 104 ± 6 (P10) und 7 ± 0 und 77 ± 7 (P13, Abb. 5). Somit liegen die höchsten SMF-Werte bis Faktor 6 über den maximalen, noch tolerierbaren Wert von 20. Aufgrund dieser Tatsache ist diese Zelllinie trotz ausreichend hoher PE für die Verwendung im HPRT-Test nicht geeignet.

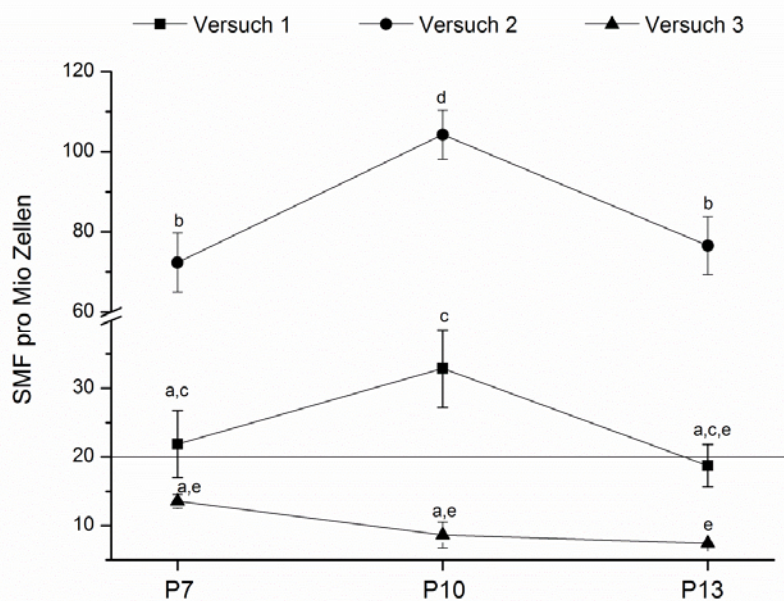


Abb. 5: SMF von V79 hCYP1B1-Zellen über mehrere Passagen (P) über einen Zeitraum von 4 Wochen. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Versuchen in je 3-fach Bestimmung. Die horizontale Linie stellt die maximale, noch tolerierbare SMF dar. Unterschiedliche Buchstaben (a-c) zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA, Scheffé, $p < 0,05$).

4.1.4 Bestimmung der Response von E2, dessen Catecholderivaten und Methylcatecholen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte unter anderem die prozentuale Verteilung von E2, dessen Catecholderivaten und Methylcatecholen in V79- und V79 hCYP1A1-Zellen mittels GC/MS/MS untersucht werden. Zur Ermittlung der prozentualen Verteilung werden in der Regel die Peakflächen aller Analyten addiert, deren Summe gleich 100 Prozent gesetzt und die einzelnen Peakflächen darauf bezogen. Abhängig vom Ansprechverhalten des Detektors auf den jeweiligen Analyten kann es vorkommen, dass gleiche Analytmengen unterschiedliche Peakflächen ergeben, was zu einer Verfälschung der prozentualen Verteilung führen würde. Daher war es im Vorfeld notwendig, die Response dieser Verbindungen bei der GC/MS/MS-Analyse zu bestimmen.

Zur Bestimmung der Response wurden jeweils gleiche Mengen an Analyt trimethylsilyliert, mittels GC/MS/MS untersucht (Kap. 3.2.14) und die Peakflächen miteinander verglichen. Als Bezugspunkt diente die Peakfläche von E2 (Tab. 10).

Nach Einspritzung von 500 pg E2 ergab sich eine Peakfläche von $1,1 \times 10^7$ MCounts. Im Vergleich hierzu wiesen 2-HO- und 4-HO-E2 deutlich kleinere Peakflächen auf (Tab. 10).

Da beide Catechole eine ähnliche Struktur aufweisen, war zu erwarten, dass gleiche Einspritzmengen in etwa die gleiche Peakfläche ergeben beziehungsweise dass beide Catechole ähnliche Peakflächenverhältnisse (PFV) zu E2 aufweisen. Das PFV von 2-HO-E2 war jedoch etwa viermal größer als dasjenige von 4-HO-E2 (Tab. 10).

Des Weiteren wurden beide Methylcatechole von 4-HO-E2 stärker und 3-OMe-2-HO-E2 schwächer als E2 detektiert. 2-MeO-E2 wies hingegen als einziger Analyt eine ähnliche Response wie E2 auf.

Entgegen der Erwartung, dass die Methylcatechole von 2-HO-E2 und 4-HO-E2 eine ähnliche Response bei der GC/MS/MS-Analyse aufweisen, wurde 4-MeO-E2 4-fach stärker als 2-MeO-E2 detektiert und 3-OMe-4-HO-E2 5-fach stärker als 3-OMe-2-HO-E2 (Tab. 10).

Da die untersuchten Verbindungen trotz ähnlicher Struktur nicht die gleiche Response aufwiesen, war dies bei der Berechnung der prozentualen Verteilung von E2, dessen Catecholderivaten und Methylcatecholen in den nachfolgenden Versuchen zu berücksichtigen.

Tab. 10: Peakflächen von jeweils 500 pg E2, 2-HO-E2, 4-HO-E2, 2-MeO-E2, 4-MeO-E2, 3-OMe-2-HO-E2 und 3-OMe-4-HO-E2 und Quotienten der Peakfläche vom jeweiligen Analyt zu E2. Dargestellt sind die Werte aus einer Einfachbestimmung.

Analyt	Peakfläche (MCounts)	PFV Analyt/E2
2-HO-E2	4,0E+06	0,4
2-MeO-E2	1,2E+07	1,1
3-OMe-2-HO-E2	5,6E+06	0,5
4-HO-E2	1,2E+06	0,1
4-MeO-E2	5,3E+07	4,9
3-OMe-4-HO-E2	2,5E+07	2,3
E2	1,1E+07	1,0

4.1.5 Interne Standards zur Quantifizierung von E2, dessen Catecholderivaten und Methylcatecholen

Zur Quantifizierung von E2, dessen Catecholderivaten und Methylcatecholen waren interne Standards notwendig. Bei der Wahl geeigneter interner Standards wurde berücksichtigt,

dass Letztere in der zu analysierenden Probe nicht enthalten sein dürfen, sich vom jeweiligen Analyt gut trennen lassen und ein ähnliches chromatographisches Verhalten aufweisen sollen.

Ein Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Untersuchung des Metabolitenprofils von 2-HO-E2 in V79-Zellen. Da V79-Zellen über COMT-Aktivität verfügen (Diplomarbeit Freudenberger, 2009) und Letztere die O-Methylierung von 2-HO-E2 zu 2-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2 katalysiert (Goodman et al., 2002), war nach 2-HO-E2-Behandlung der Zellen mit der Bildung dieser Methylcatechole zu rechnen. Somit wurden interne Standards zur Quantifizierung dieser 3 Verbindungen benötigt.

4-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukte sind im Kulturmedium der mit 2-HO-E2 behandelten Zellen nicht zu erwarten, eluieren aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu 2-HO-E2 und dessen Methylcatecholen in der gleichen Fraktion bei der SPE-Aufarbeitung (Dissertationsprojekt Zettner) und lassen sich zudem von ihnen gaschromatographisch gut trennen (Anhang, Tab. 18). Somit stellen sie geeignete interne Standards dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch das Metabolitenprofil von 4-HO-E2 in V79-Zellen untersucht. Mittels COMT wird 4-HO-E2 hauptsächlich zu 4-MeO-E2 und in geringerem Umfang zu 3-OMe-4-HO-E2 methyliert (Roy et al., 1990). Daher war nach 4-HO-E2-Behandlung der Zellen mit der Bildung dieser Methylcatechole zu rechnen. Zur Quantifizierung dieser 3 Verbindungen wurden daher 2-HO-E2, 2-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2 verwendet.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit das Metabolitenprofil von E2 in V79 hCYP1A1-Zellen untersucht. Humanes CYP1A1 katalysiert hauptsächlich die Hydroxylierung von E2 an Position C-2 und in geringerem Umfang an Position C-4 (Spink et al., 1998). Da die 2-Hydroxylierung fast 20-fach höher als die 4-Hydroxylierung ist (Spink et al., 1992), war davon auszugehen, dass nach Behandlung von V79 hCYP1A1-Zellen mit E2 vorrangig 2-HO-E2 und geringe Mengen 4-HO-E2 gebildet werden. Da V79 hCYP1A1-Zellen über COMT-Aktivität verfügen, war zudem die Bildung der entsprechenden Methylcatechole zu erwarten.

Im Rahmen vorangegangener Arbeiten wurden nach E2-Behandlung von V79 hCYP1A1-Zellen 2-HO-E2, 3-OMe-2-HO-E2, 2- und 4-MeO-E2 in der Zellsuspension im Medium nachgewiesen (Dissertationsprojekt Zettner). Daher waren interne Standards zur Quantifizierung dieser 4 Verbindungen benötigt.

In der Regel eignen sich isotoopenmarkierte Analoga optimal als interne Standards, da sie nahezu identische physikochemische (Stokvis et al., 2005; Wang et al., 2007) und chromatographische (O'Halloran und Ilett, 2008) Eigenschaften sowie

massenspektrometrische Fragmentierungsmechanismen (Liu et al., 1995) wie die Analyten aufweisen.

Aus diesem Grund wurde zur Quantifizierung von E2, 2-HO-E2, 3-OMe-2-HO-E2, 2- und 4-MeO-E2 ein Gemisch der entsprechenden deuterierten Analoga verwendet, welches auf enzymatischem Wege ausgehend von dreifach deuteriertem E2 (D₃-E2, Abb. 6) synthetisiert wurde (Dissertationsprojekt Zettner).

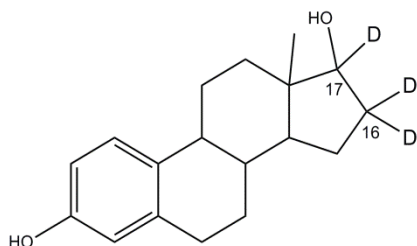


Abb. 6: Strukturformel von D-E2.

4.1.5.1 Synthese eines Standardgemisches aus 2-HO-, 2-MeO- und 3-OMe-2-HO-E2

Zur Quantifizierung von 4-HO-, 4-MeO- und 3-OMe-4-HO-E2 wurde ein Standardgemisch aus 2-HO-, 2-MeO- und 3-OMe-2-HO-E2 benötigt. Da Letzteres nicht kommerziell erhältlich ist, wurde es durch Umsetzung von 2-HO-E2 mit cytosolischer COMT aus Leber von SD-Ratten synthetisiert (Kap. 3.2.13).

Im MeOH-Extrakt der Umsetzung von 2-HO-E2 mit COMT aus Rattenlebercytosol wurden, wie erwartet, 2-MeO- und 3-OMe-2-HO-E2 nachgewiesen. 2-HO-E2 war hingegen nicht mehr nachweisbar (Abb. 7).

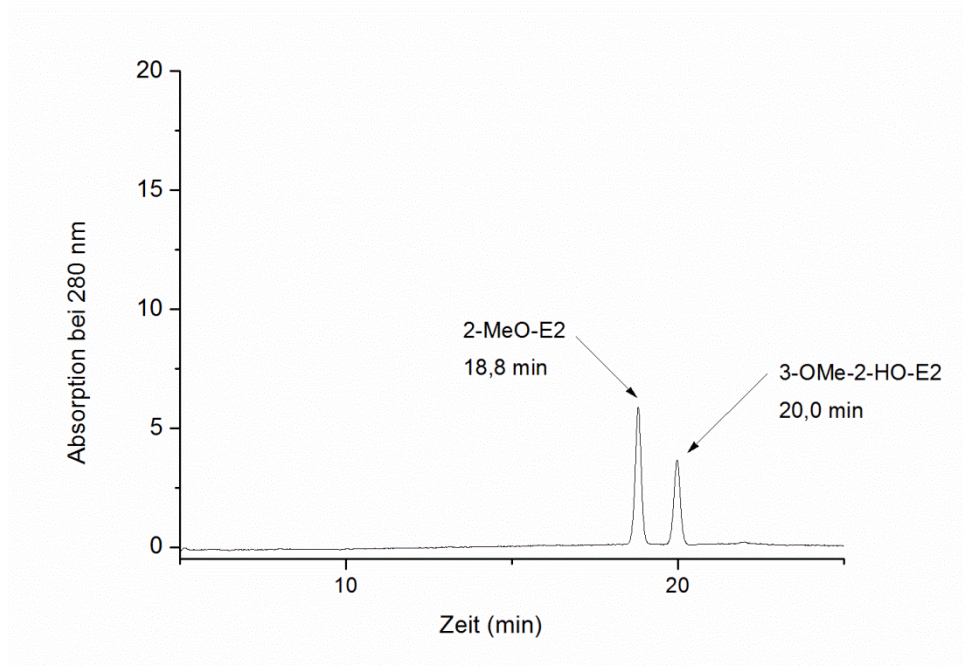


Abb. 7: HPLC-Chromatogramm des methanolischen Extrakts der Umsetzung von 100 µM 2-HO-E2 mit 4 mg cytosolischer COMT aus Rattenleber in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Nach Extraktion der Umsetzungsprodukte mit Ethylacetat und dessen Abevaporieren wurde der Rückstand in 1 ml MeOH aufgenommen und 30 µl davon mittels HPLC analysiert. Analysebedingungen: Kap.3.2.13.

Das Peakflächenverhältnis (PFV) von 2-MeO-E2 zu 3-OMe-2-HO-E2 betrug 1,5. Im Rahmen der wissenschaftlichen Abschlussarbeit von Jörg Freudenberger (2009) wurden 2-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2 ebenfalls durch Umsetzung von 2-HO-E2 mit cytosolischer COMT aus Leber von SD-Ratten synthetisiert. Hierbei wurde ein PFV von 1,45 beobachtet, welches nahezu identisch mit dem hier ermittelten PFV von 1,5 ist. Anhand dieses Wertes - und vorausgesetzt, dass die Response beider Positionsisomere bei der HPLC-Analyse im gleichen Bereich liegt - ist von einer bevorzugten Methylierung an Position 2 gegenüber Position 3 auszugehen. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen an Umsetzungen von 2-HO-E2 mit rekombinanter humaner COMT in *E. coli* und mit cytosolischer COMT aus Brustepithelzellen, bei denen das Verhältnis der Methylierung an C-2- und C-3-Position 2:1 betrug (Goodman et al., 2002).

Da kein Peak bei 13,1 min beobachtet und somit kein 2-HO-E2 im Extrakt der Umsetzung nachgewiesen wurde (Abb. 7), war von einer vollständigen Umsetzung dieses Catechols auszugehen. Für die Quantifizierung von 4-HO-E2 in V79-Zellen wurde jedoch 2-HO-E2 als interner Standard benötigt. Aus diesem Grund wurde dem Methylcatechol-haltigen Extrakt nachträglich 2-HO-E2 zugegeben. Das so hergestellte Standardgemisch wurde zur

Quantifizierung von 4-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukten in V79-Zellen verwendet (Abb. 8).

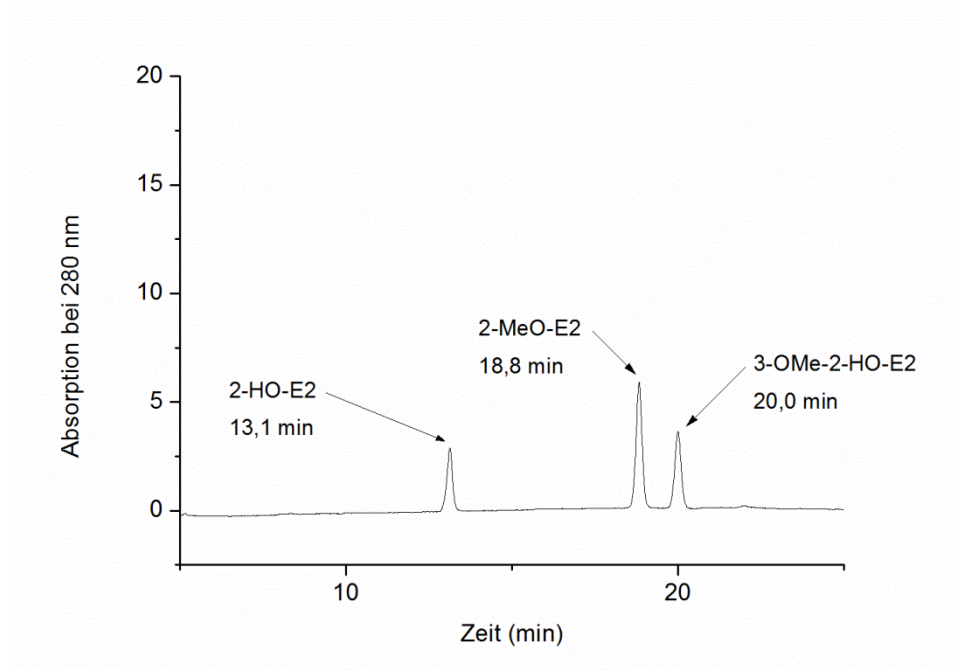


Abb. 8: HPLC-Chromatogramm nach Zugabe von 19 μg 2-HO-E2 zum methanolischen Extrakt der Umsetzung von 100 μM 2-HO-E2 mit 4 mg cytosolischer COMT aus Rattenleber in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Analysebedingungen: Kap.3.2.13.

4.1.5.2 Synthese eines Standardgemisches aus 4-HO-, 4-MeO- und 3-OMe-4-HO-E2

Zur Quantifizierung von 2-HO-E2, 2-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2 in V79-Zellen wurde ein Standardgemisch aus 4-HO-E2, 4-MeO-E2 und 3-OMe-4-HO-E2 benötigt, welches durch Umsetzung von 4-HO-E2 mit cytosolischer COMT aus Leber von SD-Ratten synthetisiert wurde (Kap. 3.2.13).

Erwartungsgemäß wurden im MeOH-Extrakt der Umsetzung von 4-HO-E2 mit COMT aus Rattenlebercytosol 4-MeO-E2 und 3-OMe-4-HO-E2 nachgewiesen. 4-HO-E2 war hingegen nicht mehr nachweisbar (Abb. 9).

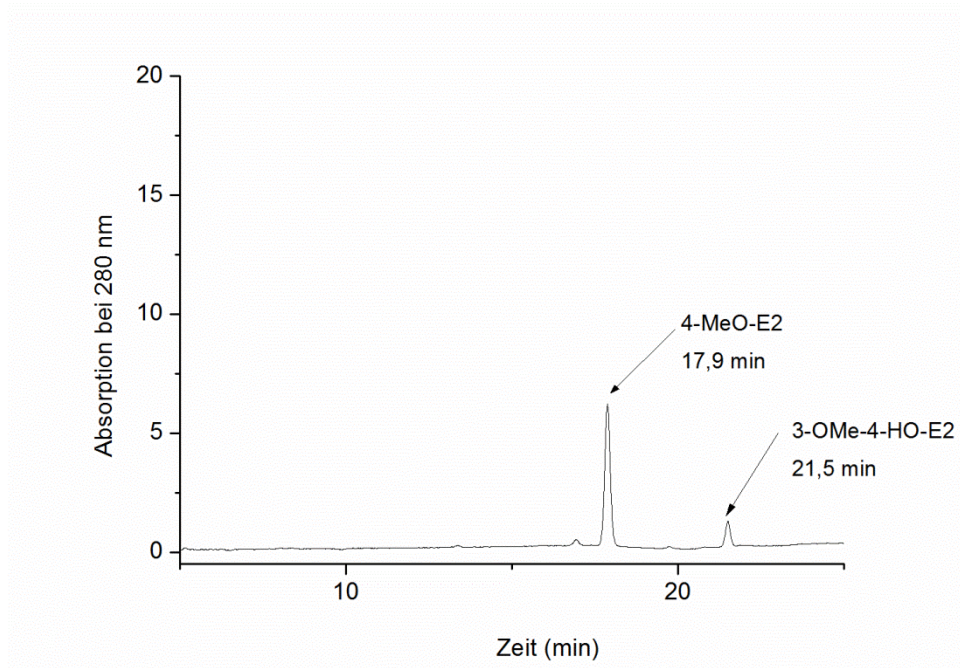


Abb. 9: HPLC-Chromatogramm des methanolischen Extrakts der Umsetzung von 100 µM 4-HO-E2 mit 4 mg cytosolischer COMT aus Rattenleber in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Nach Extraktion der Umsetzungsprodukte mit Ethylacetat und dessen Abvaporieren wurde der Rückstand in 1 ml MeOH aufgenommen und 30 µl davon mittels HPLC analysiert. Analysebedingungen: Kap.3.2.13.

Das PFV von 4-MeO-E2 zu 3-OMe-4-HO-E2 betrug 6,3 und stimmte somit annähernd mit dem PFV von 6,1 überein, welches Jörg Freudenberger (2009) im Rahmen seiner wissenschaftlichen Abschlussarbeit ermittelte. Anhand des beobachteten PFV und unter der Annahme gleicher Responsefaktoren für beide Methylcatechole ist von einer Bevorzugung der 3-O- gegenüber der 4-O-Methylierung auszugehen. Dieses Ergebnis deckt sich mit weiteren Studien, bei denen keine (Dawling et al., 2001; Goodman et al., 2002) oder nur eine sehr geringe 3-O-Methylierung von 4-HO-E2 beobachtet wurde (Roy et al., 1990; Lehmann et al., 2008).

Da kein Peak bei 13,4 min beobachtet und somit kein 4-HO-E2 im Extrakt der Umsetzung nachgewiesen wurde (Abb. 9), war von einer vollständigen Umsetzung dieses Catechols auszugehen. Für die Quantifizierung von 2-HO-E2 in V79-Zellen wurde jedoch 4-HO-E2 als interner Standard benötigt. Aus diesem Grund wurde dem Methylcatechol-haltigen Extrakt nachträglich 4-HO-E2 zugegeben. Das so hergestellte Standardgemisch wurde zur Quantifizierung von 2-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukten in V79-Zellen verwendet (Abb. 10).

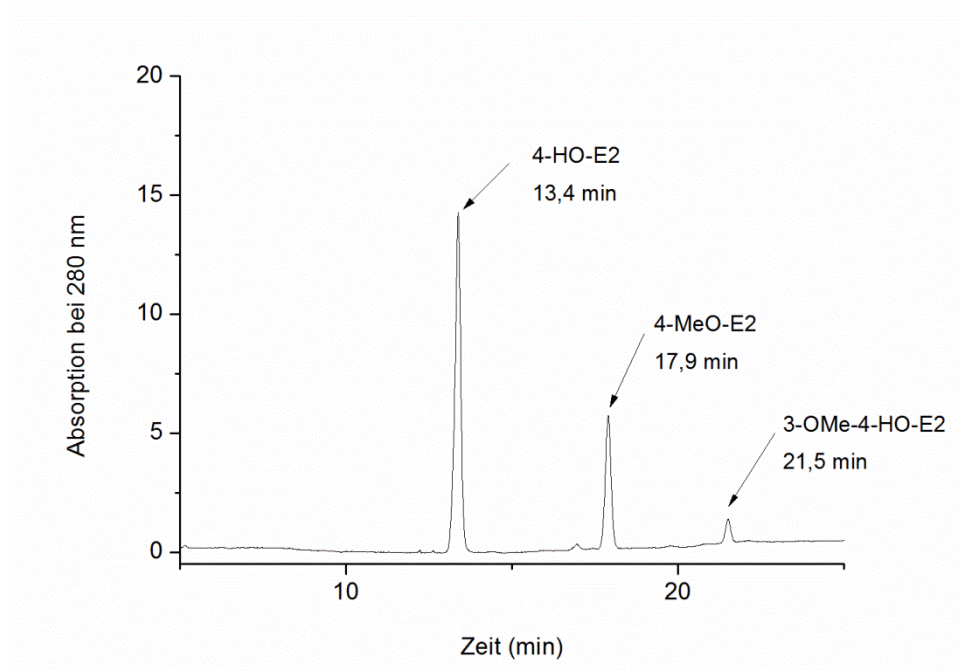


Abb. 10: HPLC-Chromatogramm nach Zugabe von 18 µg 4-HO-E2 zum methanolischen Extrakt der Umsetzung von 100 µM 4-HO-E2 mit cytosolischer COMT aus Rattenleber in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Analysebedingungen: Kap.3.2.13.

4.1.5.3 Wiederfindung der internen Standards

Wenn sich die Konzentration eines Analyten, zum Beispiel durch Verluste bei der SPE, während der Probenaufarbeitung verändert, geschieht dies in gleicher Weise mit dem internen Standard. Daher sollte die zugegebene Menge an internem Standard näherungsweise der des Zielanalyten entsprechen. Außerdem sollten die Mengen an Standard und Analyt im gleichen Bereich liegen, damit deren Response bei der MS-Analyse vergleichbar ist. Um diese Bedingung zu erfüllen, muss vor der Dotierung der Proben der Standard entsprechend verdünnt werden. Für eine richtige Verdünnung der Standardgemische war es daher notwendig, deren Wiederfindung zu bestimmen.

Zur Bestimmung der Wiederfindung der internen Standards wurde der Gehalt jeder Komponente des jeweiligen Standardgemisches über deren PFV zum internen Gerätestandard (ChAN) mit und ohne SPE-Aufarbeitung (Kap.3.2.12) bestimmt und miteinander verglichen.

4.1.5.3.1 Wiederfindung von 2-HO-E2, 2-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2

Ohne SPE-Aufarbeitung lagen die PFV bei 90 ± 10 (2-MeO-E2), 64 ± 5 (3-OMe-2-HO-E2) und 25 ± 4 (2-HO-E2, Abb. 11). Nach der SPE lagen sie bei 17 ± 1 (2-MeO-E2), 12 ± 1 (3-OMe-2-HO-E2) und $1 \pm 0,2$ (2-HO-E2).

Die daraus errechneten Wiederfindungsraten betragen $18,9\% \pm 2,4\%$ bei 2-MeO-E2, $19,1\% \pm 2,1\%$ bei 3-OMe-2-HO-E2 und nur $4,1\% \pm 0,8\%$ bei 2-HO-E2. Somit war bei allen 3 Komponenten des Standardgemisches eine statistisch signifikante Reduktion der Analytmenge nach der SPE zu verzeichnen. Dies wurde in den nachfolgenden Versuchen bei der Dotierung der Proben mit internem Standardgemisch berücksichtigt.

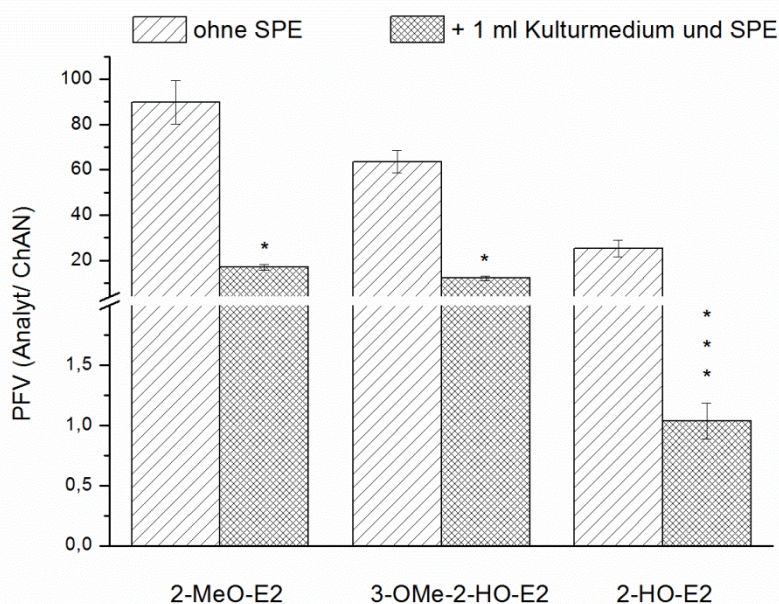


Abb. 11: PFV von 2-MeO-E2, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-HO-E2 zu ChAN in 10 μ l Standardgemisch ohne SPE-Aufarbeitung sowie von 10 μ l Standardgemisch zugegeben zu 1 ml Kulturmedium von V79-Zellen und anschließend mittels SPE aufgearbeitet. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Bestimmungen, jeweils 1-fach aufgearbeitet und 1-fach vermessen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Bestimmungen ohne SPE- und mit SPE-Aufarbeitung wurden mittels eines unabhängigen t-Tests ermittelt (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$). Daten im Anhang, Tab. 25 und Tab. 26.

4.1.5.3.2 Wiederfindung von 4-HO-E2, 4-MeO-E2 und 3-OMe-4-HO-E2

Ohne SPE-Aufarbeitung lagen die PFV bei 22 ± 1 (4-MeO-E2), $0,8 \pm 0,03$ (3-OMe-4-HO-E2) und 30 ± 2 (4-HO-E2, Abb. 12). Nach der SPE reduzierten sie sich signifikant auf $2,6 \pm 0,1$ (4-MeO-E2), $0,2 \pm 0,01$ (3-OMe-4-HO-E2) und $1,5 \pm 0,1$ (4-HO-E2).

Die daraus errechneten Wiederfindungsraten ($12\% \pm 1\%$ bei 4-MeO-E2, $24\% \pm 2\%$ bei 3-OMe-4-HO-E2 und $5,0\% \pm 0,3\%$ bei 4-HO-E2) ähnelten denjenigen von 2-MeO-E2, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-HO-E2 (Kap. 4.1.5.3.1) und wiesen somit auf hohe Analytverluste bei

der SPE-Aufarbeitung hin. Dies wurde in den nachfolgenden Versuchen bei der Dotierung der Proben mit internem Standardgemisch berücksichtigt.

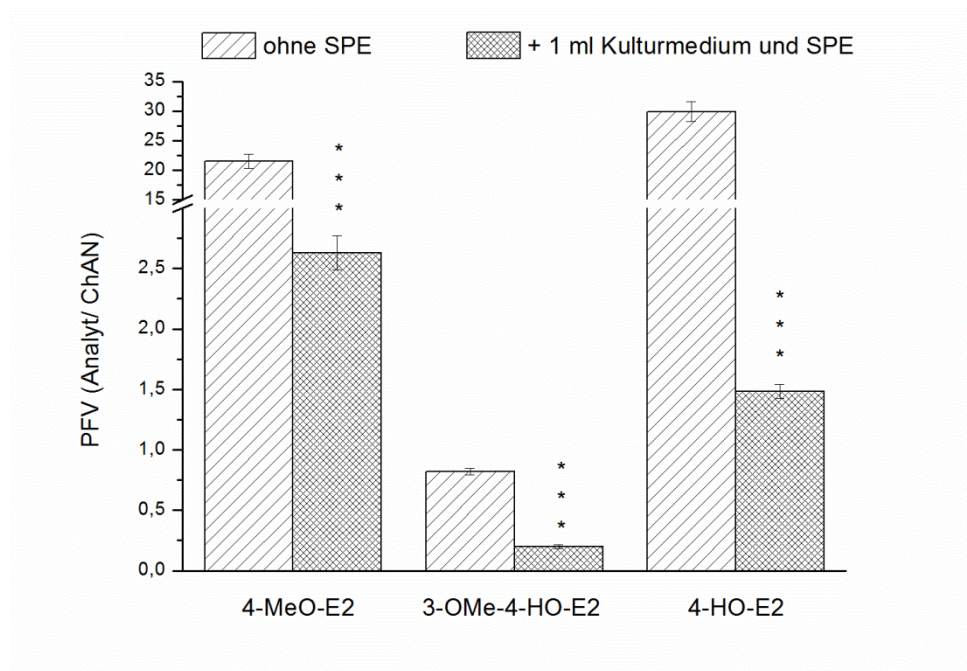


Abb. 12: PFV von 4-MeO-E2, 3-OMe-4-HO-E2 und 4-HO-E2 zu ChAN in 10 μ l Standardgemisch ohne SPE-Aufarbeitung sowie von 10 μ l Standardgemisch zugegeben zu 1 ml Kulturmedium von V79-Zellen und anschließend mittels SPE aufgearbeitet. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Bestimmungen, jeweils 1-fach aufgearbeitet und 1-fach vermessen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Bestimmungen ohne SPE- und mit SPE-Aufarbeitung wurden mittels eines unabhängigen t-Tests ermittelt (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$). Daten im Anhang, Tab. 27 und

Tab. 28.

4.1.5.3.3 Wiederfindung von D-E2, D-4-MeO-E2, D-3-OMe-2-HO-E2, D-2-MeO-E2 und D-2-HO-E2

Ohne SPE-Aufarbeitung lagen die PFV bei 17 ± 1 (D-E2), $0,1 \pm 0,004$ (D-4-MeO-E2), $0,8 \pm 0,1$ (D-3-OMe-2-HO-E2), $1 \pm 0,1$ (D-2-MeO-E2) und $0,1 \pm 0,002$ (D-2-HO-E2, Abb. 13). Nach der SPE lagen sie bei $2,2 \pm 0,2$ (D-E2), $0,01 \pm 0,003$ (D-4-MeO-E2), $0,1 \pm 0,01$ (D-3-OMe-2-HO-E2), $0,1 \pm 0,03$ (D-2-MeO-E2) und $0,01 \pm 0,004$ (2-HO-E2).

Die daraus errechnete Wiederfindungsrate betrug $13\% \pm 2\%$ bei D-E2, $13\% \pm 5\%$ bei D-4-MeO-E2, $10\% \pm 2\%$ bei D-3-OMe-2-HO-E2, $10\% \pm 3\%$ bei D-2-MeO-E2 und $10\% \pm 7\%$ bei D-2-HO-E2.

Ähnlich wie bei den nicht-deuterten Standardgemischen war bei allen Komponenten des deuterten Standardgemisches eine statistisch signifikante Reduktion der Analytmenge nach der SPE zu verzeichnen. Dies wurde in den nachfolgenden Versuchen bei der Dotierung der Proben mit internem Standardgemisch berücksichtigt.

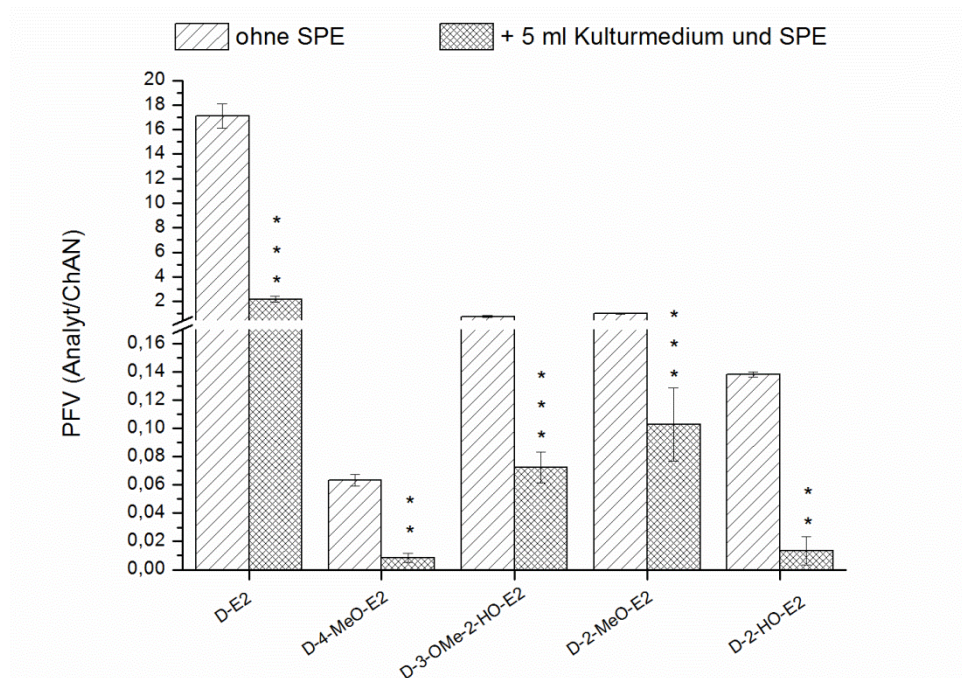


Abb. 13: PFV von D-E2, D-4-MeO-E2, D-3-OMe-2-HO-E2, D-2-MeO-E2 und D-2-HO-E2 zu ChAN in 10 µl Standardgemisch ohne SPE-Aufarbeitung sowie von 10 µl Standardgemisch zugegeben zu 5 ml Kulturmedium von V79-Zellen und anschließend mittels SPE aufgearbeitet. Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Bestimmungen, jeweils 1-fach aufgearbeitet und 3-fach vermessen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Bestimmungen ohne SPE- und mit SPE-Aufarbeitung wurden mittels eines unabhängigen t-Tests ermittelt (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$). Daten im Anhang,

Tab. 29 und

Tab. 30.

4.1.6 Metabolitenverteilung zwischen Zellen und Kulturmedium

Zur Bestimmung des Metabolitenprofils in V79- und V79 hCYP1A1-Zellen nach Behandlung mit E2 und dessen Catecholderivaten muss zunächst bekannt sein, ob die intrazellulär gebildeten Metabolite ins Kulturmedium abgegeben werden oder in den Zellen verbleiben. Da die V79 hCYP1A1-Zellen lediglich durch stabile Transfektion der V79-Zellen mit hCYP1A1 erzeugt wurden (Doehmer, 1993; Schmalix et al., 1993), ist anzunehmen, dass die COMT-Aktivität beider Zelllinien gleich ist und somit die Methylierung eines Catechols in gleichem Umfang erfolgt. Zudem ist zu erwarten, dass die gebildeten Metabolite in beiden

Zelllinien gleichermaßen ins Medium abgegeben oder in den Zellen verbleiben werden. Um dies zu untersuchen, wurden V79-Zellen für 24 h mit 2,5 µM 2-HO-E2 unter HPRT-Bedingungen inkubiert (Kap.3.2.5) und anschließend sowohl die Zellsuspension im Medium als auch Zellen und Medium getrennt voneinander gesammelt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Probenaufarbeitung mittels SPE (Kap.3.2.12) im Biofreezer bei -80°C gelagert. Nach der SPE wurden die Proben mit BSTFA trimethylsilyliert und das Metabolitenprofil mittels GC/MS/MS untersucht (Kap. 3.2.14).

Sowohl in den Zellen als auch im zellhaltigen und im zellfreien Kulturmedium wurden 2-HO-E2 sowie dessen Methylcatechole, 2-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2, nachgewiesen (Chromatogramme im Anhang, Abb. 55 bis Abb. 57).

Um einen Überblick über die Verteilung von 2-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukten in den Zellen und im Kulturmedium zu erhalten, wurden die Peakflächen aller Analyten addiert, deren Addition gleich 100 Prozent gesetzt und die einzelnen Peakflächen darauf bezogen.

Bei Inkubation mit 2,5 µM 2-HO-E2 wurden nicht umgesetztes 2-HO-E2 und dessen Metabolite, 2-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2, zu 97,0% ± 1,8% im Medium nachgewiesen, während 3,0% ± 1,8% der detektierten Verbindungen in den Zellen zu finden waren.

Von den im Kulturmedium nachgewiesenen Analyten machte 2-MeO-E2 94,5% ± 0,8% der Summe aller Peakflächen aus, 4,5% ± 0,5% waren 3-OMe-2-HO-E2 und 1,0% ± 0,4% 2-HO-E2 (Abb. 14, Daten im Anhang, Tab. 19 bis Tab. 21).

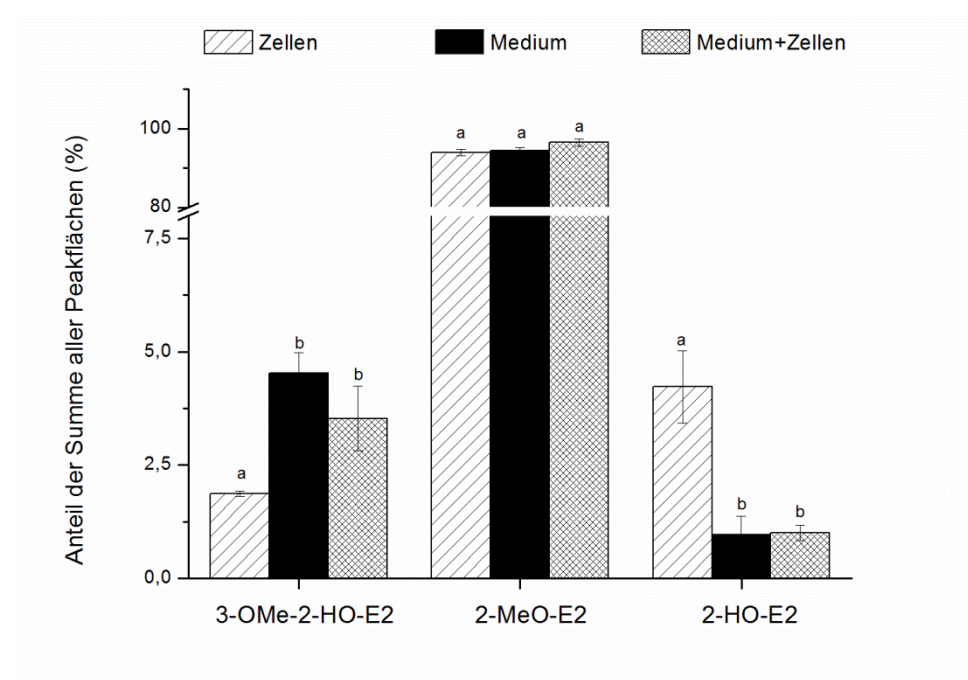


Abb. 14: Prozentuale Verteilung von 2-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukten nach 24-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit 2,5 µM 2-HO-E2 (Kap.3.2.5) und anschließender Aufarbeitung und Analyse der Zellen (ca. 20 Mio) und deren Kulturmedium (25 ml) separat und vereinigt (Kap. 3.2.12 und Kap. 3.2.14). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Bestimmungen. Unterschiedliche Buchstaben (a-b) zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA, Scheffé, $p < 0,05$). Daten im Anhang, Tab. 19 bis Tab. 21.

In den Zellen machte 2-MeO-E2 ebenfalls den größten Anteil der Summe aller Peakflächen aus ($93,9\% \pm 0,9\%$), jedoch betrug der 3-OMe-2-HO-E2-Anteil $1,9\% \pm 0,1\%$ und der 2-HO-E2-Anteil $4,2\% \pm 0,8\%$. Im Vergleich hierzu waren in der Zellsuspension im Medium $95,5\% \pm 0,8\%$ 2-MeO-E2, $3,5\% \pm 0,7\%$ 3-OMe-2-HO-E2 und $1,0\% \pm 0,2\%$ 2-HO-E2 (Abb. 14).

Bemerkenswert war, dass sich die prozentuale Verteilung von 3-OMe-2-HO-E2 und 2-HO-E2 in den Zellen signifikant von derjenigen im zellfreien und zellhaltigen Kulturmedium unterschied. Der 3-OMe-2-HO-E2-Anteil im zellfreien ($4,5\% \pm 0,5\%$) und -haltigen ($3,5\% \pm 0,7\%$) Medium war zweimal höher als in den Zellen ($1,9\% \pm 0,1\%$). Im Gegensatz hierzu war der 2-HO-E2 Anteil in den Zellen ($4,2\% \pm 0,8\%$) viermal höher als der 2-HO-E2-Anteil im zellfreien ($1,0\% \pm 0,4\%$) und -haltigen ($1,0\% \pm 0,2\%$) Medium, was vermutlich daran liegt, dass 2-HO-E2 polarer als dessen beiden Methylcatechole ist (Zhu und Conney, 1998) und somit schlechter durch die unpolare Zellmembran heraus diffundieren kann.

Aufgrund des geringen Anteils an 2-HO-E2, 2-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2, das sich in den Zellen befand (insgesamt $3,0\% \pm 1,8\%$), war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Aufarbeitung von Medium mit und ohne Zellen festzustellen (Abb. 15).

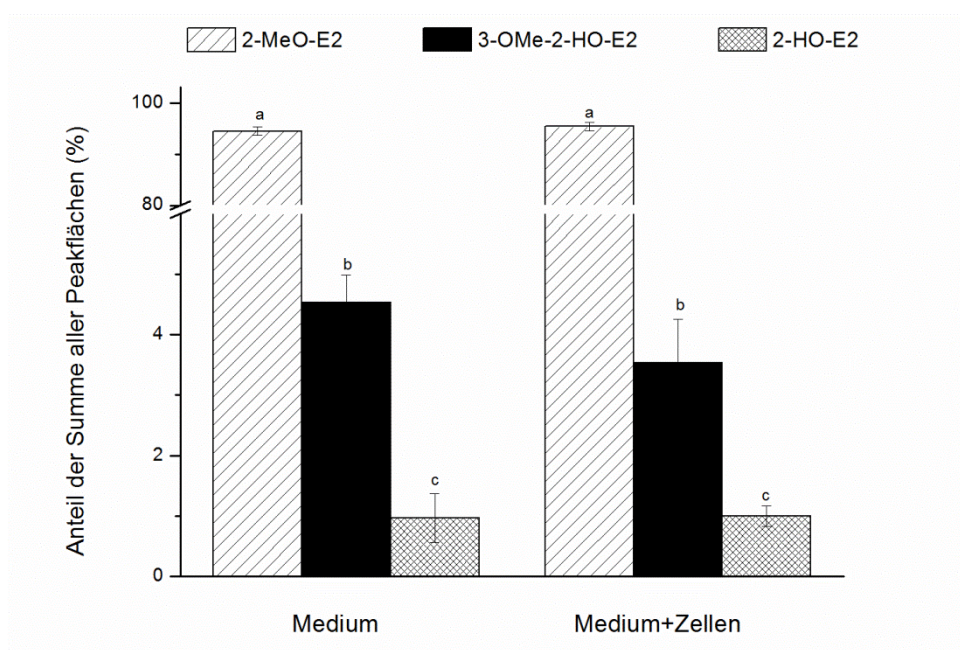


Abb. 15: Prozentuale Verteilung von 2-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukten nach 24-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit 2,5 μM 2-HO-E2 (Kap.3.2.5) und anschließender Aufarbeitung und Analyse von je 25 ml des zellfreien und zellhaltigen (ca. 800000 Zellen/ml) Mediums (Kap. 3.2.12 und Kap. 3.2.14). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Bestimmungen. Signifikante Unterschiedliche Buchstaben (a-c) zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA, Scheffé, $p < 0,05$). Daten im Anhang, Tab. 19 bis Tab. 21.

Aus diesem Grund wurde in den nachfolgenden Versuchen, die der Untersuchung des Metabolitenprofils von E2 und dessen Catecholderivaten in V79- und V79hCYP1A1-Zellen dienten, nur das Kulturmedium aufgearbeitet.

4.1.7 Optimierung des Probevolumens für die Festphasenextraktion

Da die Bestimmung des Metabolitenprofils von 2-HO-E2 im zellfreien Kulturmedium erfolgen sollte, war nun zu klären, welches Mindestvolumen an Medium erforderlich ist, um 2-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukte quantifizieren zu können.

Zur Ermittlung des optimalen Probevolumens für die SPE wurden V79-Zellen 24 h lang mit 2,5 μM 2-HO-E2 inkubiert (Kap.3.2.5) und daraufhin 5 ml, 10 ml sowie 25 ml Kulturmedium aufgearbeitet (Kap.3.2.12) und mittels GC-MS² analysiert (Kap. 3.2.14). Im Kulturmedium wurden 2-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukte, 2-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2, nachgewiesen. Wie erwartet, stiegen die Peakflächen mit der Menge an aufgearbeitetem Medium an (Abb. 16, Daten im Anhang, Tab. 22).

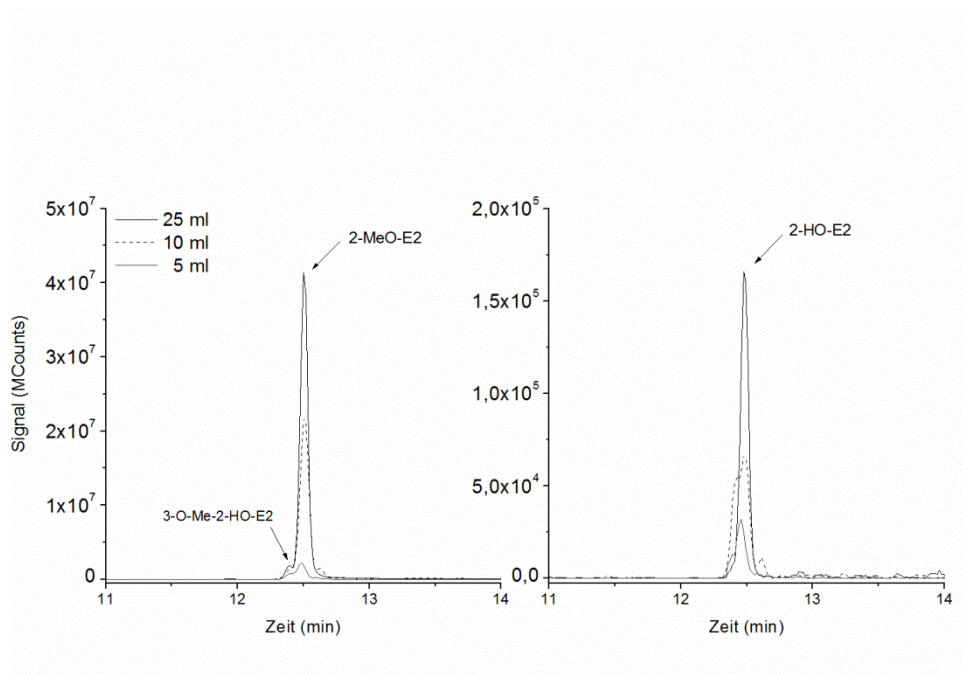


Abb. 16: MRM-Chromatogramm von 2-MeO-E2, 3-OMe-2HO-E2 und 2-HO-E2 nach Aufarbeitung und Analyse von 5 ml, 10 ml und 25 ml des Kulturmediums von ca. 20 Mio V79-Zellen, die zuvor

24 h lang mit 2,5 µM 2-HO-E2 unter HPRT-Bedingungen behandelt wurden (Kap.3.2.5). Dargestellt sind die extrahierten Quantifier-Massenspuren der Übergänge 446>315 für die derivatisierten Methylierungsprodukte, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-MeO-E2 (links), sowie 504>373 für trimethylsilyliertes 2-HO-E2 (rechts). Daten im Anhang, Tab. 22.

Bei der Aufarbeitung von 5 ml Medium lag das PFV vom Analyt zum internen Gerüststandard, ChAN, bei $0,05 \pm 0,01$ (3-OMe-2-HO-E2), $1,1 \pm 0,2$ (2-MeO-E2) und $0,01 \pm 0,001$ (2-HO-E2, Abb. 17, Daten im Anhang, Tab. 23). Im Vergleich hierzu stiegen die PFV beider Methylcatechole bei Aufarbeitung von 10 ml Medium signifikant (um etwa Faktor 10) an. Das PFV von 2-HO-E2 stieg zwar an, jedoch war der Anstieg nicht signifikant.

Bei der Aufarbeitung von 25 ml Medium verdoppelten sich die PFV beider Methylcatechole im Vergleich zur Aufarbeitung von 10 ml Medium. Das PFV von 2-HO-E2 blieb dagegen konstant im Bereich 0,03-0,05 (Abb. 17). Somit zeigte die Aufarbeitung von 10 und 25 ml Medium keinen Vorteil gegenüber der Aufarbeitung von 5 ml Medium.

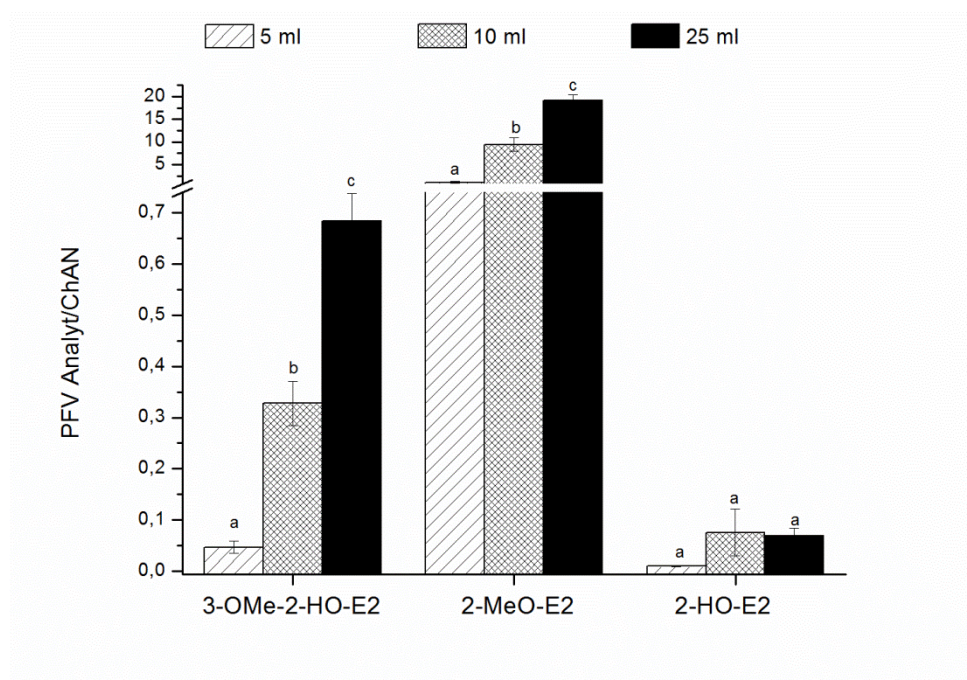


Abb. 17 PFV von 2-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukten zu ChAN nach Aufarbeitung und Analyse von 5 ml, 10 ml und 25 ml des Kulturmediums von ca. 20 Mio V79-Zellen, die zuvor 24 h lang mit 2,5 µM 2-HO-E2 inkubiert wurden (Kap.3.2.5). Signifikante Unterschiede bei der Aufarbeitung von 5, 10 und 25 ml Medium wurden bei jedem einzelnen Analyten mittels ANOVA (Scheffé, $p < 0,05$) untersucht. Unterschiedliche Buchstaben (a-c) zeigen statistisch signifikante Unterschiede an. Daten im Anhang, Tab. 23.

Für eine zuverlässige Quantifizierung der nachgewiesenen Analyten soll deren Bestimmungsgrenze mindestens dreimal so hoch wie die Nachweisgrenze sein (DIN 32645).

Letztere wird üblicherweise mit Hilfe des Signal/Rausch (engl. *signal/noise*, S/N) – Verhältnisses ermittelt. Hierfür wird in Lehrbüchern ein S/N-Bereich von 3-10 angegeben. Das bedeutet, dass für eine zuverlässige Quantifizierung ein S/N-Verhältnis im Bereich 9-30 erforderlich ist.

Die S/N-Verhältnisse bei Aufarbeitung von 5 ml Medium lagen für alle drei untersuchten Analyten weit über 30 (Tab. 11). Das kleinste S/N-Verhältnis lag beispielsweise bei 250 ± 113 (3-OMe-2-HO-E2, Abb. 18).

Tab. 11: S/N-Verhältnis von 2-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukten, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-MeO-E2, nach Aufarbeitung von 5, 10 und 25 ml Kulturmedium von ca. 20 Mio V79-Zellen, die zuvor einer 24-stündigen Inkubation mit $2,5 \mu\text{M}$ 2-HO-E2 unterzogen wurden (Kap.3.2.5). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Bestimmungen. Daten im Anhang, Tab. 24.

Analyt	S/N
5 ml	
3-OMe-2-HO-E2	250 ± 113
2-MeO-E2	1134 ± 807
2-HO-E2	7804 ± 2147
10 ml	
3-OMe-2-HO-E2	280 ± 121
2-MeO-E2	3364 ± 1403
2-HO-E2	299 ± 136
25 ml	
3-OMe-2-HO-E2	506 ± 221
2-MeO-E2	5624 ± 4465
2-HO-E2	1792 ± 2200

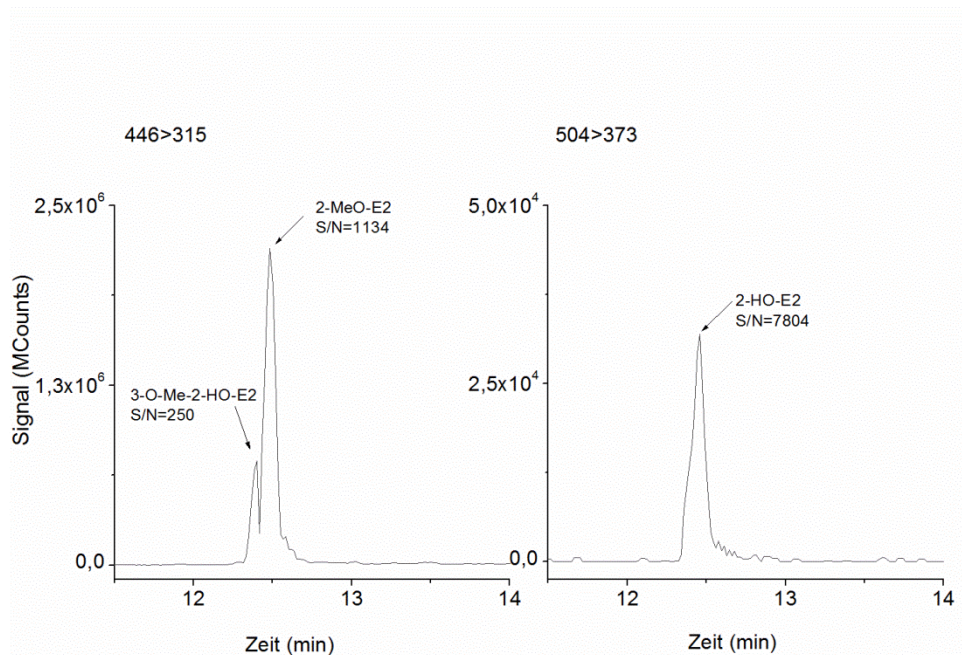


Abb. 18: MRM-Chromatogramm von 2-MeO-E2, 3-OMe-2HO-E2 und 2-HO-E2 nach Aufarbeitung und Analyse von 5 ml Kulturmedium von V79-Zellen (800000 Zellen/ml), die zuvor 24 h lang mit 2,5 μ M 2-HO-E2 unter HPRT-Bedingungen behandelt wurden (Kap.3.2.5). Dargestellt sind die extrahierten Quantifizier-Massenspuren der Übergänge 446>315 für die derivatisierten Methylierungsprodukte, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-MeO-E2 (links), sowie 504>373 für trimethylsilyliertes 2-HO-E2 (rechts). Daten im Anhang, Tab. 24.

Bei der Aufarbeitung von 10 und 25 ml Medium ließen sich die S/N-Verhältnisse nicht signifikant verbessern. Somit war die Aufarbeitung von 5 ml Medium (entspricht 4 Millionen Zellen) ausreichend für eine zuverlässige Quantifizierung. Da die S/N-Verhältnisse aller Analyten weit über dem angestrebten Grenzbereich (9-30) lagen und unter der Annahme, dass sich das S/N-Verhältnis im Bereich 1-5 ml proportional zum Probevolumen beziehungsweise zur Zellzahl verhält, wäre auch der Einsatz von 1 ml Medium für die SPE-Aufarbeitung möglich.

4.1.8 Hemmung der COMT-Aktivität

Zur Hemmung der COMT *in vitro* können verschiedene Inhibitoren verwendet werden. Unter den COMT-Inhibitoren weisen Nitrocatechol-Derivate, insbesondere solche mit Nitrogruppen in ortho-Position zu einer Hydroxylgruppe (Backstrom et al., 1989), die höchste Wirksamkeit und Selektivität auf (Borges et al., 1997). Aus diesem Grund wurde für die folgenden Versuche 3,5-Dinitrocatechol (Abb. 19), auch als OR-486 bekannt (Mannisto und Kaakkola, 1999), als COMT-Inhibitor ausgewählt.

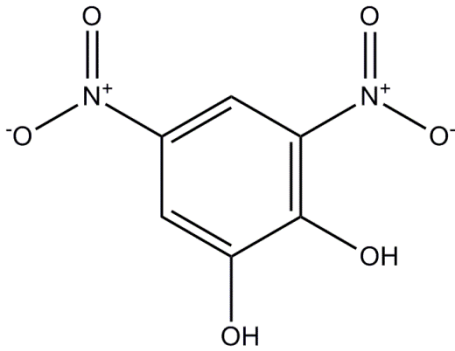


Abb. 19: Strukturformel von OR-486.

Als Nächstes sollte nun der Konzentrationsbereich von OR-486 festgelegt werden, in dem keine zytotoxischen Effekte auf V79-Zellen auftreten.

Daraufhin sollte innerhalb dieses Konzentrationsbereiches eine OR-486-Konzentration ermittelt werden, die eine möglichst starke Reduktion der COMT-Aktivität in V79-Zellen bewirkt. Da die COMT 2-HO-E2 gegenüber 4-HO-E2 als Substrat bevorzugt (Lautala et al., 2001), diene als Maß für die Reduktion der COMT-Aktivität die statistisch signifikante Verschiebung des Metabolitenprofils von 2-HO-E2 in V79-Zellen, die zuvor mit OR-486 behandelt wurden.

4.1.8.1 Zytotoxizität von OR-486 in V79-Zellen

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von OR-486 wurden V79-Zellen einer 24-stündigen Inkubation mit 1 nM, 10 nM, 0,1 μ M, 10 μ M, 20 μ M und 40 μ M OR-486 unterzogen (Kap. 3.2.5) und anschließend die Zellzahl (Kap. 3.2.3) sowie die PE1 bestimmt. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO in einer Endkonzentration von 0,05% (v/v) mitgeführt.

Nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit OR-486-Konzentrationen zwischen 1 nM und 20 μ M war weder bei der Zellzahl ($95,8\% \pm 4,2\%$) noch bei der PE1 ($101,6\% \pm 8,7\%$) eine statistisch signifikante Reduktion im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Zellzahl: $100,0\% \pm 5,2\%$; PE1: $100,0\% \pm 2,9\%$) zu verzeichnen. Im Gegensatz hierzu wurde bei der PE1 bereits ab einer Konzentration von 40 μ M OR-486 eine statistisch signifikante Reduktion ($80,8\% \pm 7,8\%$) beobachtet (Abb. 20, Daten im Anhang, Tab. 16 und Tab. 17). Somit wirkt der COMT-Inhibitor OR-486 ab 40 μ M zytotoxisch auf V79-Zellen.

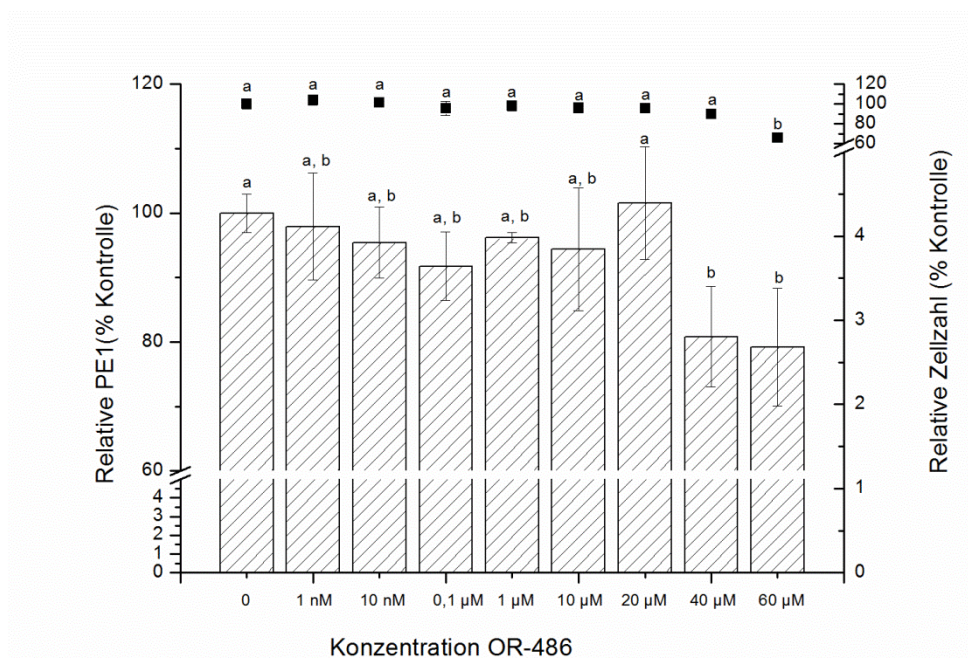


Abb. 20: PE1 (Balken, linke y-Achse) und Zellzahl (schwarze Symbole, rechte y-Achse) von V79-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit OR-486 bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (0,05% DMSO, 0 μ M). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei (1 nM – 60 μ M) beziehungsweise sechs (0 μ M) unabhängigen Versuchen. Unterschiedliche Buchstaben (a-b) zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA, Scheffé, $p < 0,05$). Daten im Anhang, Tab. 16 und Tab. 17.

4.1.8.2 Ermittlung einer OR-486-Konzentration zur maximalen Reduktion der COMT-Aktivität in V79-Zellen

Nachdem der OR-486-Konzentrationsbereich festgelegt wurde, in dem keine zytotoxische Wirkung in V79-Zellen beobachtet wird (Kap. 4.1.4.1), wurden innerhalb dieses Konzentrationsbereiches zwei hohe und zwei niedrige Konzentrationen ausgesucht. Daraus wurde nun eine OR-486-Konzentration ermittelt, die eine möglichst starke Reduktion der COMT-Aktivität bewirkt.

Zu diesem Zweck wurden V79-Zellen 30 min lang mit je 1 nM, 0,1 μ M, 10 μ M und 20 μ M OR-486 vorinkubiert und anschließend einer 23,5-stündigen Co-Inkubation mit 1,25 μ M 2-HO-E2 unterzogen (Kap. 3.2.6). Als Vergleich hierzu wurden V79-Zellen ausschließlich mit 1,25 μ M 2-HO-E2 für 24 h inkubiert (Kontrollgruppe). Daraufhin wurden die Kulturmedien der Kontrollgruppe und der mit OR-486 und 2-HO-E2 behandelten Zellen mittels SPE aufgearbeitet (Kap. 3.2.7). Anschließend wurden die Metabolitenprofile von 2-HO-E2 in den Kulturmedien der behandelten und der unbehandelten Zellen mittels GC/MS/MS untersucht (Kap. 3.2.8) und miteinander verglichen.

Um einen Überblick über die Verteilung von 2-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukten im Kulturmedium zu erhalten, wurden die Peakflächen aller Analyten addiert, deren Addition gleich 100 Prozent gesetzt und die einzelnen Peakflächen darauf bezogen.

Im Kulturmedium der Kontrollgruppe wurden 2-MeO-E2, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-HO-E2 nachgewiesen (Chromatogramm im Anhang, Abb. 59).

Erwartungsgemäß (Dawling et al., 2001) machte 2-MeO-E2 mit $96,1\% \pm 0,23$ (Abb. 21, Daten im Anhang Tab. 31 und Tab. 32) den größten Anteil der gebildeten Methylcatechole aus. 3-OMe-2-HO-E2 machte $3,1\% \pm 0,2\%$ der Summe aller Peakflächen aus und 2-HO-E2 $0,8\% \pm 0,3\%$.

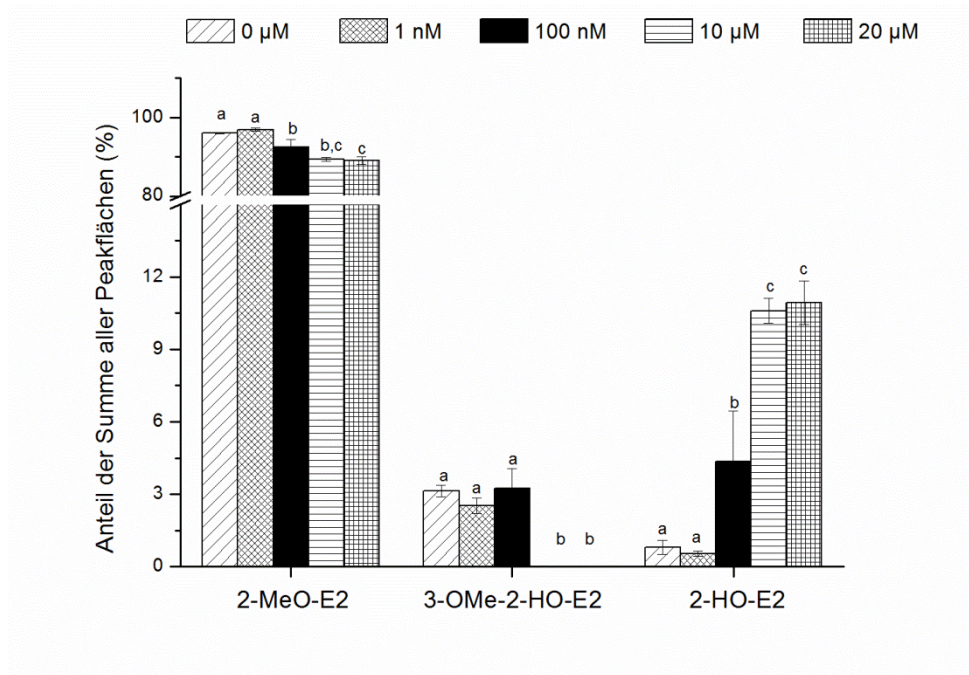


Abb. 21: Prozentuale Verteilung von 2-MeO-E2, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-HO-E2 nach 30-minütiger Inkubation von V79-Zellen mit 0 nM, 1 nM, 100 nM, 10 μM und 20 μM OR-486 und anschließender 23,5-stündiger Inkubation mit 1,25 μM 2-HO-E2 (Kap. 3.2.6). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Bestimmungen. Signifikante Unterschiede durch Buchstaben (a-c) zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA, Scheffé, $p < 0,05$). Daten im Anhang, Tab. 31 und Tab. 32.

Das Metabolitenprofil der Zellen, die mit 1,25 μM 2-HO-E2 und 1 nM OR-486 behandelt wurden, unterschied sich mit $96,9\% \pm 0,4\%$ 2-MeO-E2, $2,5\% \pm 0,3\%$ 3-OMe-2-HO-E2 und $0,5\% \pm 0,1\%$ 2-HO-E2 statistisch nicht signifikant von demjenigen der Kontrollgruppe ohne OR-486 (Abb. 21). Somit bewirkte eine Konzentration von 1 nM OR-486 keine nachweisbare Hemmung der COMT in V79-Zellen.

Bei den mit 1,25 μM 2-HO-E2 und 100 nM OR-486 inkubierten Zellen wurden $92,4\% \pm 2,1\%$ 2-MeO-E2, $3,2\% \pm 0,8\%$ 3-OMe-2-HO-E2 und $4,4\% \pm 2,1\%$ 2-HO-E2 nachgewiesen. Die Hemmung der COMT mit 100 nM OR-486 bewirkte zwar eine Steigerung der prozentualen Menge an freiem 2-HO-E2 um das 5,5-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe, jedoch war kein statistisch signifikanter Unterschied in der Verteilung der Metabolite zu beobachten (Abb. 21).

Nach Inkubation der Zellen mit 1,25 μM 2-HO-E2 und 10 μM OR-486 waren im Kulturmedium $89,4\% \pm 0,5\%$ 2-MeO-E2 sowie $10,6\% \pm 0,5\%$ 2-HO-E2 enthalten. 3-OMe-2-HO-E2 war dagegen nicht nachweisbar. Somit bewirkte die Hemmung der COMT mit 10 μM OR-486 eine Steigerung der prozentualen Menge an freiem 2-HO-E2 um das 13,3-fache und

eine statistisch signifikante Änderung des Metabolitenprofils im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 21).

Nach Inkubation der Zellen mit 1,25 μM 2-HO-E2 und 20 μM OR-486 ergaben sich folgende Metabolitenverhältnisse: 89,1% \pm 0,9% 2-MeO-E2 sowie 10,9% \pm 0,9% 2-HO-E2. Wie erwartet, unterschied sich das beobachtete Metabolitenprofil statistisch signifikant von demjenigen der Kontrollgruppe. Allerdings ließ sich die prozentuale Menge an freiem 2-HO-E2 im Vergleich zur Inkubation mit 1,25 μM 2-HO-E2 und 10 μM OR-486 nur geringfügig steigern: Während die COMT-Hemmung mit 10 μM OR-486 eine Steigerung des prozentualen Anteils an freiem 2-HO-E2 um das 13,3-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkte, erhöhte sich die prozentuale Menge an freiem 2-HO-E2 nach COMT-Hemmung mit 20 μM OR-486 um das 13,6-fache (Abb. 21).

Da OR-486 die COMT kompetitiv hemmt (Backstrom et al., 1989) und in den Folgeversuchen mit höheren als der hier gewählten Substratkonzentration von 1,25 μM 2-HO-E2 inkubiert wurde, wurde für die nachfolgenden Versuche eine Inhibitor-Konzentration von 20 μM gewählt.

4.2 HPRT-Test

E2 wird in extrahepatischem Gewebe, wie der Brust, durch hCYP1A1 und hCYP1B1 zu 2- und 4-HO-E2 oxidiert. Bei unzureichender Konjugation dieser Catecholestrogene kann eine weitere Oxidation zu den entsprechenden Estrogenchinonen erfolgen. Letztere können aufgrund ihrer Elektrophilie mit der DNA reagieren und dabei in einigen Fällen Strangbrüche induzieren (Kap. 1.1). So induzieren beide Catecholestrogene DNA-Einzelstrangbrüche *in vitro*, in MCF7-Zellen (Rajapakse et al., 2005), und 4-HO-E2 *in vivo*, in der Niere syrischer Hamster (Kap. 1.1). Wenn DNA-Läsionen, zu denen unter anderem auch Einzelstrangbrüche zählen, nicht rechtzeitig repariert werden und die Zellen dem Schaden überleben, kann es zur Entstehung von Mutationen kommen (Moraes et al., 2012). So wurden in SHE-Zellen nach Behandlung mit 2- und 4-HO-E2 Chromosomenaberrationen sowie Genmutationen im *Na⁺/K⁺ ATPase*-Lokus beobachtet. Im *hprt*-Lokus dagegen wies keines der beiden Catechole mutagenes Potential auf (Tsutsui et al., 2000b).

In extrahepatischem Gewebe stellt die O-Methylierung durch die COMT den dominierenden Entgiftungsweg für Catechole dar (Kap. 1.1). Eine niedrige COMT-Aktivität könnte somit die Entstehung elektrophiler Estrogenchinone und dadurch eventuell auch die Induktion von Mutationen begünstigen.

Um zu überprüfen, ob 2- und 4-HO-E2 nach Hemmung der COMT-Aktivität tatsächlich mutagen wirken, standen einige Genmutationstests zur Auswahl, jedoch sind nur vier

Zelllinien (V79-Zellen, Ovarienzellen chinesischer Hamster, humane lymphoblastoide TK6-Zellen und Mauslymphomzellen L5178Y) und drei genetische Loci (*hprt*, *tk* und die Na⁺/K⁺-ATPase der Zellmembran) gut validiert und weit verbreitet (Clemens, 1995). Da im Arbeitskreis Lehmann der HPRT-Test in V79-Zellen bereits etabliert wurde und seit Jahren erfolgreich durchgeführt wird (Schumacher et al., 2005; Brugger et al., 2006) wurde dieses Testsystem zur Untersuchung des genmutagenen Potentials beider Catecholestrogene nach Hemmung der COMT eingesetzt.

Da das mutagene Potential der Testsubstanzen davon abhängt, wie gut diese der Zelle zugänglich sind, wurde ergänzend zu den HPRT-Tests mit 2- und 4-HO-E2, bei denen eine exogene Zufuhr dieser Substanzen erfolgte, ein HPRT-Test mit der Muttersubstanz E2 durchgeführt, bei dem sie in Anwesenheit der entsprechenden CYPs endogen gebildet wurden. Durch hCYP1A1 wird hauptsächlich 2-HO-E2 (zusammengefasst von Badawi et al., 2001) und durch hCYP1B1 hauptsächlich 4-HO-E2 (Hayes et al., 1996) gebildet. Da V79-Zellen keine endogene CYP-Expression aufweisen (Doehmer, 1993), wurden zur Durchführung dieses HPRT-Tests V79 hCYP1A1-Zellen eingesetzt. Auf die Durchführung eines HPRT-Tests mit V79 hCYP1B1-Zellen wurde verzichtet, da sich Letztere bei den Vorversuchen aufgrund einer zu hohen SMF hierfür als ungeeignet erwiesen (Kap. 4.1.3).

4.2.1 HPRT-Test mit 2-HO-E2

Um zu untersuchen, ob 2-HO-E2 nach Hemmung der COMT-Aktivität mutagen wirkt, wurden je 1,5 Millionen V79-Zellen ausgestreut (Tag -1), nach einer 24-stündigen Anwachsphase das Kulturmedium gewechselt (Tag 0) und die Zellen einer 24-stündigen Inkubation mit 0,08 μM - 5 μM 2-HO-E2 unterzogen (Kap. 3.2.8). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO in einer Endkonzentration von 0,05% (v/v) mitgeführt (Kontrollpopulation). Als Positivkontrolle diente 1 μM NQO. Parallel dazu wurden V79-Zellen 30 min lang mit 20 μM OR-486 vorinkubiert und anschließend einer 23,5-stündigen Co-Inkubation mit 0,05% DMSO sowie 0,08 - 5 μM 2-HO-E2 unterzogen.

Unmittelbar nach Substanzbehandlung (Tag 1) wurden Zellen zur Bestimmung der PE1 entnommen und zusätzlich je 1 Million Zellen in frisches Medium weitergesetzt. An Tag 3 wurde wie an Tag 1 verfahren.

Die Zellzahl als Maß für Proliferation und Zytotoxizität wurde unmittelbar nach Substanzbehandlung (Tag 1), an Tag 4 und 6 elektronisch mittels CASY bestimmt.

An Tag 6 erfolgte die Selektion von Zellen mit Mutationen im *hprt*-Lokus durch Ausstreuen in 6-TG-Medium. Parallel hierzu erfolgte die Bestimmung der PE2 (Kap. 3.2.8). Nach 7 Tagen wurden die gebildeten Kolonien mit Ethanol fixiert, angefärbt und ausgezählt (Kap. 3.2.6).

4.2.1.1 Akute Zytotoxizität

Da Zellproliferation eine unabdingbare Voraussetzung zur Überführung von genetischen Schäden in Mutationen ist, wurden im Rahmen des HPRT-Tests, unmittelbar nach Substanzbehandlung, die Zellzahl und die PE1 als Maß für die Zytotoxizität bestimmt.

Zur Sicherstellung einer ausreichenden Zellproliferation zur Überführung von Genschäden in Mutationen sollten im HPRT-Test bei der höchsten eingesetzten Konzentration 10 - 20%, jedoch nicht unter 10% der Zellen relativ zur Kontrollpopulation überleben (OECD, 1997). Erwartungsgemäß (Brugger et al., 2006) wurde nach 24-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit der Positivkontrolle NQO keine signifikante Abnahme der Zellzahl und der PE1 im Vergleich zur Kontrollpopulation (Zellzahl: $2,1 \times 10^7 \pm 2,5 \times 10^6$; PE1: $0,82 \pm 0,02$) beobachtet (Abb. 22, oben). Die Behandlung der Zellen mit 0,08 μM - 5 μM 2-HO-E2 bewirkte hingegen ab einer Konzentration von 2,5 μM eine konzentrationsabhängige, signifikante Reduktion der Zellzahl und der PE1. Bei 5 μM 2-HO-E2 wirkte 2-HO-E2 so stark zytotoxisch, dass die PE1 nur noch $0,05 \pm 0,01$ betrug (entspricht $6,4\% \pm 1,9\%$ relativ zur Kontrollpopulation). Da sie allerdings nur geringfügig unter der OECD-Empfehlung lag und die Zellzahl noch ausreichte, um die statistisch benötigte 1 Million Zellen während des Tests weiterzusetzen, wurde diese Konzentration weiterhin im HPRT-Test untersucht.

Einfluss der Hemmung der COMT auf die akute Zytotoxizität von 2-HO-E2

Nach Co-Inkubation der Zellen mit 20 μM OR-486 und 0,08 - 5 μM 2-HO-E2 war ab 2,5 μM 2-HO-E2 ein signifikanter Rückgang der Zellzahl um ca. 50% und ab 5 μM 2-HO-E2 ein leichter, signifikanter Rückgang der PE1 von $0,76 \pm 0,03$ auf $0,64 \pm 0,08$, und somit um circa 16%, im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit OR-486 zu verzeichnen (Abb. 22, unten).

Bei allen getesteten 2-HO-E2-Konzentrationen und der Lösungsmittelkontrolle wurde kein statistisch signifikanter Unterschied der Zellzahl zwischen den Inkubationen mit und denjenigen ohne COMT-Hemmer beobachtet. Im Gegensatz hierzu war ein statistisch signifikanter Unterschied der PE1 zwischen den Inkubationen mit und denjenigen ohne COMT-Hemmer zu verzeichnen. Während die PE1 bei den Inkubationen mit jeweils 0 - 0,08 μM 2-HO-E2 und OR-486 durchschnittlich um $6\% \pm 1\%$ im Vergleich zu den entsprechenden Inkubationen ohne COMT-Hemmer abnahmen, stieg die PE1 bei der Inkubation mit jeweils 2,5 μM beziehungsweise 5 μM 2-HO-E2 und OR-486 um Faktor 3 beziehungsweise um Faktor 12 im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit 2-HO-E2 (Daten im Anhang, Tab. 33). Somit wies 2-HO-E2 unerwarteterweise eine viel schwächere Zytotoxizität auf V79-Zellen in Anwesenheit des COMT-Hemmers auf.

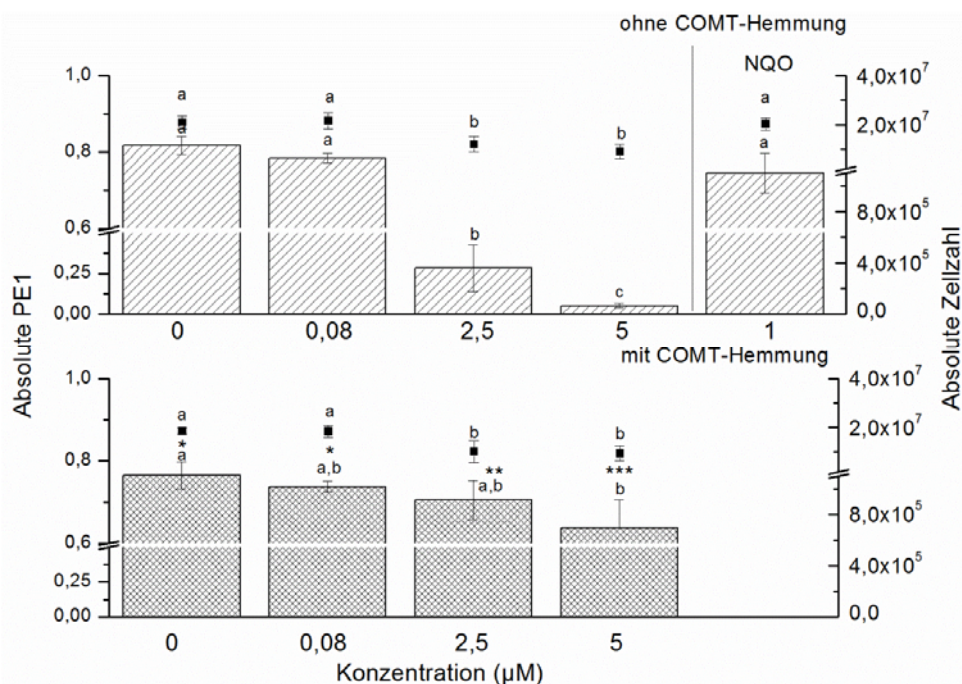


Abb. 22: Absolute PE1 von V79-Zellen (Balken, linke y-Achse) und absolute Zellzahl (schwarze Symbole, rechte y-Achse) nach 24-stündiger Behandlung mit NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 μM , Lösungsmittelkontrolle) und 2-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 (oben) sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 μM OR-486 und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 2-HO-E2 (unten). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei (0,08 μM), vier (2,5 und 5 μM) und fünf

(Lösungsmittelkontrolle und NQO) unabhängigen Bestimmungen. Unterschiedliche Buchstaben (a-c) zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA, Scheffé Test, Signifikanzniveau 0,05). Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit und ohne OR-486 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$) ermittelt. Daten im Anhang, Tab. 33 und Tab. 34).

4.2.1.2 Zellproliferation bis zum Zeitpunkt der Selektion

Um die Funktionalität des Testsystems hinsichtlich Zellproliferation und damit die Überführung von genetischen Schäden in Mutationen zu überprüfen, wurde die Zellzahl unmittelbar nach Substanzbehandlung (Tag 1), an Tag 4 und an Tag 6 elektronisch bestimmt. Durch Auftragung der Zellzahlen gegen die Zeit wurden die entsprechenden Wachstumskurven erhalten. Anhand ihrer Steigung kann eine Wachstumshemmung erkannt werden: Ist die Steigung der Kurven gleich, so kann von gleichem Wachstum ausgegangen werden.

Während der Zellinkubation (Tag 0 bis Tag 1) wurde ein konzentrationsabhängiger Rückgang der Zellzahl beobachtet, der bei den Inkubationen ohne COMT-Hemmer stärker ausgeprägt war (Abb. 23). Von Tag 1 bis 4 blieben die mit 2,5 μM und 5 μM 2-HO-E2 behandelten Zellen in ihrem Wachstum hinter der Kontrollpopulation zurück, was anhand der unterschiedlichen Kurvensteigung erkennbar war. Im Vergleich hierzu verliefen die Wachstumskurven der Inkubationen mit COMT-Hemmer parallel zu derjenigen der Lösungsmittelkontrolle. Dies bestätigt die in Kap. 4.2.1.1 beobachtete Reduktion der Zytotoxizität von 2-HO-E2 in Anwesenheit des Hemmers. Von Tag 4 bis zum Zeitpunkt der Selektion (Tag 6) verliefen alle Wachstumskurven wieder annähernd parallel, was auf eine Normalisierung der Zellproliferation hindeutet. Somit war die Überführung potentieller genetischer Schäden in Mutationen sichergestellt.

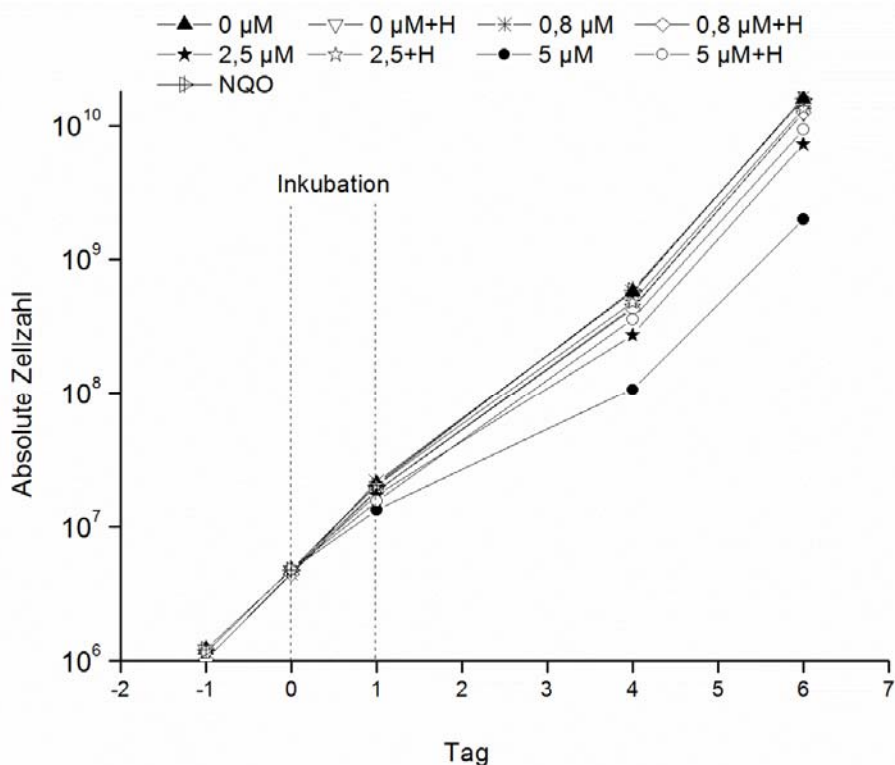


Abb. 23: Proliferation von V79-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit je 0,05% DMSO (0 μM , Lösungsmittelkontrolle) und 2-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 und anschließender substanzfreier 5-tägiger Nachinkubation sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 μM OR-486 (+H), 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 2-HO-E2 und anschließender substanzfreier 5-tägiger Nachinkubation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei (0,08 μM), vier (2,5 und 5 μM) und fünf (Lösungsmittelkontrolle und NQO) unabhängigen Bestimmungen. Zur besseren Lesbarkeit sind die Fehlerbalken nicht dargestellt. Tag -1: Ausstreuen, Tag 0-1: Substanzbehandlung, Tag 4: Zellpassage, Tag 6: Selektion. Daten im Anhang, Tab. 37.

4.2.1.3 Mutantenfrequenz und Plating Efficiency 2

Durch die Mutantenfrequenz (MF) wird das mutagene Potential einer Substanz im HPRT-Test anhand der Anzahl an 6-TG-resistenten Kolonien pro Million koloniebildender Zellen bestimmt. Mit Hilfe der PE2, welche in die MF direkt eingerechnet wird, wird die Koloniebildungsfähigkeit nach 5 Tagen substanzfreier Nachinkubation, also zum Zeitpunkt der Selektion, beschrieben.

Im gesamten getesteten 2-HO-E2-Konzentrationsbereich war die PE2, sowohl mit als auch ohne COMT-Hemmung, vergleichbar zu derjenigen der Lösungsmittelkontrolle ($0,72 \pm 0,06$, Abb. 24). Da alle PE2 über dem angestrebten Mindestwert von 0,7 (Li et al., 1987) lagen, war optimales Zellwachstum sichergestellt. Anhand der PE2 war zudem ersichtlich, dass sich die Zellen von den Behandlungen mit 2,5 und 5 μM 2-HO-E2, welche zu einer starken

Abnahme der PE1 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle geführt hatten (Kap.4.2.1.1), völlig erhalten.

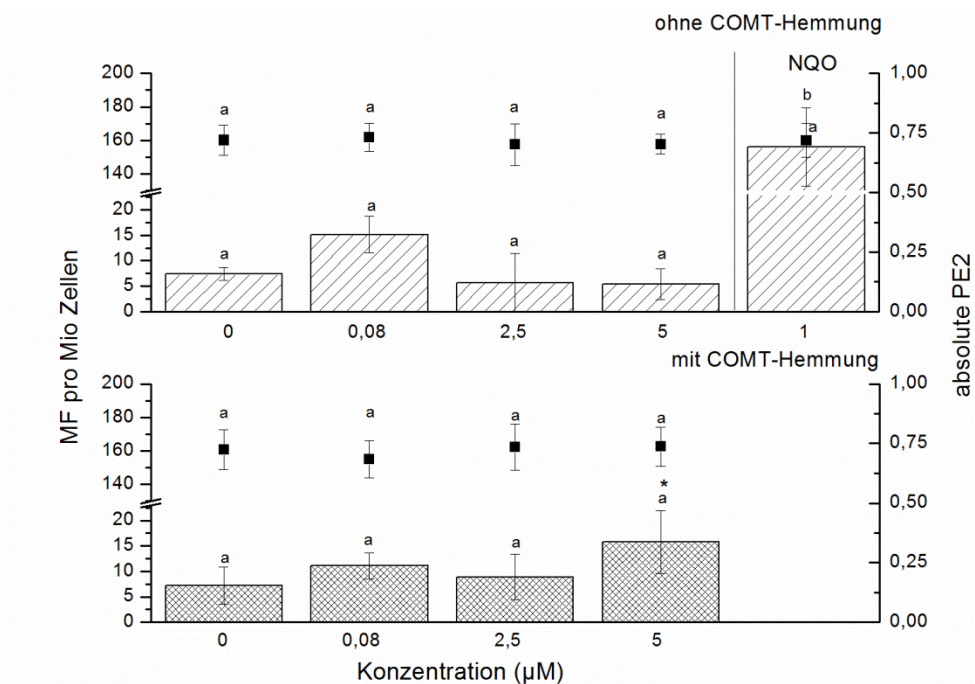


Abb. 24: MF im *hprt*-Lokus von V79-Zellen (Balken, linke y-Achse) und absolute PE2 (schwarze Symbole, rechte y-Achse) nach 24-stündiger Behandlung mit NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle) und 2-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 und anschließender substanzfreier 5-tägiger Nachinkubation (oben) sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 µM OR-486, anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 2-HO-E2 und anschließender substanzfreier 5-tägiger Nachinkubation (unten). Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung von drei (0,08 µM), vier (2,5 und 5 µM) und fünf (Lösungsmittelkontrolle und NQO) unabhängigen Bestimmungen. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA, Scheffé Test, Signifikanzniveau 0,05). Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit und ohne OR-486 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests ermittelt (*: $p < 0,05$). Daten im Anhang, Tab. 36.

Die MF der mit DMSO behandelten Zellen (Kontrollpopulation) lag konstant niedrig bei 7 ± 1 (Abb. 24, gestrichelte Balken). Wie erwartet, induzierte die Behandlung der Zellen mit der Positivkontrolle NQO ein signifikanter Anstieg der MF auf 156 ± 23 , und somit um Faktor 22, im Vergleich zur Kontrollpopulation. Im Gegensatz hierzu wurde kein statistisch signifikanter Anstieg der MF nach Inkubation der Zellen mit 0,08 µM - 5 µM 2-HO-E2 beobachtet. Laut Bradley et. al (1981) ist eine Substanz als mutagen in V79-Zellen einzustufen, wenn sie eine Erhöhung der MF um mindestens Faktor 3 im Vergleich zur Kontrollpopulation induziert. Somit wirkt 2-HO-E2 im Konzentrationsbereich 0,08 µM - 5 µM nicht mutagen auf V79-Zellen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Tsutsuis Untersuchungen (2000b), bei

denen 2-HO-E2 im Konzentrationsbereich 1-10 μM keine Mutationen im *hprt*-Lokus von SHE-Zellen induzierte.

Einfluss der Hemmung der COMT auf die MF

Die MF der Zellen, die einer 30-minütigen Inkubation mit 20 μM OR-486 und anschließend einer 23,5-stündigen Co-Inkubation mit 0,05% DMSO unterzogen wurden (7 ± 4 , Abb. 24, karierte Balken), unterschied sich nicht statistisch signifikant von derjenigen der Lösungsmittelkontrolle (7 ± 2), womit eine Induktion von Mutationen durch OR-486 ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren induzierte die Coinkubation der Zellen mit 0,08 μM - 5 μM 2-HO-E2 und OR-486 keine Erhöhung der MF im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit OR-486.

Im Konzentrationsbereich 0 - 2,5 μM 2-HO-E2 wurde kein statistisch signifikanter Unterschied der MF zwischen den Inkubationen mit und denjenigen ohne COMT-Hemmer beobachtet. Die Behandlung mit 5 μM 2-HO-E2 und COMT-Inhibitor induzierte zwar eine statistisch signifikante Verdopplung der MF (auf 16 ± 6) im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit 2-HO-E2 und zur Lösungsmittelkontrolle, blieb jedoch hinter der für einen sicher mutagenen Effekt anerkannten MF-Verdreifachung im Vergleich zur Kontrollpopulation (Bradley et al., 1981) zurück und befand sich zudem innerhalb der historischen Kontrollen im Arbeitskreis Lehmann im Zeitraum 2005-2011 (SMF der Lösungsmittelkontrolle: 2 bis 14 Mutanten pro Million koloniebildender Zellen).

4.2.2 HPRT-Test mit 4-HO-E2

Um zu untersuchen, ob 4-HO-E2 nach Hemmung der COMT-Aktivität mutagen wirkt, wurden je 1,5 Millionen V79-Zellen ausgestreut (Tag -1), nach einer 24-stündigen Anwachsphase das Kulturmedium gewechselt (Tag 0) und die Zellen einer 24-stündigen Inkubation mit 5 - 40 μM 4-HO-E2 (Kap. 3.2.8) unterzogen. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO in einer Endkonzentration von 0,05% (v/v, Kontrollpopulation) und als Positivkontrolle 1 μM NQO mitgeführt. Parallel dazu wurden V79-Zellen 30 min lang mit 20 μM OR-486 vorinkubiert und anschließend einer 23,5-stündigen Co-Inkubation mit 0,05% DMSO sowie 5 μM - 40 μM 4-HO-E2 unterzogen.

Unmittelbar nach Substanzbehandlung (Tag 1) wurden Zellen zur Bestimmung der PE1 entnommen und zusätzlich je 1 Million Zellen in frisches Medium weitergesetzt. An Tag 3 wurde wie an Tag 1 verfahren.

Die Zellzahl als Maß für Proliferation und Zytotoxizität wurde unmittelbar nach Substanzbehandlung (Tag 1), an Tag 4 und 6 elektronisch mittels CASY bestimmt.

An Tag 6 erfolgte die Selektion von Zellen mit Mutationen im *hprt*-Lokus durch Ausstreuen in 6-TG-Medium. Parallel hierzu erfolgte die Bestimmung der PE2 (Kap. 3.2.8). Nach 7 Tagen wurden die gebildeten Kolonien mit Ethanol fixiert, angefärbt und ausgezählt (Kap. 3.2.6).

4.2.2.1 Akute Zytotoxizität

Im Rahmen des HPRT-Tests wurden unmittelbar nach Substanzbehandlung die Zellzahl und die PE1 als Maß für die Zytotoxizität bestimmt.

Nach Inkubation der Zellen mit 1 μM NQO beziehungsweise mit 5-40 μM 4-HO-E2 unterschied sich die Zellzahl bis zu einer Konzentration von 20 μM und die PE1 bis zu einer Konzentration von 10 μM nicht statistisch signifikant von der Kontrollpopulation ($0,83 \pm 0,01$, Abb. 25, gestrichelte Balken). Nach Behandlung mit 20 μM 4-HO-E2 reduzierte sich die Zellzahl statistisch signifikant auf circa 65% der Kontrollpopulation (Daten im Anhang,

Tab. 40) sowie die PE1 auf $0,66 \pm 0,01$ (entspricht $79\% \pm 2\%$ relativ zur Lösungsmittelkontrolle, Daten im Anhang, Tab. 39). Nach Behandlung mit 40 μM war eine statistisch signifikante Reduktion die Zellzahl auf circa 18% der Kontrollpopulation und der PE1 auf $0,38 \pm 0,12$ ($46\% \pm 14\%$ relativ zur Lösungsmittelkontrolle) zu verzeichnen. Somit lag die PE1 bei 40 μM 4-HO-E2 etwas über der OECD-Empfehlung für die höchste eingesetzte Konzentration im HPRT-Test, bei der 10 - 20% der Zellen relativ zur

Kontrollpopulation überleben sollten. Folglich wäre auch der Einsatz von höheren Konzentrationen möglich gewesen, was hier jedoch nicht getestet wurde.

Einfluss der Hemmung der COMT auf die akute Zytotoxizität von 4-HO-E2

Die Hemmung der COMT-Aktivität bewirkte ab einer Konzentration von 20 μM 4-HO-E2 einen konzentrationsabhängigen, statistisch signifikanten Rückgang der Zellzahl (um etwa 44% bei 20 μM beziehungsweise um etwa 82% bei 40 μM) und der PE1 (auf $0,65 \pm 0,08$ und somit um circa 23% bei 20 μM , beziehungsweise auf $0,41 \pm 0,06$ und somit um circa 51% bei 40 μM) im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit OR-486 ($0,78 \pm 0,04$, Abb. 25, karierte Balken).

Beim direkten Vergleich zwischen den Inkubationen mit und denjenigen ohne COMT-Hemmer war - mit Ausnahme von der Lösungsmittelkontrolle und 10 μM 4-HO-E2, bei denen eine leichte Reduktion der PE1 nach Hemmung der COMT um 7% absolut beobachtet wurde - bei allen getesteten 4-HO-E2-Konzentrationen kein statistisch signifikanter Unterschied der PE1 und der Zellzahl zu verzeichnen. Somit wies der COMT-Hemmer keinen Einfluss auf die Zytotoxizität von 4-HO-E2 auf V79-Zellen auf.

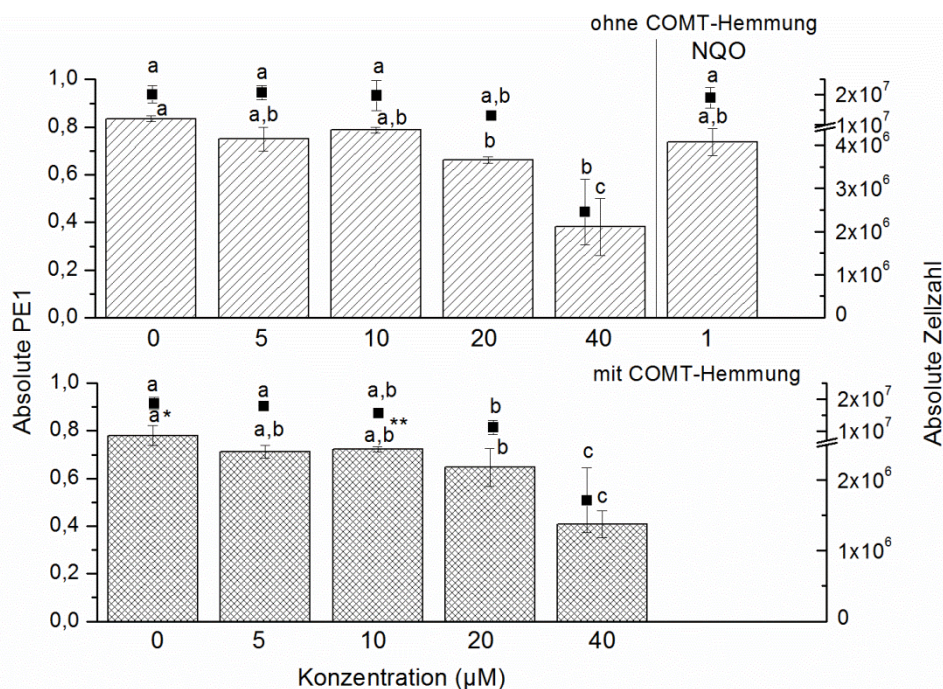


Abb. 25: Absolute PE1 von V79-Zellen (Balken, linke y-Achse) und absolute Zellzahl (schwarze Symbole, rechte y-Achse) nach 24-stündiger Behandlung mit NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 μM , Lösungsmittelkontrolle) und 4-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 (oben) sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 μM OR-486 und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 4-HO-E2 (unten). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei (5, 10, 20 und 40 μM 4-HO-E2) und sechs (Lösungsmittelkontrolle und NQO) unabhängigen Bestimmungen. Unterschiedliche

Buchstaben (a-c) zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA, Scheffé Test, Signifikanzniveau 0,05). Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit und ohne OR-486 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests (**: $p < 0,01$) ermittelt. Daten im Anhang, Tab. 38 und

Tab. 40).

4.2.2.2 Zellproliferation bis zum Zeitpunkt der Selektion

Um die Funktionalität des Testsystems hinsichtlich Zellproliferation und damit die Überführung von genetischen Schäden in Mutationen zu überprüfen, wurde die Zellzahl unmittelbar nach Substanzbehandlung (Tag 1), an Tag 4 und an Tag 6 elektronisch bestimmt.

Während der Zellinkubation (Tag 0 bis Tag 1) wurde ein konzentrationsabhängiger Rückgang der Zellzahl beobachtet, der bei den Inkubationen ohne COMT-Hemmer stärker ausgeprägt war (Abb. 26). Hierbei blieben die mit 40 μM 4-HO-E2 behandelten Zellen (sowohl mit als auch ohne COMT-Hemmer) in ihrem Wachstum deutlich hinter der Kontrollpopulation zurück. Von Tag 1 bis 4 verliefen alle Wachstumskurven wieder parallel, was auf die Normalisierung des Zellwachstums hindeutet. Einzige Ausnahme bildeten die in Abwesenheit des COMT-Hemmers mit 40 μM 4-HO-E2 inkubierten Zellen. Die Steigung ihrer Wachstumskurve war etwas flacher als diejenige der Lösungsmittelkontrolle, was bedeutet, dass sie bis Tag 4 noch langsamer proliferierten. Von Tag 4 bis zum Zeitpunkt der Selektion (Tag 6) verliefen jedoch alle Wachstumskurven wieder parallel. Folglich war bei allen im HPRT-Test eingesetzten 4-HO-E2-Konzentrationen normale Zellproliferation gegeben und folglich auch die Überführung potentieller genetischer Schäden in Mutationen gewährleistet.

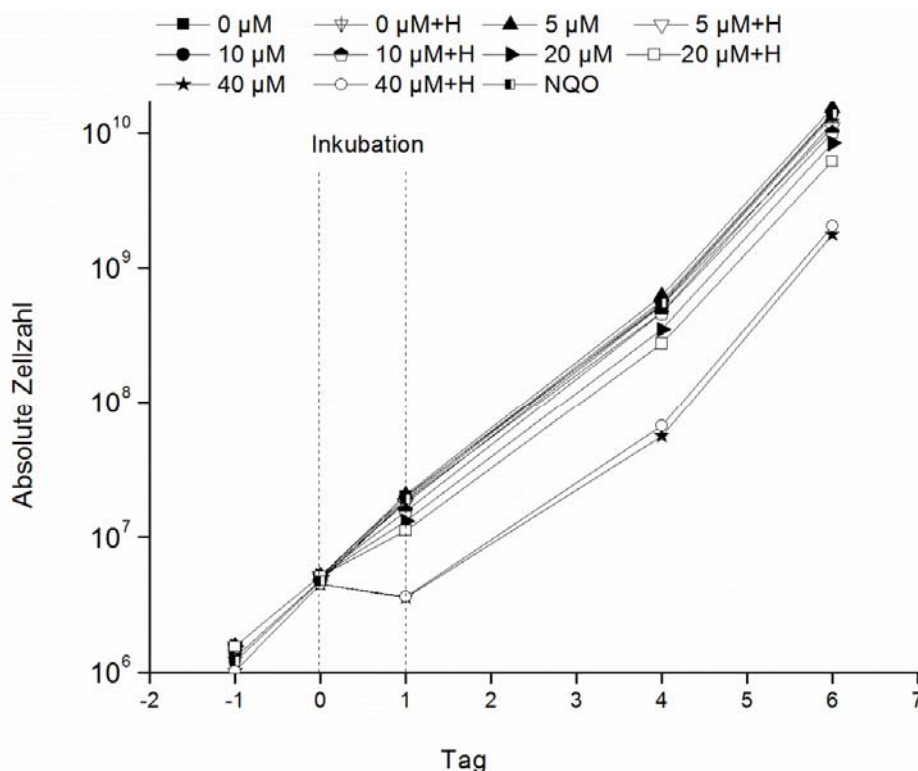


Abb. 26: Proliferation von V79-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle) und 4-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 und anschließender substanzfreier 5-tägiger Nachinkubation sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 µM OR-486 (+H), 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 4-HO-E2 und anschließender substanzfreier 5-tägiger Nachinkubation. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei (5, 10, 20 und 40 µM 4-HO-E2) und sechs (Lösungsmittelkontrolle und NQO) unabhängigen Bestimmungen. Zur besseren Lesbarkeit sind die Fehlerbalken nicht dargestellt. Tag -1: Ausstreuen, Tag 0-1: Substanzbehandlung, Tag 4: Zellpassage, Tag 6: Selektion. Daten im Anhang,

Tab. 40).

4.2.2.3 Mutantenfrequenz und Plating efficiency 2

Im gesamten getesteten 4-HO-E2-Konzentrationsbereich war die PE2, sowohl mit als auch ohne COMT-Hemmung, vergleichbar zu derjenigen der Lösungsmittelkontrolle ($0,74 \pm 0,07$, Abb. 27). Da alle PE2 über dem angestrebten Mindestwert von 0,7 (Li et al., 1987) lagen, war optimales Zellwachstum sichergestellt. Anhand der PE2 war zudem ersichtlich, dass sich die Zellen von den Behandlungen mit 20 und 40 µM 4-HO-E2, welche zu einer Abnahme der PE1 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle geführt hatten (Kap. 4.2.1.1), gänzlich erholten.

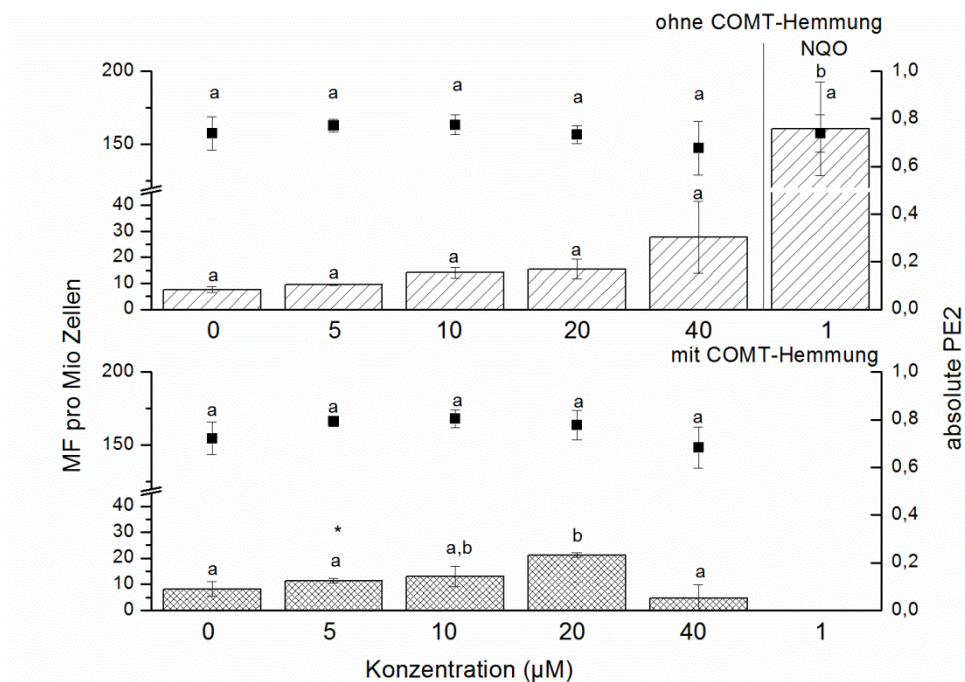


Abb. 27: MF im *hprt*-Lokus von V79-Zellen (Balken, linke y-Achse) und absolute PE2 (schwarze Symbole, rechte y-Achse) nach 24-stündiger Behandlung mit NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle) und 4-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 und anschließende substanzfreie 5-tägige Nachinkubation (oben) sowie nach 30-minütiger

Inkubation mit 20 μM OR-486, anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 4-HO-E2 und anschließende substanzfreie 5-tägige Nachinkubation (unten). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei (5, 10, 20 und 40 μM 4-HO-E2) und sechs (Lösungsmittelkontrolle und NQO) unabhängigen Bestimmungen. Unterschiedliche Buchstaben (a-c) zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA, Scheffé Test, Signifikanzniveau 0,05). Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit und ohne OR-486 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests ermittelt (*: $p < 0,05$). Daten im Anhang, Tab. 41 und Tab. 42.

Die MF der mit DMSO behandelten Zellen (Kontrollpopulation) lag konstant niedrig bei 8 ± 1 (Abb. 27, gestrichelte Balken). Wie erwartet, induzierte die Behandlung der Zellen mit der Positivkontrolle NQO ein signifikanter Anstieg der MF auf 160 ± 32 , und somit um Faktor 20, im Vergleich zur Kontrollpopulation. Im Gegensatz hierzu war im gesamten getesteten 4-HO-E2-Konzentrationsbereich kein statistisch signifikanter Anstieg der MF zu verzeichnen. Somit wirkt 4-HO-E2 bis zu einer Konzentration von 40 μM nicht mutagen auf V79-Zellen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Tsutsuis Untersuchungen (2000b), bei denen 4-HO-E2 im Konzentrationsbereich 1-10 μM keine Mutationen im *hprt*-Lokus von SHE-Zellen induzierte.

Einfluss der Hemmung der COMT-Aktivität auf die MF

Die MF der Zellen, die einer 30-minütigen Inkubation mit 20 μM OR-486 und anschließend einer 23,5-stündigen Co-Inkubation mit 0,05% DMSO unterzogen wurden (8 ± 3 , Abb. 27, karierte Balken), unterschied sich nicht statistisch signifikant von derjenigen der Lösungsmittelkontrolle (8 ± 1). Folglich ist eine Induktion von Genmutationen durch OR-486 auszuschließen.

Im Konzentrationsbereich 0 - 40 μM 4-HO-E2 wurde kein statistisch signifikanter Unterschied der MF zwischen den Inkubationen mit und denjenigen ohne COMT-Hemmer beobachtet. Einzige Ausnahme stellte die Inkubation mit 5 μM 4-HO-E2 dar, bei der sich die MF nach COMT-Inhibierung (11 ± 1) lediglich um 10% im Vergleich zur Inkubation ohne Inhibitor (beziehungsweise um Faktor 1,4 im Vergleich zur Kontrollpopulation) erhöhte. Somit blieb sie hinter der für einen sicher mutagenen Effekt anerkannten MF-Verdreifachung im Vergleich zur Kontrollpopulation zurück (Bradley et al., 1981) und befand sich zudem innerhalb der historischen Kontrollen (SMF der Lösungsmittelkontrolle: 2 bis 14 Mutanten pro Million koloniebildender Zellen).

Die Hemmung der COMT-Aktivität führte im Konzentrationsbereich 5 - 40 μM 4-HO-E2 zu einem konzentrationsabhängigen, und lediglich bei 20 μM 4-HO-E2 auch statistisch signifikanten, Anstieg der MF im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit OR-486 (8 ± 3 , Abb.

27). Bei 20 μM 4-HO-E2 erreichte die MF ihr Maximum (21 ± 1), welches nahezu das Dreifache der MF der Kontrollpopulation darstellte. Somit bewirkt die Hemmung der COMT-Aktivität eine schwache Induktion von Genmutationen im *hprt*-Lokus von V79-Zellen nach Behandlung mit 20 μM 4-HO-E2.

Ab 40 μM 4-HO-E2 nahm die MF bei gleichbleibender PE2 wieder ab. Da nach 24-stündiger Behandlung mit dieser Konzentration $46\% \pm 7\%$ der Zellen im Vergleich zur Kontrollpopulation überlebten (Daten im Anhang, Tab. 39), liegt die Vermutung nahe, dass der Großteil der abgestorbenen Zellen durch 4-HO-E2 induzierte DNA-Schäden trugen, die sich nicht mehr als Mutation manifestieren konnten und daher im HPRT-Test nicht detektierbar waren. Begründet wird diese Vermutung durch Studien an E2-behandelten MCF7-Zellen, in denen die COMT-Inhibierung zu einer Erhöhung des 8-Oxo-dG-Spiegels führte (Lavigne et al., 2001). Letzterer dient als sensibler Biomarker für oxidative DNA-Schädigung *in vivo* und *in vitro* (zusammengefasst von Haghdoost et al., 2005).

4.2.3 HPRT-Test mit E2

Epidemiologische Studien und biologische Studien an Nagetieren belegen die schwach kanzerogene Wirkung von E2 (zusammengefasst von Liehr, 2000). Allerdings ist der Mechanismus der E2-induzierte Kanzerogenese noch nicht vollständig geklärt. Im Ames-Test wirkte E2 nicht mutagen (Lang und Redmann, 1979) und in V79-Zellen induzierte die 2-tägige Behandlung mit E2-Konzentrationen zwischen 25 und 100 μM keine Genmutationen im *hprt*-Lokus (Drevon et al., 1981). Im Gegensatz hierzu wurde eine sehr schwache Induktion von Genmutationen nach 4-tägiger Behandlung von V79-Zellen mit 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-10} und 10^{-11} M E2, aber nicht mit 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-12} und 10^{-13} M E2 beobachtet (Kong et al., 2000).

Da die Menschen dieser endogenen Substanz auf Lebenszeit ausgesetzt sind, wurde zur Simulation realitätsnaher Bedingungen und zur Verstärkung des schwach mutagenen Effektes die Expositionsdauer, welche beim konventionellen HPRT-Test 1 Tag beträgt, auf 3 Wochen verlängert.

Auf die Bestimmung der PE1 wurde verzichtet, da sich die Expositionsphase über die gesamte Versuchsdauer streckte. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO in einer Endkonzentration von 0,05% (v/v, Kontrollpopulation) eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde das Promutagen BaP in einer Endkonzentration von 0,25 μM mitgeführt, welches durch hCYP1A1 metabolisch aktiviert wird und dadurch als Kontrolle der stabilen Transfektion der V79-Zellen mit den oben genannten CYP-Isoenzym dient (Kap. 3.2.9).

Jeweils 1,5 Millionen V79 hCYP1A1-Zellen wurden ausgestreut (Tag 0, Abb. 28) und nach 24-stündiger Anwachsphase jeweils mit 0,25 μM BaP, 1 μM E2 und 0,05% DMSO inkubiert

(Tag 1). Um den Einfluss der COMT-Hemmung auf das mutagene Potential von E2 zu erfassen, wurden parallel dazu V79 hCYP1A1-Zellen erst 30 min lang mit 20 μM OR-486 vorinkubiert und anschließend einer 23,5-stündigen Co-Inkubation mit 0,05% DMSO sowie mit 1 μM E2 unterzogen (Kap. 3.2.9).

Nach 24 h erfolgte die erste Zellpassage (Tag 2, Abb. 28). Das Inkubationsmedium wurde zur Bestimmung des Metabolitenprofils gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Je Behandlungsgruppe wurden 1 Million Zellen weitergesetzt, 1 Million Zellen zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung und 80000 Zellen zur Bestimmung von MK entnommen. Die BaP-behandelten Zellen wurden substanzfrei in Kulturmedium weiterkultiviert.

An den Tagen 5 und 7 wurden die Zellen wie an Tag 2 passagiert. Bei jeder Zellpassage wurde die Zellzahl (als Maß für die Proliferation) elektronisch bestimmt. Diese Prozedur wurde jede Woche wiederholt.

An den Tagen 6 und 14 wurden zusätzlich aus der Kontrollpopulation 1,5 Millionen Zellen ausgestreut und nach einer 24-stündigen Anwachsphase mit 0,25 μM BaP für weitere 24 h behandelt. Die mit BaP-behandelten Zellen der vorangegangenen Woche wurden nach jeder Selektion verworfen.

An den Tagen 14 und 21 erfolgte die Selektion der Zellen mit Mutationen im *hprt*-Lokus durch Ausstreuen in 6-TG-Medium sowie die Bestimmung der PE2 (Kap. 3.2.8). Nach jeweils 7 Tagen wurden die gebildeten Kolonien mit Ethanol fixiert, angefärbt und ausgezählt (Kap. 3.2.6). An den Selektionstagen wurde das Inkubationsmedium zur Bestimmung des Metabolitenprofils gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

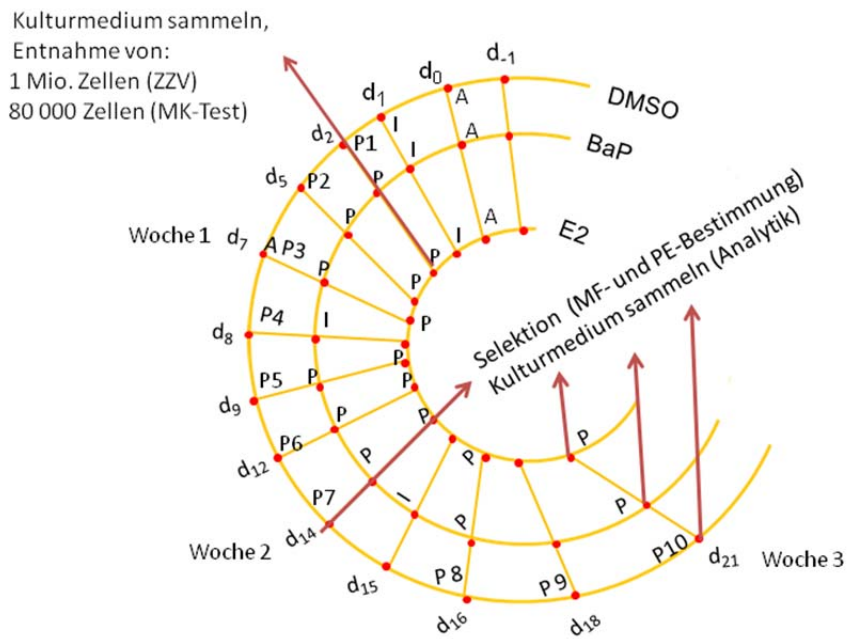


Abb. 28: Versuchsprotokoll vom modifizierten HPRT-Test mit E2 (Kap. 3.2.9). A: Ausstreuen, I: Inkubieren, P: Passagieren, ZZV: Zellzyklusverteilung, d: Tag.

4.2.3.1 Akute Zytotoxizität

Im Rahmen des HPRT-Tests wurde unmittelbar nach Substanzbehandlung die Zellzahl als Maß für die Zytotoxizität bestimmt.

Nach 24-stündiger Behandlung mit der Positivkontrolle BaP (0,25 μM) wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollpopulation beobachtet (Abb. 29). Auch nach Inkubation mit 0,1 – 1 μM E2, sowohl mit als auch ohne COMT-Hemmer, war kein statistisch signifikanter Unterschied der Zellzahl im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zu verzeichnen. Demnach wirkte E2 in den beim HPRT-Test eingesetzten Konzentrationen nicht zytotoxisch auf V79 1A1-Zellen.

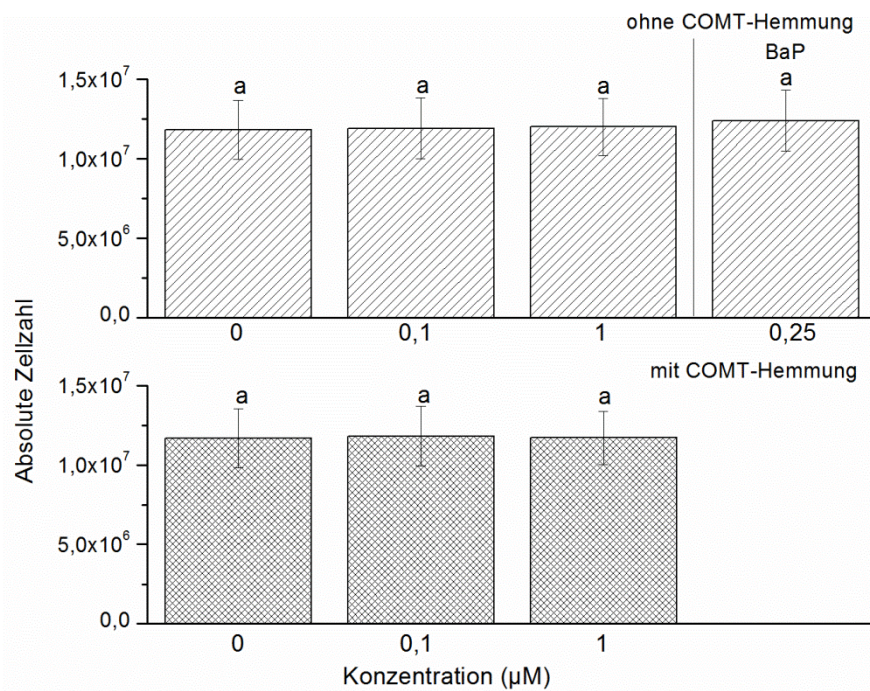


Abb. 29: Absolute Zellzahl von V79 hCYP1A1-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit BaP beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 μM , Lösungsmittelkontrolle) und E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 (oben) und mit 20 μM OR-486. Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei (Behandlung ohne OR-486) beziehungsweise fünf (Behandlung mit OR-486) unabhängigen Bestimmungen. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA, Scheffé Test, Signifikanzniveau 0,05 bei den Inkubationen ohne OR-486 beziehungsweise unabhängiger t-Test bei Inkubationen mit OR-486). Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit und ohne OR-486 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests ermittelt (das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde nicht erreicht). Daten im Anhang, Tab. 43.

4.2.3.2 Zellproliferation bis zum Zeitpunkt der Selektionen

Um die Funktionalität des Testsystems hinsichtlich Zellproliferation und damit die Überführung von genetischen Schäden in Mutationen zu überprüfen, wurde die Zellzahl bei jeder Zellpassage elektronisch bestimmt.

Nach 24-stündiger Inkubation (Tag 0 bis Tag 1) wurde bei den mit 0,1 μM und 1 μM E2-behandelten Zellen (sowohl mit als auch ohne COMT-Hemmer) kein verändertes Wachstumsverhalten im Vergleich zur Kontrollpopulation beobachtet (Abb. 30). Von Tag 1 bis Tag 10 zeigten die Inkubationen mit COMT-Hemmer unerwarteterweise eine verlangsamte Zellproliferation im Vergleich zu der Lösungsmittelkontrolle, was an der flacheren Steigung ihrer Wachstumskurven erkennbar war. Ab Tag 10 jedoch normalisierte sich ihr Wachstumsverhalten. Demnach war bis zum Zeitpunkt der Selektionen am Tag 14 (Selektion 1, S1) und am Tag 21 (S2) die Überführung potentieller genetischer Schäden in Mutationen sichergestellt.

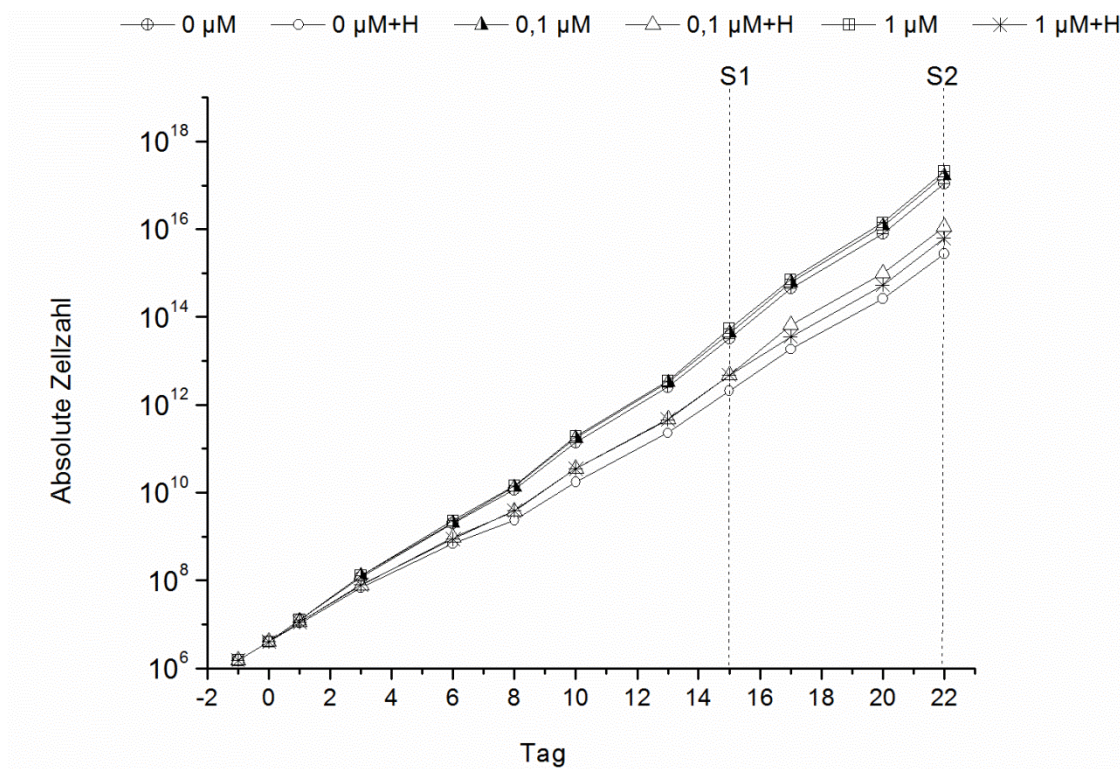


Abb. 30: Proliferation V79 hCYP1A1-Zellen nach durchgehender, zweiwöchiger Behandlung (Selektion 1, S1) und durchgehender, dreiwöchiger Behandlung (S2) mit je 0,05% DMSO (0 μM , Lösungsmittelkontrolle) und E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 und mit 20 μM OR-486. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei (Behandlung ohne OR-486) beziehungsweise fünf (Behandlung mit OR-486) unabhängigen Bestimmungen. Zur besseren Lesbarkeit sind die Fehlerbalken nicht dargestellt. Daten im Anhang, Tab. 43.

4.2.3.3 Mutantenfrequenz und Plating efficiency 2

Nach durchgehender, zweiwöchiger Behandlung (S1) und dreiwöchiger Behandlung (S2) der V79 hCYP1A1-Zellen mit 1 μM E2 war die PE2, sowohl mit als auch ohne COMT-Hemmung, vergleichbar zu derjenigen der Lösungsmittelkontrolle (S1: $0,69 \pm 0,09$; S2: $0,68 \pm 0,07$, Abb. 31). Da alle PE2 unter Berücksichtigung der jeweiligen Standardabweichung über dem angestrebten Mindestwert von 0,7 (Li et al., 1987) lagen, war optimales Zellwachstum über die gesamte Versuchsdauer sichergestellt.

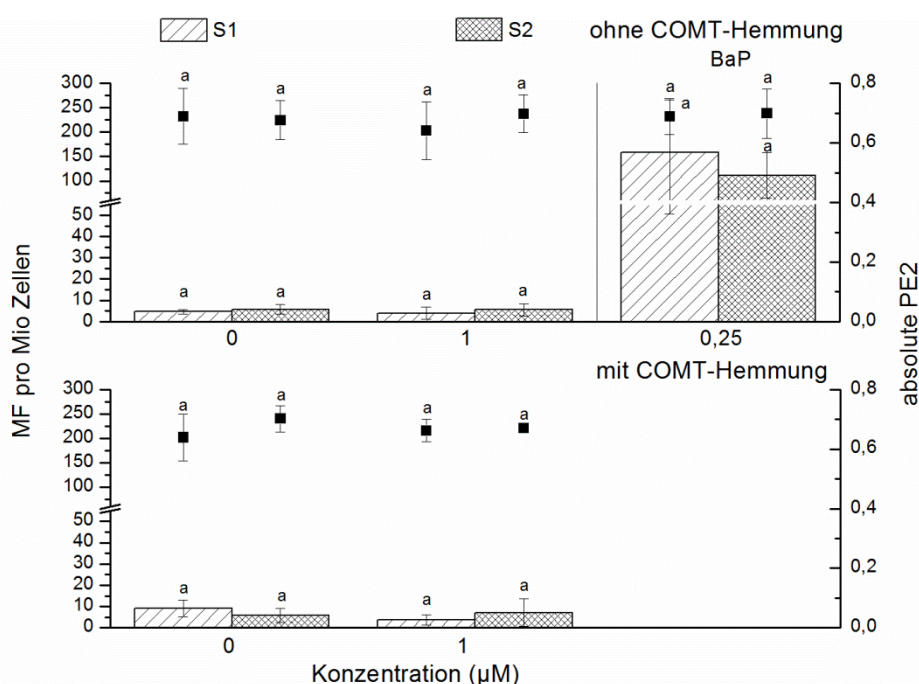


Abb. 31: MF im *hprt*-Lokus von V79 hCYP1A1-Zellen (Balken, linke y-Achse) und absolute PE2 (schwarze Symbole, rechte y-Achse) nach 24-stündiger Behandlung mit BaP beziehungsweise nach durchgehender, zweiwöchiger Behandlung (Selektion 1 (S1), gestrichelte Balken) und durchgehender, dreiwöchiger Behandlung (S2, karierte Balken) mit je 0,05% DMSO (0 μM , Lösungsmittelkontrolle) und E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 (oben) und mit 20 μM OR-486 (unten). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei (Behandlung ohne OR-486) beziehungsweise fünf (Behandlung mit OR-486) unabhängigen Bestimmungen. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA, Scheffé Test, Signifikanzniveau 0,05 bei den Inkubationen ohne OR-486 beziehungsweise unabhängiger t-Test bei Inkubationen mit OR-486). Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit und ohne OR-486 sowie zwischen S1 und S2 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests ermittelt (das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde nicht erreicht). Daten im Anhang, Tab. 44 und

Tab. 45.

Die MF der Kontrollpopulation lag konstant niedrig bei 5 ± 1 (S1) beziehungsweise 6 ± 2 (S2, Abb. 31). Wie erwartet, induzierte die Behandlung der Zellen mit der Positivkontrolle BaP ein signifikanter Anstieg der MF auf 158 ± 108 (S1) beziehungsweise auf 112 ± 47 (S2), und somit um Faktor 32 (S1) beziehungsweise 19 (S2) im Vergleich zur Kontrollpopulation. Im Gegensatz hierzu induzierte die Behandlung der V79 hCYP1A1-Zellen mit $1 \mu\text{M}$ E2 keinen statistisch signifikanten Anstieg der MF (4 ± 3 , S1 beziehungsweise 6 ± 3 , S2). Somit wirkt E2 nicht mutagen auf V79 hCYP1A1-Zellen. Dies widerspricht die Ergebnisse von Kong et al. (2000), steht aber im Einklang mit den Beobachtungen von Drevon et al. (1981).

Einfluss der Hemmung der COMT-Aktivität auf die MF

Die MF der Zellen, die einer 30-minütigen Inkubation mit $20 \mu\text{M}$ OR-486 und anschließend einer durchgehenden, zweiwöchigen und dreiwöchigen Co-Inkubation mit 0,05% DMSO unterzogen wurden (9 ± 4 bei S1 und 6 ± 3 bei S2), unterschied sich nicht statistisch signifikant von derjenigen der Lösungsmittelkontrolle (5 ± 1 bei S1 und 6 ± 2 bei S2, Abb. 31). Folglich induziert OR-486 keine Genmutationen im *hprt*-Lokus von V79 hCYP1A1-Zellen.

Nach Hemmung der COMT-Aktivität und durchgehender Behandlung der Zellen mit $1 \mu\text{M}$ E2 war kein statistisch signifikanter Anstieg der MF (4 ± 2 bei S1 und 7 ± 6 bei S2) im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit OR-486 zu verzeichnen.

Zwischen den Inkubationen mit und denjenigen ohne COMT-Inhibitor wurde kein statistisch signifikanter Unterschied der MF beobachtet. Somit bewirkt die Hemmung der COMT-Aktivität keine Entstehung von Genmutationen im *hprt*-Lokus von V79 hCYP1A1-Zellen nach Behandlung mit $1 \mu\text{M}$ E2.

Da die Behandlung mit $1 \mu\text{M}$ E2 - weder mit noch ohne Hemmung der COMT-Aktivität - eine statistisch signifikante Steigerung der SMF bewirkte, und in der Literatur ähnliche Beobachtungen im Konzentrationsbereich $25 - 100 \mu\text{M}$ beschrieben werden (Kap. 4.2.3), wurde als Nächstes die E2-Konzentration auf $0,1 \mu\text{M}$ reduziert.

Mutantenfrequenz und Plating efficiency 2 nach Behandlung mit $0,1 \mu\text{M}$ E2

Nach durchgehender, zweiwöchiger Behandlung und dreiwöchiger Behandlung der V79 hCYP1A1-Zellen mit $0,1 \mu\text{M}$ E2 war die PE2, sowohl mit als auch ohne COMT-Hemmung, vergleichbar zu derjenigen der Lösungsmittelkontrolle (S1: $0,69 \pm 0,09$; S2: $0,68 \pm 0,07$, Abb.

32). Da alle PE2 unter Berücksichtigung der jeweiligen Standardabweichung über dem angestrebten Mindestwert von 0,7 (Li et al., 1987) lagen, war optimales Zellwachstum über die gesamte Versuchsdauer sichergestellt.

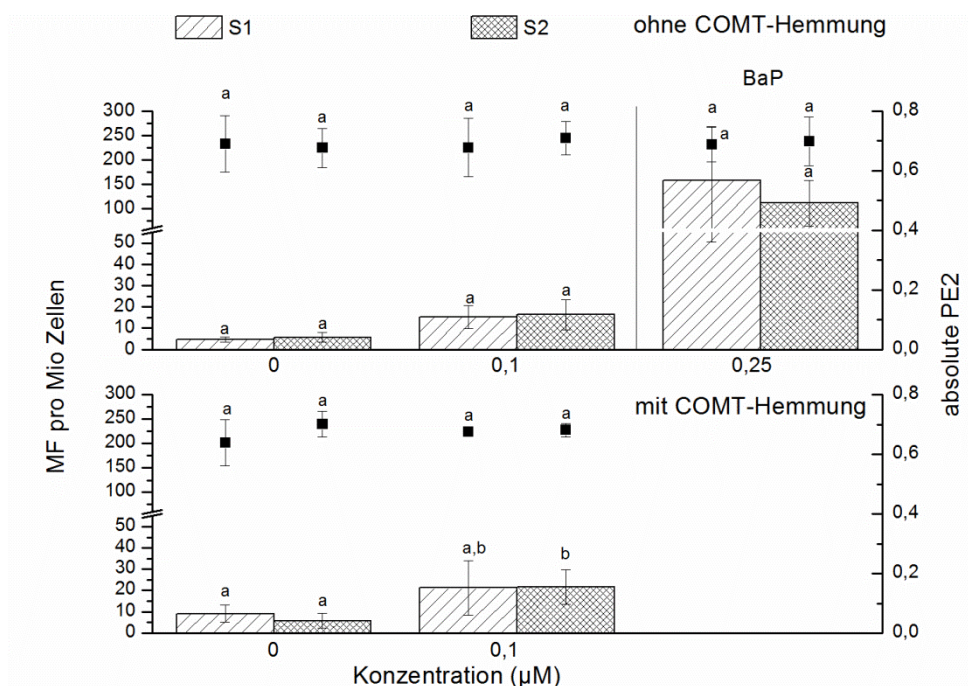


Abb. 32: MF im *hprt*-Lokus von V79 hCYP1A1-Zellen (Balken, linke y-Achse) und absolute PE2 (schwarze Symbole, rechte y-Achse) nach 24-stündiger Behandlung mit BaP beziehungsweise nach durchgehender, zweiwöchiger Behandlung (Selektion 1 (S1), gestrichelte Balken) und durchgehender, dreiwöchiger Behandlung (S2, karierte Balken) mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle) und E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 (oben) und mit 20 µM OR-486 (unten). Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung von drei (Behandlung ohne OR-486) beziehungsweise fünf (Behandlung mit OR-486) unabhängigen Bestimmungen. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (ANOVA, Scheffé Test, Signifikanzniveau 0,05 bei den Inkubationen ohne OR-486 beziehungsweise unabhängiger t-Test bei Inkubationen mit OR-486). Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit und ohne OR-486 sowie zwischen S1 und S2 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests ermittelt (das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde nicht erreicht). Daten im Anhang, Tab. 44 und

Tab. 45.

Die MF der Kontrollpopulation lag konstant niedrig bei 5 ± 1 (S1) beziehungsweise 6 ± 2 (S2, Abb. 32). Wie erwartet, induzierte die Behandlung der Zellen mit der Positivkontrolle BaP ein signifikanter Anstieg der MF auf 158 ± 108 (S1) beziehungsweise auf 112 ± 47 (S2), und somit um Faktor 32 (S1) beziehungsweise 19 (S2) im Vergleich zur Kontrollpopulation. Die durchgehende Behandlung der V79 hCYP1A1-Zellen mit 0,1 µM E2 induzierte zwar eine Erhöhung der MF auf 15 ± 5 (S1) beziehungsweise auf 16 ± 7 (S2), jedoch war dieser

Anstieg nicht statistisch signifikant. Somit wirkt E2 in einer Konzentration von 0,1 μM nicht mutagen auf V79 hCYP1A1-Zellen.

Einfluss der Hemmung der COMT-Aktivität auf die MF nach Behandlung mit 0,1 μ M E2

Die MF der Zellen, die einer 30-minütigen Inkubation mit 20 μ M OR-486 und anschließend einer durchgehenden, zweiwöchigen und dreiwöchigen Co-Inkubation mit 0,05% DMSO unterzogen wurden (9 ± 4 bei S1 und 6 ± 3 bei S2), unterschied sich nicht statistisch signifikant von derjenigen der Lösungsmittelkontrolle (5 ± 1 bei S1 und 6 ± 2 bei S2, Abb. 32). Folglich induziert OR-486 keine Genmutationen im *hprt*-Lokus von V79 hCYP1A1-Zellen. Zwischen den Inkubationen mit und denjenigen ohne COMT-Inhibitor wurde ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied der MF beobachtet.

Nach durchgehender, zweiwöchiger Behandlung der Zellen mit 0,1 μ M E2 bewirkte die Hemmung der COMT-Aktivität eine MF-Erhöhung von 9 ± 4 auf 21 ± 13 im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit OR-486, jedoch war dieser Anstieg nicht statistisch signifikant. Erst nach durchgehender, dreiwöchiger Behandlung mit 0,1 μ M E2 erhöhte sich die MF statistisch signifikant von MF von 6 ± 3 auf 22 ± 8 und somit um nahezu Faktor 4 im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit OR-486 und zur Kontrollpopulation. In der Regel weisen mutagene Substanzen mindestens eine MF-Verdreifachung im Vergleich zur Kontrollpopulation auf (Bradley et al., 1981). Somit bewirkt die Hemmung der COMT-Aktivität nach durchgehender, dreiwöchiger Behandlung von V79 hCYP1A1-Zellen mit 0,1 μ M eine leichte Induktion von Genmutationen im *hprt*-Lokus.

4.3 Bestimmung des Metabolitenprofils im Kulturmedium

Zur Kontrolle der erfolgreichen Hemmung der COMT-Aktivität in V79- beziehungsweise V79 hCYP1A1-Zellen und zur Aufklärung einer eventuellen Korrelation zwischen der gebildeten Metabolitenmenge nach Behandlung der besagten Zelllinien mit 2- und 4-HO-E2 beziehungsweise E2 und der Induktion von MK (Kap. 4.4) und Genmutationen im *hprt*-Lokus (Kap. 4.2), wurde das Metabolitenprofil untersucht.

Im Rahmen der durchgeführten Voruntersuchungen (Kapitel 4.1.6) zeigte sich, dass $97,0\% \pm 1,8\%$ der Verbindungen (Testsubstanz und die entsprechenden Metabolite) im Kulturmedium und $3,0\% \pm 1,8\%$ in den Zellen zu finden sind. Da sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Metabolitenprofilen im zellhaltigen und -freien Medium ergab, wurde bei den Folgeuntersuchungen das Metabolitenprofil im zellfreien Kulturmedium bestimmt.

Zu diesem Zweck wurde das Kulturmedium aus dem jeweiligen Ansatz vom HPRT-Test nach 24-stündiger Substanzbehandlung entnommen (Kap. 4.2) und jeweils 5 ml mittels SPE aufgereinigt (Kap.3.2.12). Daraufhin wurden die dabei extrahierten Catechole (2-HO-E2 und

4-HO-E2), die korrespondierenden Methylcatechole (2-MeO-E2, 3-OMe-2-HO-E2, 4-MeO-E2 und 3-OMe-4-HO-E2) sowie E2 mit BSTFA trimethylsilyliert und mit Hilfe selbst synthetisierter interner Standards (Kap. 3.2.13) anhand ihrer Retentionszeiten (Anhang, Tab. 18) mittels GC/MS/MS identifiziert (Kap.3.2.14).

Die Bestimmung der Metabolitenmenge, beispielsweise nach Inhibierung der COMT-Aktivität, erfolgte anhand des PVF vom jeweiligen Analyten zum korrespondierenden internen Standard (Kap. 4.1.5). Da das PVF ausreicht, um eine Aussage über die Zu- oder Abnahme der Metabolitenmenge machen zu können, wurde hier auf eine absolute Quantifizierung anhand von Kalibriergeraden verzichtet.

Um einen Überblick über die Verteilung der Metabolite im Kulturmedium zu erhalten, wurden die Peakflächen aller Analyten addiert, deren Summe gleich 100 Prozent gesetzt und die einzelnen Peakflächen darauf bezogen. Da die untersuchten Verbindungen trotz ähnlicher Struktur nicht die gleiche Response aufwiesen (Kap.4.1.4), wurde dies bei der Berechnung der prozentualen Verteilung berücksichtigt.

4.3.1 Metabolitenprofil in V79-Zellen nach Behandlung mit 2-HO-E2

Nach Behandlung der V79-Zellen mit 0,08 μM 2-HO-E2 war zusätzlich zum Peak des internen Standards 4-HO-E2 (bei 15,9 min) kein Peak bei 15,1 min (Retentionszeit t_R von 2-HO-E2, Anhang, Tab. 18) vorhanden (Abb. 33, rechts), und somit kein 2-HO-E2 nachweisbar. Stattdessen zeigte das Chromatogramm zusätzlich zu den Peaks der internen Standards 4-Me-OE2 (t_R : 14,5 min) und 3-OMe-4-HO-E2 (t_R : 15,3 min) zwei Peaks bei 14,9 min und 15,2 min (Abb. 33, links), die aufgrund ihrer Retentionszeiten (Anhang, Tab. 18) jeweils 3-OMe-2-HO-E2 und 2-MeO-E2 zugeordnet wurden. Folglich war von der vollständigen Methylierung von 2-HO-E2 auszugehen. Dieses Ergebnis widerspricht Beschreibungen in der Literatur, nach denen V79-Zellen keine COMT-Aktivität aufweisen (Gerstner et al., 2008).

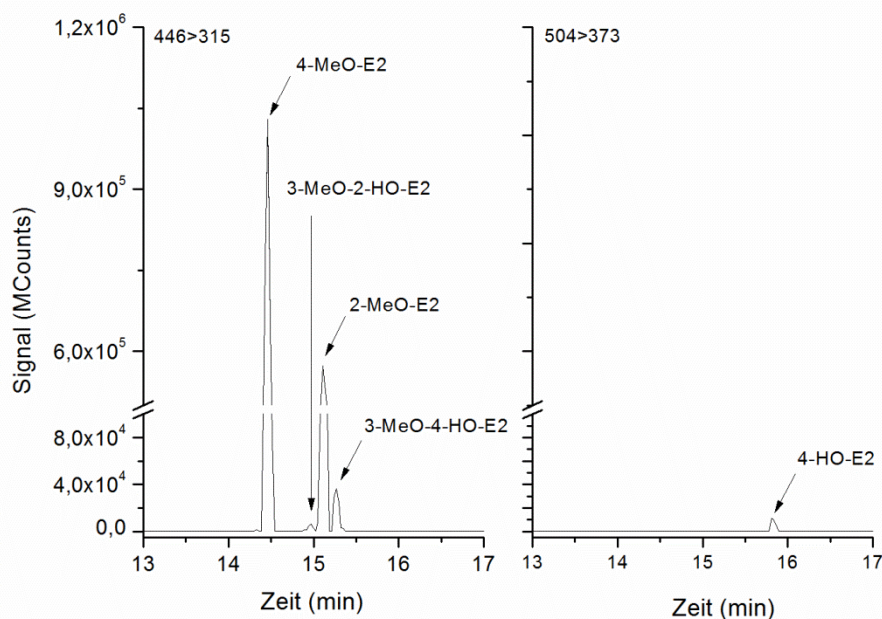


Abb. 33: MRM-Chromatogramm nach 24-stündiger Inkubation von V79-Zellen mit 0,08 μM 2-HO-E2 und anschließender Aufarbeitung von 5 ml Kulturmedium mittels SPE (Kap.3.2.12). Dargestellt sind die extrahierten Quantifier-Massenspuren der Übergänge 446>315 für die derivatisierten Methylierungsprodukte, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-MeO-E2 und deren internen Standards 3-OMe-4-HO-E2 und 4-MeO-E2 (links), sowie 504>373 für trimethylsilyliertes 2-HO-E2 und dessen internen Standard 4-HO-E2 (rechts). Säule: Supelco SLB-5ms, Analysebedingungen: Kap.3.2.14.

Analog zu den Beobachtungen bei der Umsetzung von 2-HO-E2 mit rekombinanter COMT aus MCF-7- und ZR-75-Zellen (Dawling et al., 2001) sowie im extrahepatischen Gewebe von SD-Ratten und männlichen syrischen Hamstern (Li et al., 1989) war 2-MeO-E2 mit einem Anteil von $96,2\% \pm 1,8\%$ (bezogen auf die Summe aller Peakflächen) das bevorzugt gebildete Methylcatechol. Im Vergleich hierzu lag der 3-OMe-2-HO-E2-Anteil bei $3,8\% \pm 1,8\%$ (Abb. 34, oben links).

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Response der beiden Methylcatechole (Kap. 4.1.4) ergab sich ein 2-MeO-E2 / 3-OMe-2-HO-E2-Verhältnis von 13:1. In der Literatur sind Methylierungsverhältnisse von 2:1 bei Umsetzungen mit cytosolischer COMT aus humanen Brustepithelzellen (Goodman et al., 2002) sowie mit isolierter humaner rekombinanter COMT und mit isolierter rekombinanter Ratten-COMT (gewonnen aus transfizierten *E. coli*) beschrieben (Lautala et al., 2001; Goodman et al., 2002). Bei Umsetzungen in lysierten und intakten Zellen hingegen wird ein Methylierungsverhältnis von 30:1 (zusammengefasst von Roy et al., 1990) beobachtet, welches sich in der gleichen Größenordnung wie die hier ermittelte befindet.

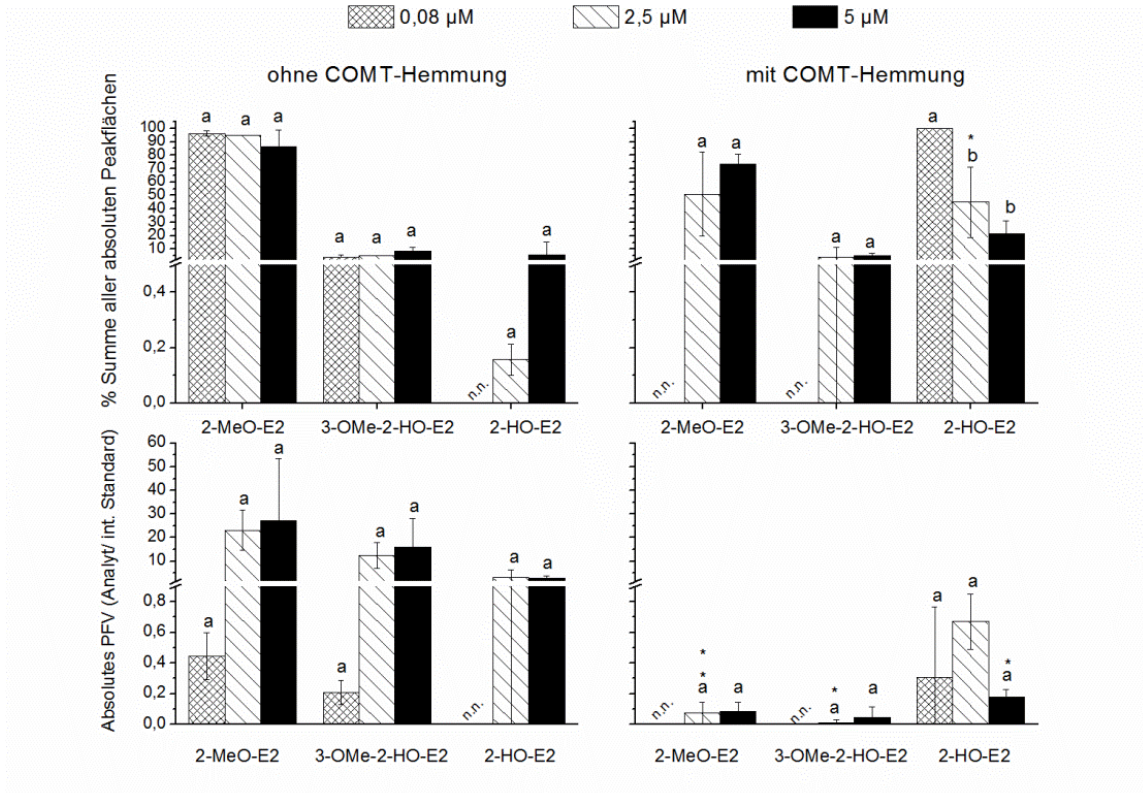


Abb. 34: Prozentuale Verteilung von 2-MeO-E2, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-HO-E2 (oben) und deren absolutes PFV zu dem jeweiligen internen Standard im Kulturmedium von V79-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 2-HO-E2 sowie 0 μM des COMT-Hemmers OR-486 (links) und 20 μM OR-486 (rechts). Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Inkubationen, jeweils 1-fach mittels SPE aufgearbeitet und 2-fach mittels GC/MS/MS analysiert. Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit 0,08, 2,5 und 5 μM 2-HO-E2 wurden bei jedem einzelnen Analyten mittels ANOVA (Scheffé, $p < 0,05$) untersucht. Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit und ohne OR-486 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests (*: $p < 0,05$) ermittelt. n.n.: nicht nachgewiesen. Daten im Anhang, Tab. 55.

Im Gegensatz zur Zellinkubation mit 0,08 μM 2-HO-E2 wurde nach Zellinkubation mit Konzentrationen von 2,5 μM und 5 μM nicht umgesetztes 2-HO-E2 im Kulturmedium nachgewiesen (exemplarisches Chromatogramm: Abb. 35, rechts).

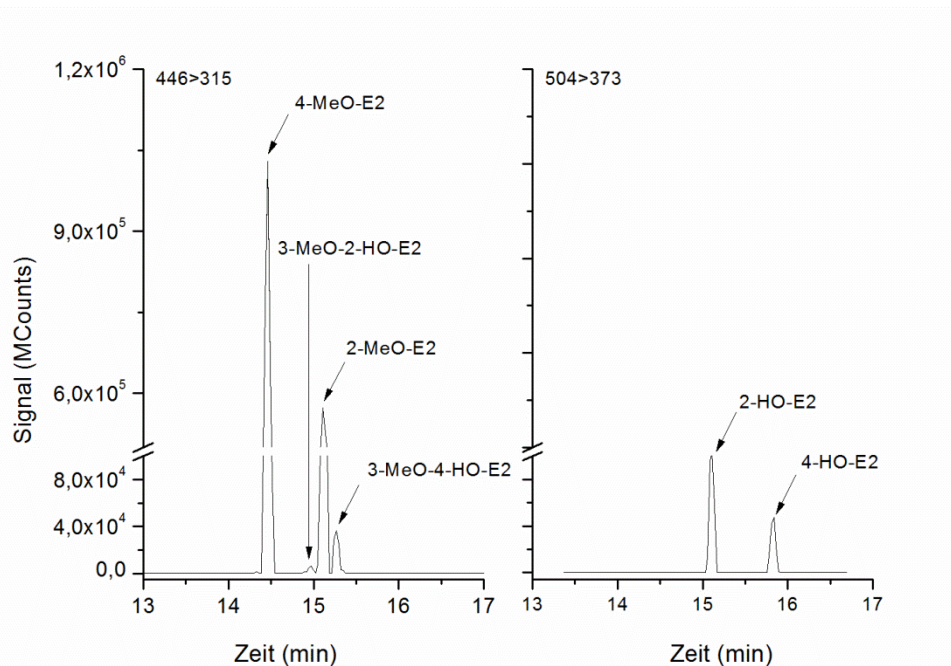


Abb. 35: MRM-Chromatogramm nach 24-stündiger Inkubation von V79-Zellen mit $5\ \mu\text{M}$ 2-HO-E2 und anschließender Aufarbeitung von 5 ml Kulturmedium mittels SPE (Kap.3.2.12). Dargestellt sind die extrahierten Quantifizier-Massenspuren der Übergänge 446>315 für die derivatisierten Methylierungsprodukte, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-MeO-E2 und deren internen Standards 3-OMe-4-HO-E2 und 4-MeO-E2 (links), sowie 504>373 für trimethylsilyliertes 2-HO-E2 und dessen internen Standard 4-HO-E2 (rechts). Säule: Supelco SLB-5ms, Analysebedingungen: Kap.3.2.14.

Während das PVF von 2-HO-E2 nach Behandlung mit $2,5\ \mu\text{M}$ stark variierte (3 ± 3 , Abb. 34, unten links), lag das PVF nach Zellbehandlung mit $5\ \mu\text{M}$ 2-HO-E2 bei 3 ± 1 und dadurch um Faktor 3 höher als nach Inkubation mit $0,08\ \mu\text{M}$ 2-HO-E2. Nichtsdestotrotz lag der 2-HO-E2-Anteil (bezogen auf die Summe aller Peakflächen) nach Inkubation mit $2,5\ \mu\text{M}$ und mit $5\ \mu\text{M}$ unter 0,5%, so dass sich die Metabolitenprofile bei allen drei getesteten 2-HO-E2-Konzentrationen nicht statistisch signifikant voneinander unterschieden (Abb. 34, oben links).

Einfluss der COMT-Hemmung auf das Metabolitenprofil

Nach der 30-minütigen Inkubation von V79-Zellen mit $20\ \mu\text{M}$ OR-486 und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit $0,08\ \mu\text{M}$ 2-HO-E2 eluierte zusätzlich zum Peak des internen Standards 4-HO-E2 (bei 15,9 min, Abb. 36, rechts) ein Peak bei 15,1 min, der aufgrund seiner Retentionszeit (Anhang, Tab. 18) 2-HO-E2 zugeordnet wurde. Bei den Methylcatecholen hingegen waren zusätzlich zu den Peaks der internen Standards (4-Me-OE2 bei 14,5 min und 3-OMe-4-HO-E2 bei 15,3 min) keine weiteren Peaks vorhanden (Abb. 36, links). Folglich bewirkte die Behandlung mit $20\ \mu\text{M}$ OR-486 eine 100%-ige

Hemmung der COMT-Aktivität, infolge derer sich das Metabolitenprofil im Vergleich zur Inkubation ohne COMT-Inhibitor zugunsten von 2-HO-E2 verschob (Abb. 34).

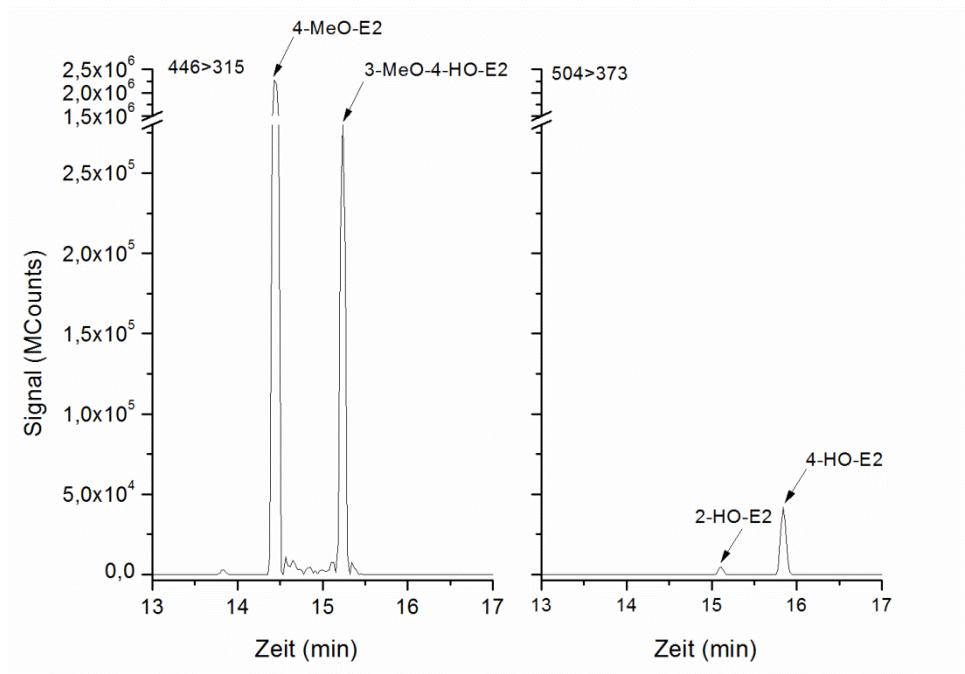


Abb. 36: MRM-Chromatogramm nach 30-minütiger Inkubation von V79-Zellen mit 20 μM OR-486, 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,08 μM 2-HO-E2 und anschließender Aufarbeitung von 5 ml Kulturmedium mittels SPE (Kap.3.2.12). Dargestellt sind die extrahierten Quantifizier-Massenspuren der Übergänge 446>315 für die derivatisierten Methylierungsprodukte, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-MeO-E2 und deren internen Standards 3-OMe-4-HO-E2 und 4-MeO-E2 (links), sowie 504>373 für trimethylsilyliertes 2-HO-E2 und dessen internen Standard 4-HO-E2 (rechts). Säule: Supelco SLB-5ms, Analysebedingungen: Kap.3.2.14.

Im Gegensatz hierzu waren nach Hemmung der COMT-Aktivität mit 20 μM OR-486 und anschließender Behandlung der Zellen mit 2,5 μM beziehungsweise 5 μM 2-HO-E2 zusätzlich zu den Peaks der internen Standards (4-Me-OE2 bei 14,5 min und 3-OMe-4-HO-E2 bei 15,3 min) zwei Peaks bei 14,9 min und 15,2 min vorhanden (exemplarisches Chromatogramm: Abb. 37, links), die aufgrund ihrer Retentionszeiten (Anhang, Tab. 18) jeweils 3-OMe-2-HO-E2 und 2-MeO-E2 zugeordnet wurden. 2-HO-E2 wurde ebenfalls im Kulturmedium nachgewiesen (Abb. 37, rechts). Somit wurde bei diesen 2-HO-E2-Konzentrationen die COMT-Aktivität nur noch partiell inhibiert. Da OR-486 ein kompetitiver Hemmer ist (Kap. 4.1.8), liegt die Vermutung nahe, dass mit steigender 2-HO-E2-Konzentration der COMT-Inhibitor vom aktiven Zentrum des Enzyms zum Teil wieder verdrängt und dadurch die Umsetzung von 2-HO-E2 begünstigt wurde.

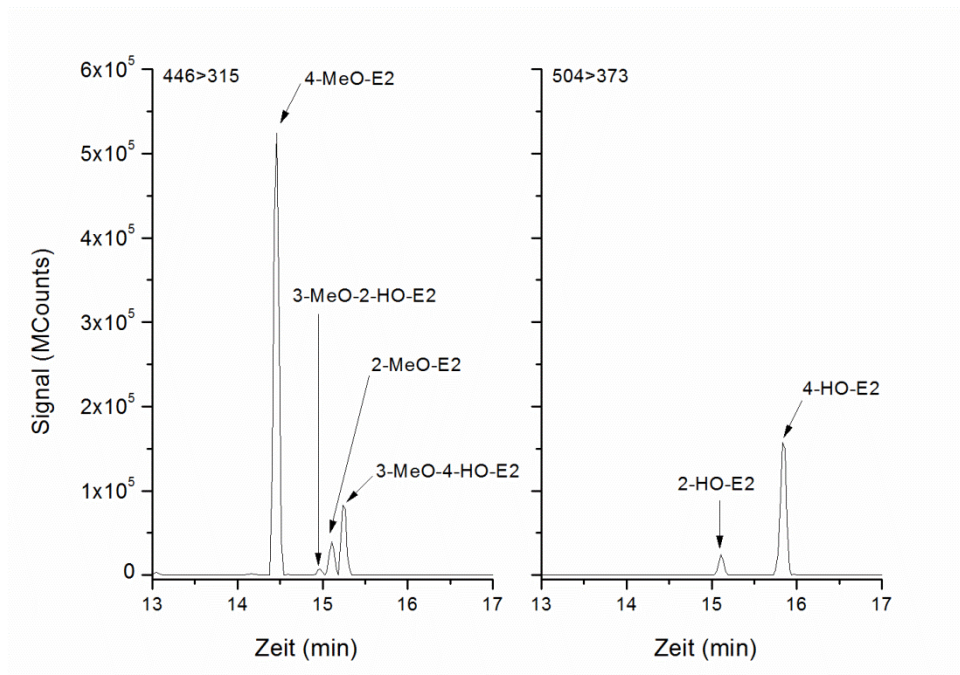


Abb. 37: MRM-Chromatogramm nach 30-minütiger Inkubation von V79-Zellen mit 20 μM OR-486, 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 5 μM 2-HO-E2 und anschließender Aufarbeitung von 5 ml Kulturmedium mittels SPE (Kap.3.2.12). Dargestellt sind die extrahierten Quantifizier-Massenspektren der Übergänge 446>315 für die derivatisierten Methylierungsprodukte, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-MeO-E2 und deren internen Standards 3-OMe-4-HO-E2 und 4-MeO-E2 (links), sowie 504>373 für trimethylsilyliertes 2-HO-E2 und dessen internen Standard 4-HO-E2 (rechts). Säule: Supelco SLB-5ms, Analysebedingungen: Kap.3.2.14.

Um das Ausmaß der beobachteten COMT-Hemmung einzuschätzen, wurden die PVF von 2-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukten mit und ohne Inhibierung der COMT-Aktivität miteinander verglichen (Abb. 34).

Während nach Inkubation mit 2,5 μM 2-HO-E2 das PVF von 2-HO-E2 bei den drei unabhängigen Bestimmungen stark variierte (zwischen 0,5 und 7), lag es nach Hemmung der COMT-Aktivität bei $0,7 \pm 0,2$ (Abb. 34, unten rechts). Aufgrund der starken PVF-Abweichung bei der Inkubation ohne COMT-Inhibitor, war es nicht möglich, eine Aussage über das Ausmaß der COMT-Hemmung über das PVF von 2-HO-E2 zu machen. Stattdessen wurde daher die PVF der Methylcatechole zu Hilfe genommen.

Nach Hemmung der COMT-Aktivität wurde bei der Inkubation mit 2,5 μM 2-HO-E2 eine statistisch signifikante Reduktion des PVF von 2-MeO-E2 um Faktor 288 und desjenigen von 3-OMe-2-HO-E2 um Faktor 1250 im Vergleich zur Inkubation ohne COMT-Hemmung beobachtet. Anhand dieser Ergebnisse ist von einer zwar nicht vollständigen, jedoch eindeutig nachweisbaren Inhibierung der COMT-Aktivität auszugehen.

Im Vergleich hierzu reduzierte sich nach COMT-Hemmung und anschließender Behandlung mit 5 μM 2-HO-E2 das PVF von 2-MeO-E2 um Faktor 338 und dasjenige von 3-OMe-2-HO-E2 um Faktor 332 im Vergleich zur Inkubation ohne COMT-Hemmer, allerdings waren diese Unterschiede aufgrund der starken PVF-Schwankungen bei den Inkubationen ohne Hemmer nicht statistisch signifikant (Abb. 34, unten).

Was das PVF von 2-HO-E2 angeht, war nach Hemmung der COMT-Aktivität und anschließender Behandlung mit 5 μM 2-HO-E2 eine statistisch signifikante Abnahme (um Faktor 17) im Vergleich zur Inkubation ohne Hemmer zu verzeichnen. Dies entspricht zwar nicht der Erwartung (PVF-Zunahme nach Inhibierung der COMT-Aktivität), bestätigt aber die Vermutung, dass der kompetitive Hemmer OR-486 aufgrund steigender 2-HO-E2-Konzentration zum Teil wieder vom aktiven Zentrum des Enzyms verdrängt und dadurch die Umsetzung von 2-HO-E2 begünstigt wurde. Letztere geht mit der hier beobachteten Abnahme des PVF ein.

Beim direkten Vergleich der Inkubationen mit OR-486 und je 2,5 μM und 5 μM 2-HO-E2 wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede der PVF beobachtet. Somit hatte die Erhöhung der 2-HO-E2-Konzentration von 2,5 μM auf 5 μM keinen Effekt auf die COMT-hemmende Wirkung von OR-486.

In Anbetracht der Ergebnisse ist festzustellen, dass die Inkubation mit 20 μM OR-486 und 0,08 μM 2-HO-E2 eine vollständige COMT-Inhibierung bewirkte, während nach Inkubation mit 20 μM OR-486 und je 2,5 μM und 5 μM 2-HO-E2 lediglich eine partielle Inhibierung der COMT-Aktivität beobachtet wurde.

4.3.2 Metabolitenprofil in V79-Zellen nach Behandlung mit 4-HO-E2

Nach Behandlung der V79-Zellen mit 5 - 40 μM 4-HO-E2 eluierte zusätzlich zum Peak des internen Standards 2-HO-E2 (bei 15,1 min) ein Peak bei 15,9 min (exemplarisches Chromatogramm: Abb. 38, rechts), der aufgrund seiner Retentionszeit (Anhang, Tab. 18) als 4-HO-E2 identifiziert wurde.

Anders als bei der Umsetzung von 4-HO-E2 mit cytosolischer und isolierter rekombinanter humaner COMT (Dawling et al., 2001; Goodman et al., 2002), bei der 4-MeO-E2 als einziges Metabolit entsteht, wurden in V79-Zellen zwei Metabolite gebildet. Letztere erschienen im Chromatogramm zusätzlich zu den Peaks der internen Standards (3-OMe-2-HO-E2 bei 14,9 min und 2-Me-OE2 bei 15,2 min) bei 14,5 min und 15,3 min (Abb. 38, links) und wurden aufgrund ihrer Retentionszeiten (Anhang, Tab. 18) jeweils 4-MeO-E2 und 3-OMe-4-HO-E2 zugeordnet. Folglich fand über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich eine Umsetzung von 4-HO-E2 zu seinen beiden Methylierungsprodukten statt.

Dieses Ergebnis widerspricht zwar Beschreibungen in der Literatur, nach denen V79-Zellen keine COMT-Aktivität aufweisen (Gerstner et al., 2008), steht aber im Einklang mit den Beobachtungen bei der Umsetzung von 4-HO-E2 mit isolierter COMT aus Rattenleber (Roy et al., 1990).

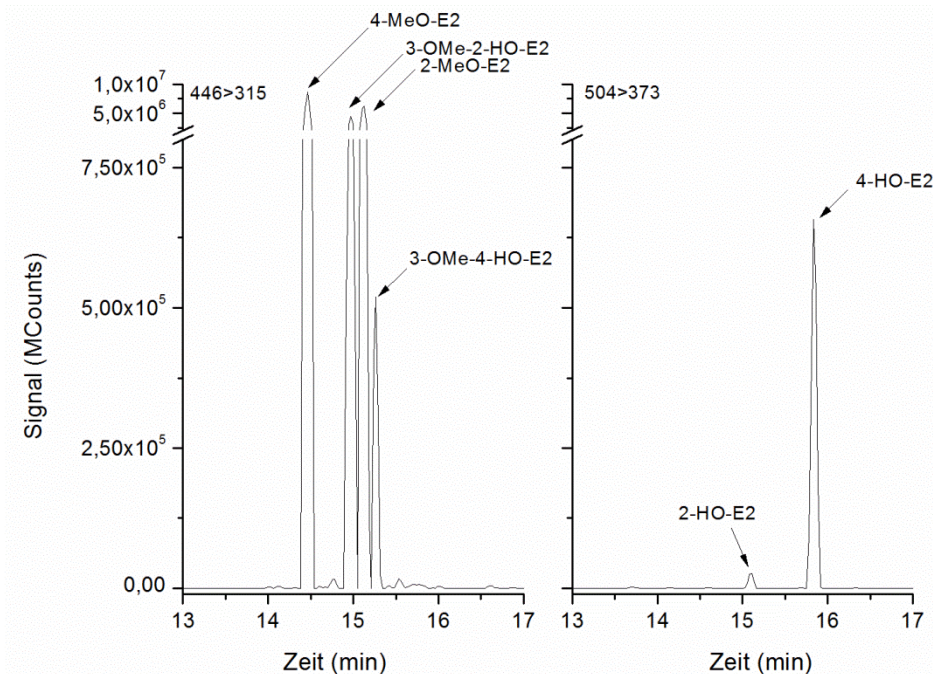


Abb. 38: MRM-Chromatogramm nach 24-stündiger Inkubation von V79-Zellen mit 40 μM 4-HO-E2 und anschließender Aufarbeitung von 5 ml Kulturmedium mittels SPE (Kap.3.2.12). Dargestellt sind die extrahierten Quantifizier-Massenspuren der Übergänge 446>315 für die derivatisierten Methylierungsprodukte, 3-OMe-4-HO-E2 und 4-MeO-E2 und deren internen Standards 3-OMe-2-HO-E2 und 2-MeO-E2 (links), sowie 504>373 für trimethylsilyliertes 4-HO-E2 und dessen internen Standard 2-HO-E2 (rechts). Säule: Supelco SLB-5ms, Analysebedingungen: Kap.3.2.14.

Nach Inkubation mit 5 μM 4-HO-E2 machte nicht umgesetztes 4-HO-E2 0,2% \pm 0,07% der Summe aller Peakflächen aus. 4-MeO-E2 stellte hingegen 98,5% \pm 0,4% und 3-OMe-4-HO-E2 1,3% \pm 0,3% der Summe aller Peakflächen dar (Abb. 39, oben links). Nach Behandlung mit 10 und 20 μM 4-HO-E2 war kein statistisch signifikanter Unterschied der Metabolitenprofile im Vergleich zur Inkubation mit 5 μM 4-HO-E2 zu verzeichnen. Lediglich der 4-HO-E2-Anteil an der Summe aller Peakflächen war nach Behandlung mit 20 μM 4-HO-E2 mit 0,8% \pm 0,1% signifikant höher als nach Behandlung mit 5 und 10 μM 4-HO-E2. Somit wurde 4-HO-E2 im Konzentrationsbereich 5 -20 μM nahezu vollständig methyliert.

Die PVF der Methylierungsprodukte, mit Ausnahme von 3-OMe-4-HO-E2 bei Inkubation mit 10 μM 4-HO-E2, unterschieden sich ebenfalls nicht statistisch signifikant voneinander (Abb. 39, unten links).

Im Gegensatz hierzu unterschieden sich die PVF von 2-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukten sowie das Metabolitenprofil nach Behandlung mit 40 μM 4-HO-E2 statistisch signifikant von denjenigen, die nach Inkubation mit 5 -20 μM 4-HO-E2 beobachtet wurden.

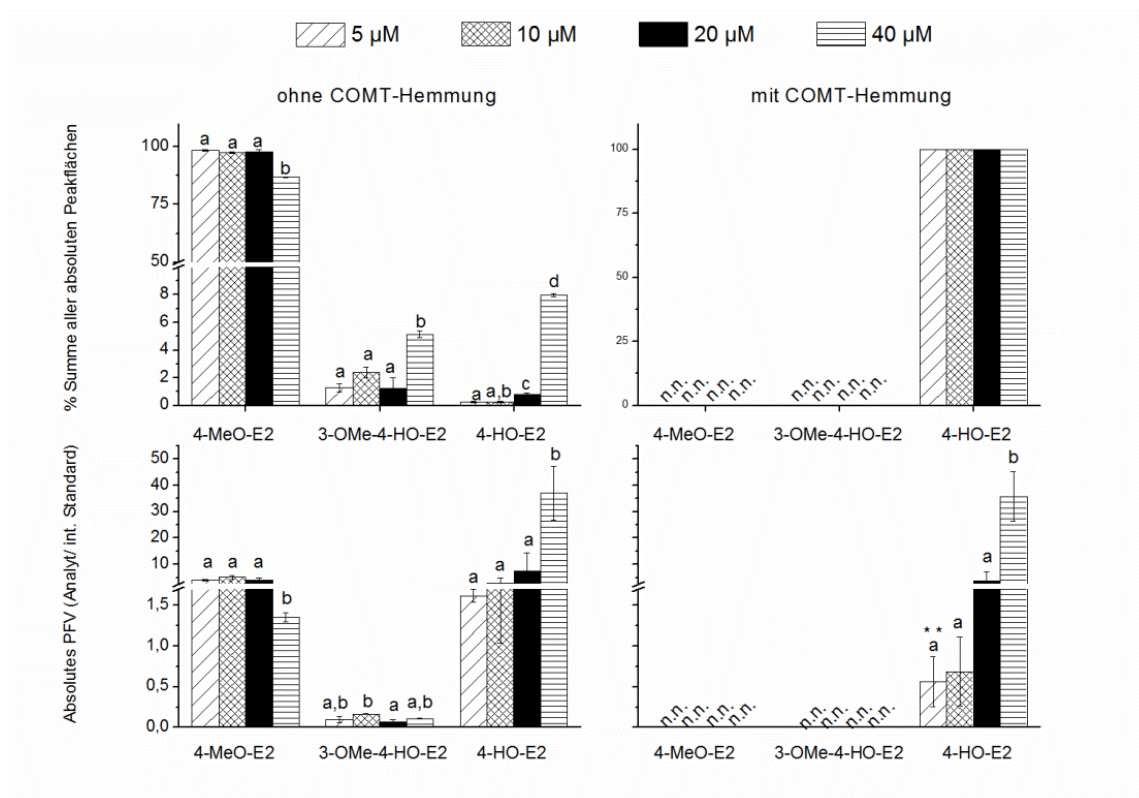


Abb. 39: Prozentuale Verteilung von 4-MeO-E2, 3-OMe-4-HO-E2 und 4-HO-E2 (oben) und deren absolutes PFV zu dem jeweiligen internen Standard im Kulturmedium von V79-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 4-HO-E2 sowie 0 μM des COMT-Hemmers OR-486 (links) und 20 μM OR-486 (rechts). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Inkubationen, jeweils 1-fach mittels SPE aufgearbeitet und 2-fach mittels GC/MS/MS analysiert. Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit 5 -40 μM 4-HO-E2 wurden bei jedem einzelnen Analyten mittels ANOVA (Scheffé, $p < 0,05$) untersucht. Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit und ohne OR-486 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests (*: $p < 0,05$) ermittelt. n.n.: nicht nachgewiesen. Daten im Anhang, Tab. 56.

Einfluss der COMT-Hemmung auf das Metabolitenprofil

Nach der 30-minütigen Inkubation von V79-Zellen mit 20 μM OR-486 und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 5 – 40 μM 4-HO-E2 wurde 4-HO-E2 (t_R : 15,9 min) im Kulturmedium nachgewiesen (exemplarisches Chromatogramm, Abb. 40, rechts). Bei den Methylcatecholen hingegen zeigte das Chromatogramm zusätzlich zu den Peaks der internen Standards (3-OMe-2-HO-E2 bei 14,9 min und 2-Me-OE2 bei 15,2 min) keine weiteren Peaks (Abb. 40, links).

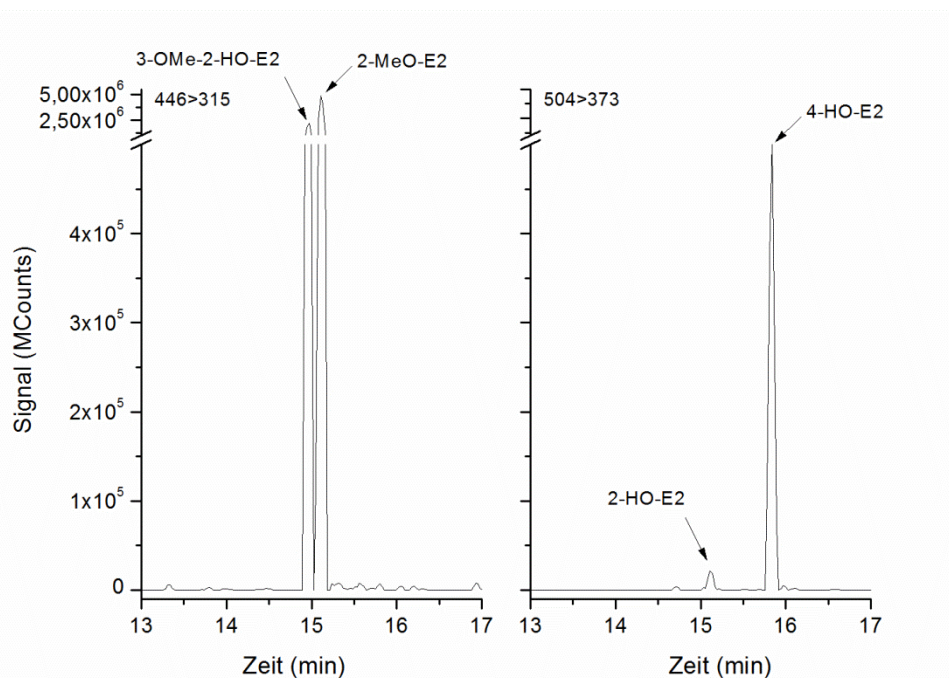


Abb. 40: MRM-Chromatogramm nach 30-minütiger Inkubation von V79-Zellen mit 20 μM OR-486, 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 40 μM 4-HO-E2 und anschließender Aufarbeitung von 5 ml Kulturmedium mittels SPE (Kap.3.2.12). Dargestellt sind die extrahierten Quantifizier-Massenspuren der Übergänge 446>315 für die derivatisierten Methylierungsprodukte, 3-OMe-4-HO-E2 und 4-MeO-E2 und deren internen Standards 3-OMe-2-HO-E2 und 2-MeO-E2 (links), sowie 504>373 für trimethylsilyliertes 4-HO-E2 und dessen internen Standard 2-HO-E2 (rechts). Säule: Supelco SLB-5ms, Analysebedingungen: Kap.3.2.14.

Somit bewirkte die Behandlung mit 20 μM OR-486 eine 100%-ige Hemmung der COMT-Aktivität über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich. Demzufolge verschob sich das Metabolitenprofil im Vergleich zur Inkubation ohne COMT-Inhibitor zugunsten von 4-HO-E2 (Abb. 39, oben).

Nichtsdestotrotz war hier statt der erwarteten Zunahme des PVF von 4-HO-E2 eine statistisch signifikante PVF-Abnahme (Inkubation mit OR-486 und 5 μM 4-HO-E2) beziehungsweise kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Inkubationen ohne COMT-Hemmer zu verzeichnen (Abb. 39, unten).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass 4-HO-E2 aufgrund der fehlenden Deaktivierung durch die COMT anderweitig metabolisiert wurde. Da V79-Zellen keine UGTs oder SULTs exprimieren (McGregor et al., 1991), können eine Glucuronidierung oder Sulfatierung ausgeschlossen werden. Im Hamster, und daher vermutlich auch in der hier verwendeten Zelllinie, werden jedoch Peroxidasen exprimiert (Klicka et al., 1983). Folglich könnte hier eine Peroxidase-vermittelte Oxidation zum E2-3,4-Chinon stattgefunden haben, die je nach Ausmaß in einer Reduktion der 4-HO-E2-Menge resultiert beziehungsweise ein konstant bleibender 4-HO-E2-Anteil zur Folge hat.

4.3.3 Metabolitenprofil in V79 hCYP1A1-Zellen nach Behandlung mit E2

Wie in Kapitel 4.1.5 und den dort aufgeführten Literaturstellen beschrieben wird, katalysiert humanes CYP1A1 hauptsächlich die Hydroxylierung von E2 an Position C-2 und in geringerem Umfang an Position C-4. Da die 2-Hydroxylierung fast 20-fach höher als die 4-Hydroxylierung ist, war davon auszugehen, dass nach Behandlung von V79 hCYP1A1-Zellen vorrangig 2-HO-E2 und geringe Mengen 4-HO-E2 gebildet werden. Da V79 hCYP1A1-Zellen durch stabile Transfektion der V79-Zellen mit hCYP1A1 erzeugt wurden (Schmalix et al., 1993), und die Mutterzelllinie über COMT-Aktivität verfügt (Kap. 4.3.1 und 4.3.2), war zudem die Bildung der entsprechenden Methylcatechole zu erwarten. Darüber hinaus war mit einer möglichen Oxidation von E2 zu Estron (E1) mittels 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (zusammengefasst von Yager und Liehr, 1996) zu rechnen, da dieses Enzym in der Leber und in extrahepatischem Gewebe von Maus und Ratte exprimiert wird (zusammengefasst von Peltoketo et al., 1999) und daher vermutlich auch in der hier verwendeten Zelllinie, welche aus einer verwandten Nagetierart gewonnen wird.

Wie erwartet, wurden nach 24-stündiger Inkubation mit 1 μ M E2 (Abb. 28) nicht umgesetztes E2 (tR: 13,7 min), die Catechole 2-HO-E2 (tR: 15,1 min) und 4-HO-E2 (tR: 15,9 min) sowie die Methylierungsprodukte 2-MeO-E2 (tR: 15,2 min), 4-MeO-E2 (tR: 14,5 min) und 3-OMe-2-HO-E2 (tR: 14,9 min) im Kulturmedium nachgewiesen (Abb. 41). E1 war ebenfalls im Medium zu finden (12,7 min). Anders als bei E2 wurden aber keine Metabolite von diesem Steroid nachgewiesen (Daten nicht dargestellt), was dafür spricht, dass E2 in V79 hCYP1A1-Zellen bevorzugt hydroxyliert wird. Dies steht im Einklang mit Beschreibungen in der Literatur, nach denen E2 das bevorzugte Substrat bei der Umsetzung von rekombinantem hCYP1A1 mit E1 und E2 war (Kisselev et al., 2005).

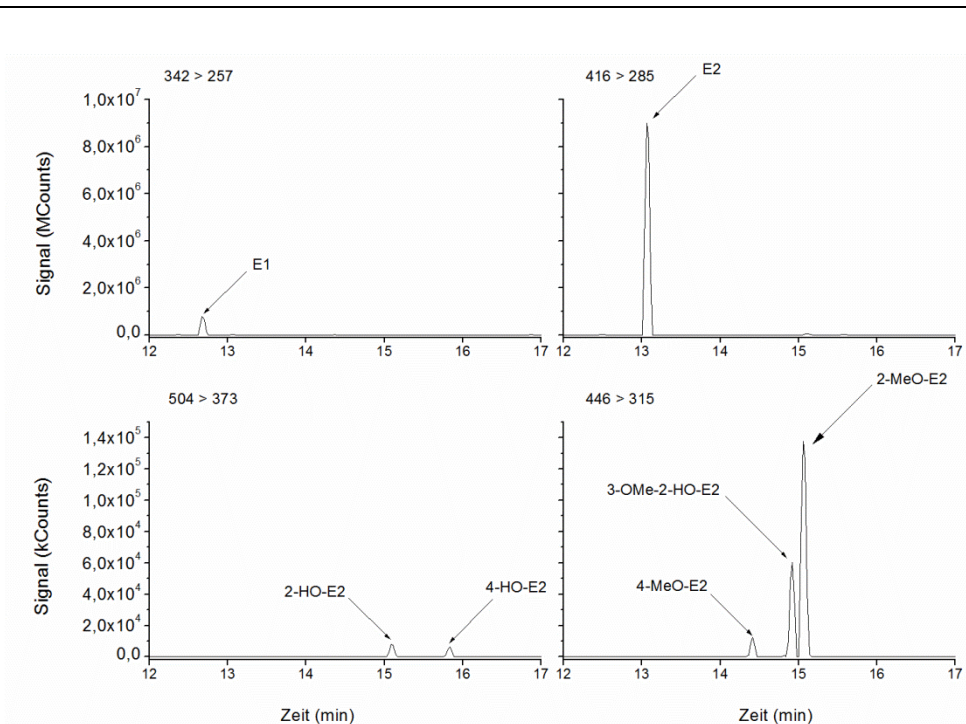


Abb. 41: MRM-Chromatogramm nach 24-stündiger Inkubation von V79 hCYP1A1-Zellen mit 1 μ M E2 und anschließender Aufarbeitung von 5 ml Kulturmedium mittels SPE (Kap.3.2.12). Dargestellt sind die extrahierten Quantifizier-Massenspektren der Übergänge 416>285 für trimethylsilyliertes E2 (oben, rechts), 342>257 für trimethylsilyliertes E1 (oben, links), 504>373 für trimethylsilyliertes 2- und 4-HO-E2 (unten, links), sowie 446>315 für die derivatisierten Methylierungsprodukte 2- und 4-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2 (unten, rechts). Säule: Supelco SLB-5ms, Analysebedingungen: Kap.3.2.14.

Bezogen auf die Summe aller Peakflächen betrug der E2-Anteil $86,3\% \pm 1,9\%$ und der E1-Anteil $10,9\% \pm 1,5\%$ (Abb. 42, oben). Im Vergleich hierzu stellten 2-MeO-E2 $2,4\% \pm 0,5\%$ und 4-MeO-E2 $0,2 \pm 0,1\%$ der Summe aller Peakflächen dar. Die Catechole, 2- und 4-HO-E2 sowie 3-OMe-2-HO-E2 trugen mit einem Anteil von jeweils unter 0,1% kaum zur Gesamtpeakflächensumme bei. Somit wurde nur ein Teil des eingesetzten E2 hydroxyliert und die dabei gebildeten Catechole nahezu vollständig methyliert.

Das hier beobachtete Metabolitenspektrum deckt sich mit den Beobachtungen nach der Behandlung von V79-Zellen mit 2-HO-E2 (Kap. 4.3.1) und mit 4-HO-E2 (Kap. 4.3.2). Wie auch in diesen beiden Fällen, war hier 2-MeO-E2 das Hauptmetabolit von 2-HO-E2 beziehungsweise 4-MeO-E2 das einzige Metabolit von 4-HO-E2. Studien an rekombinanter humaner COMT (Dawling et al., 2001) und an cytosolischer COMT von SD-Ratten und männlichen syrischen Hamstern (Li et al., 1989) bestätigen diese Ergebnisse. Laut Dawling et al. (2004) liegt der wesentliche strukturelle Unterschied zwischen 2- und 4-HO-E2 in der Nähe der 4-Hydroxygruppe zum B-Ring des Steroids. Als Folge hiervon besitzen die 2-Hydroxy- und die 3-Hydroxygruppe von 2-HO-E2 eine ähnliche Reaktivität, während die Reaktivität der 3-Hydroxy- und der 4-Hydroxygruppe von 4-HO-E2 stark voneinander

abweichen. Dadurch wird 2-HO-E2 an beiden Hydroxygruppen und 4-HO-E2 fast ausschließlich an der 4-Hydroxygruppe methyliert.

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Response von 2-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2 (Kap. 4.1.4) ergab sich ein 2-MeO-E2 / 3-OMe-2-HO-E2-Verhältnis von 18:1. Dieses entspricht in etwa demjenigen, welches nach der Behandlung von V79-Zellen mit 2-HO-E2 erhalten wurde (13:1, Kap. 4.3.1). In der Literatur ist bei Umsetzungen in lysierten und intakten Zellen ein Methylierungsverhältnis von 30:1 (zusammengefasst von Roy et al., 1990) beschrieben, welches sich in der gleichen Größenordnung wie die hier ermittelte befindet.

Nach 14- und 21-tägiger Inkubation mit E2 unterschied sich das am Tag der Selektionen untersuchte Metabolitenprofil im Medium (48 h Zellkontakt, Abb. 28) nicht statistisch signifikant von demjenigen, der nach 24-stündiger Behandlung beobachtet wurde (Abb. 42, oben). Einzige Ausnahme stellten die prozentualen Anteile von 3-OMe-2-HO-E2 beziehungsweise 2-Me-O-E2 dar. Bei 3-OMe-2-HO-E2 nahm der prozentuale Anteil mit zunehmender Behandlungszeit statistisch signifikant ab; bei 2-Me-O-E2 hingegen war eine statistisch signifikante Abnahme des prozentualen Anteils erst nach 21-tägiger Behandlung zu verzeichnen.

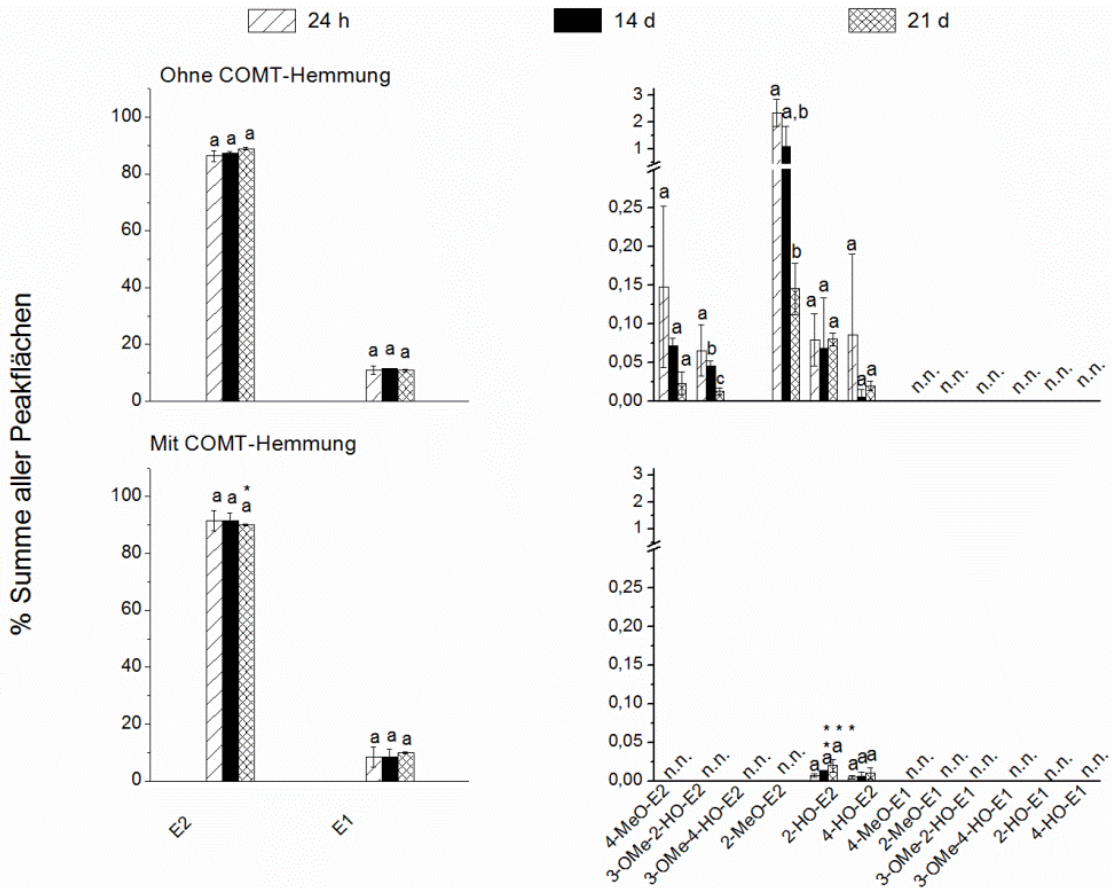


Abb. 42: Prozentuale Verteilung von E2 und E1 (links) sowie von den E2-Metaboliten (rechts) im Kulturmedium von V79 hCYP1A1-Zellen nach 24-stündiger, 14- und 21-tägiger Inkubation mit je 1 μM E2 sowie 0 μM des COMT-Hemmers OR-486 (oben) und 20 μM OR-486 (unten). Das Medium wurde am Tag der Selektionen gesammelt (48 h Zellkontakt). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Inkubationen, jeweils 1-fach mittels SPE aufgearbeitet und 2-fach mittels GC/MS/MS analysiert. Signifikante Unterschiede zwischen der 24-stündigen, 14- und 21-tägigen Inkubation wurden bei jedem einzelnen Analyten mittels ANOVA (Scheffé, $p < 0,05$) untersucht. Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit und ohne OR-486 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests (*: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$) ermittelt. n.n.: nicht nachgewiesen. Daten im Anhang, Tab. 57, Tab. 58 und Tab. 59.

Was das PVF von E2 und dessen beiden Catecholestrogenen angeht, unterschied sich dieses im Medium nach 24-stündiger Inkubation nicht statistisch signifikant von demjenigen im Medium am Tag der Selektionen (das heißt nach 14- und 21-tägiger Inkubation, Zellkontakt jeweils 48 h, Abb. 43, oben). Im Vergleich zur 24-stündigen Inkubation war bei 2- und 4-MeO-E2 eine statistisch signifikante Reduktion des PVF nach 21-tägiger Inkubation und bei E1 eine statistisch signifikante Erhöhung des PVF mit zunehmender Inkubationsdauer zu beobachten. Bei 3-OMe-2-HO-E2 nahm das PVF nach 14-tägiger Inkubation zu und nach 21-tägiger Inkubation wieder ab.

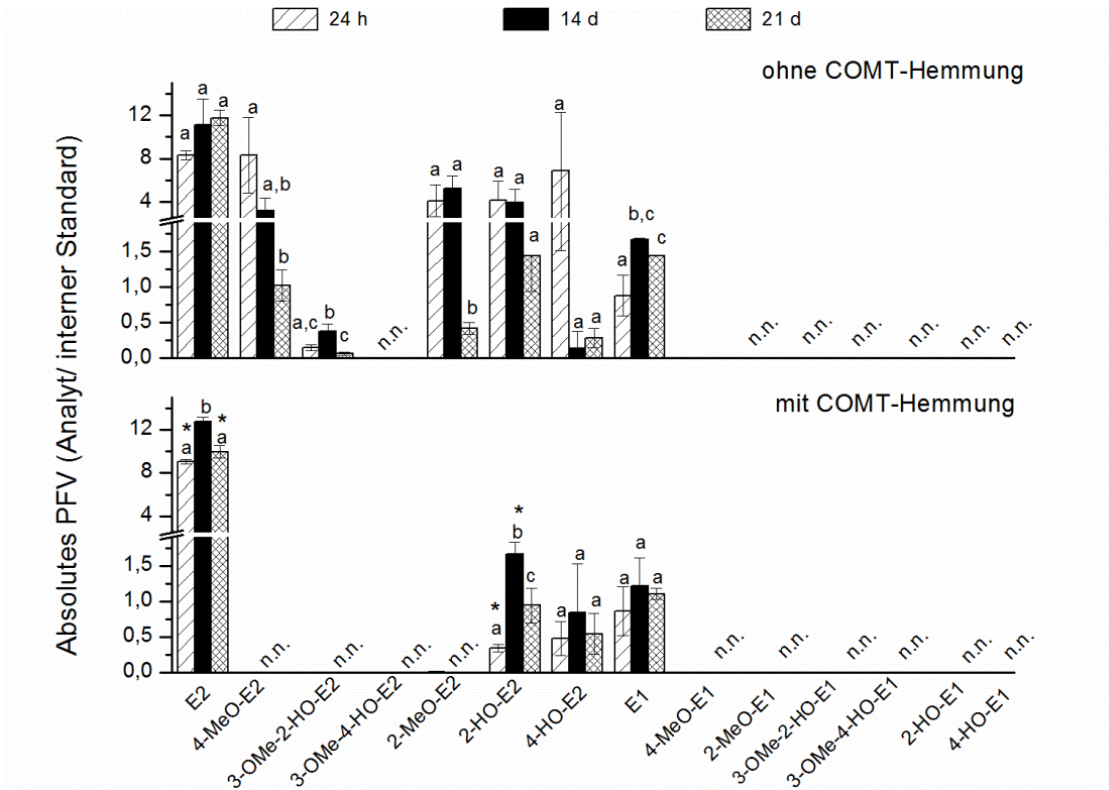


Abb. 43: Absolutes PFV von E1, E2 und dessen Metaboliten zu dem jeweiligen deuterierten internen Standard im Kulturmedium von V79 hCYP1A1-Zellen nach 24-stündiger, 14- und 21-tägiger Inkubation mit je 1 μM E2 sowie 0 μM des COMT-Hemmers OR-486 (oben) und 20 μM OR-486 (unten). Das Medium wurde am Tag der Selektionen gesammelt (48 h Zellkontakt). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Inkubationen, jeweils 1-fach mittels SPE aufgearbeitet und 2-fach mittels GC/MS/MS analysiert. Signifikante Unterschiede zwischen der 24-stündigen, 14- und 21-tägigen Inkubation wurden bei jedem einzelnen Analyten mittels ANOVA (Scheffé, $p < 0,05$) untersucht. Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit und ohne OR-486 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests (*: $p < 0,05$) ermittelt. n.n.: nicht nachgewiesen. Daten im Anhang, Tab. 57, Tab. 58 und Tab. 59.

Einfluss der COMT-Hemmung auf das Metabolitenprofil

Nach der 30-minütigen Inkubation von V79 hCYP1A1-Zellen mit 20 μM OR-486 und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 1 μM E2 wurden im Kulturmedium nicht umgesetztes E2, E1, 2- und 4-HO-E2 nachgewiesen (Abb. 44).

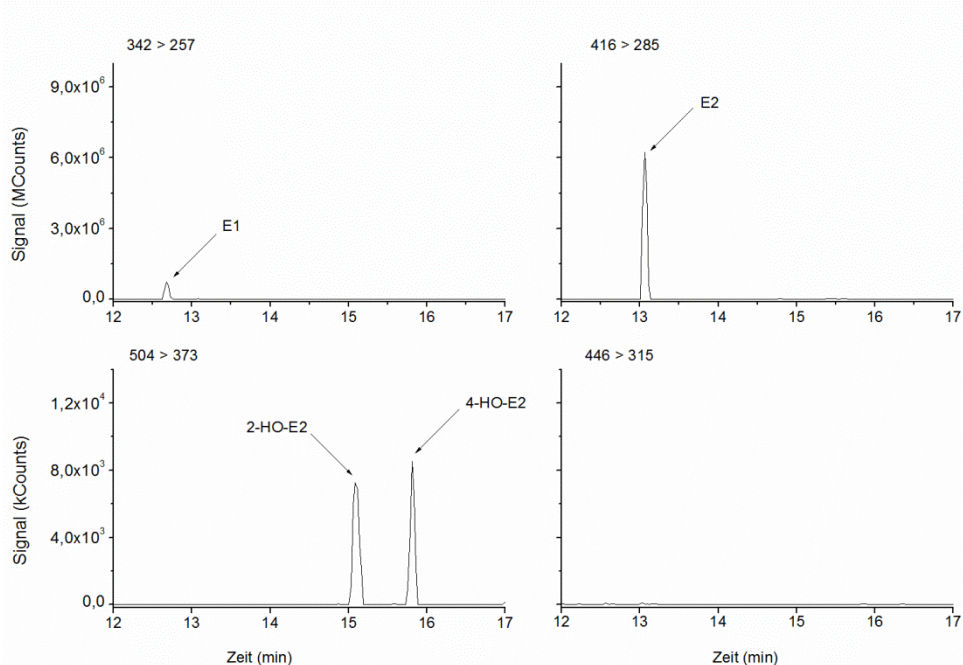


Abb. 44: MRM-Chromatogramm nach 30 minütiger Inkubation von V79 hCYP1A1-Zellen mit 20 μM OR-486, anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 1 μM E2 und anschließender Aufarbeitung von 5 ml Kulturmedium mittels SPE (Kap.3.2.12). Dargestellt sind die extrahierten Quantifizier-Massenspuren der Übergänge 416>285 für trimethylsilyliertes E2 (oben, rechts), 342>257 für trimethylsilyliertes E1 (oben, links), 504>373 für trimethylsilyliertes 2- und 4-HO-E2 (unten, links), sowie 446>315 für die derivatisierten Methylierungsprodukte 2- und 4-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2 (unten, rechts). Säule: Supelco SLB-5ms, Analysebedingungen: Kap.3.2.14.

Da keine Methylierungsprodukte nachgewiesen wurden (Abb. 44), war von einer vollständigen Hemmung der COMT-Aktivität auszugehen. Im Vergleich zur Inkubation ohne COMT-Hemmer war folglich mit einem statistisch signifikanten Anstieg des Catechol-Anteils an der Summe aller Peakflächen zu rechnen.

Entgegen dieser Erwartung nahm der 2-HO-E2-Anteil statistisch signifikant von $0,08\% \pm 0,03\%$ auf $0,007\% \pm 0,001\%$ ab, und somit um Faktor 11, nach 24-stündiger E2-Inkubation (Abb. 42, unten). Auch im Medium, das am Tag der Selektionen nach 14- und 21-tägiger E2-Behandlung gesammelt wurde (48 h Zellkontakt), wurde eine statistisch signifikante Reduktion des 2-HO-E2-Anteils im Vergleich zur Inkubation ohne COMT-Hemmer beobachtet. Im Vergleich hierzu unterschied sich der Anteil an 4-HO-E2

(0,005% ± 0,002%) über die 21-tägige Versuchsdauer nicht statistisch signifikant von demjenigen bei Inkubation ohne COMT-Inhibitor.

Dass bei den vorliegenden Versuchen statt des erwarteten Anstiegs der Catecholmenge eine Reduktion des 2-HO-E2-Anteils bei gleich bleibendem 4-HO-E2-Anteil zu verzeichnen war, deutet darauf hin, dass beide Catechole aufgrund der fehlenden Deaktivierung durch die COMT anderweitig metabolisiert wurden. Eine Glucuronidierung oder Sulfatierung sind auszuschließen, da V79 hCYP1A1-Zellen keine UGTs oder SULTs exprimieren (McGregor et al., 1991). Vielmehr könnte hier eine Oxidation zu den entsprechenden Estrogenchinonen stattgefunden haben. Diese kann beispielweise durch hCYP1A1 oder durch im Hamster exprimierte Peroxidasen (Klicka et al., 1983) katalysiert werden. Laut Cao et al. (1998) ist 2-HO-E2 das bevorzugte Substrat bei der Oxidation zu den Estrogenchinonen. Dies würde erklären, warum der 2-HO-E2-Anteil abnahm, während der 4-HO-E2-Anteil konstant blieb. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass 2-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2 eine Feedback-Inhibierung auf CYP1A1 ausüben (Dawling et al., 2003). Diese läuft folgendermaßen ab: CYP1A1 generiert einerseits Catecholestrogene (aus E2) für die COMT und konkurriert andererseits mit der COMT um die gebildeten Catecholestrogene, um Letztere in Chinone umzuwandeln. Die von der COMT generierten Methylcatechole wiederum fungieren als Substrate für CYP1A1 und inhibieren dadurch die Oxidation der Muttersubstanz E2 und der Catecholestrogene. Das bedeutet, dass in Anwesenheit von Methylcatecholen, wie hier der Fall ist, die Oxidation von E2 und dessen Methylcatechole nicht inhibiert wird. Als Folge ihrer Oxidation nimmt ihr Anteil ab und nicht zu, wie am Anfang erwartet.

Was den E2-Anteil betrifft, so nahm dieser nach Inhibierung der COMT-Aktivität und 21-tägiger Inkubation statistisch signifikant von 91,5% ± 3,5% auf 90,1% ± 0,3% ab (Abb. 42, unten). Demgegenüber unterschied sich der E1-Anteil (8,4% ± 3,5%) über die 21-tägige Versuchsdauer nicht statistisch signifikant von demjenigen bei Inkubation ohne COMT-Inhibitor

Bei allen Inkubationen mit COMT-Inhibitor blieb die prozentuale Metabolitenverteilung über die 21-tägige Versuchsdauer konstant.

Was das PVF der Metabolite nach Inhibierung der COMT-Aktivität betrifft, unterschied sich dieses bei 4-HO-E2 und E1 über die gesamte Versuchsdauer nicht statistisch signifikant von demjenigen bei Inkubation ohne COMT-Hemmer (Abb. 43, unten). Im Gegensatz hierzu nahm das PVF von 2-HO-E2 nach 24-stündiger Inkubation statistisch signifikant von 4,1 ± 1,8 (ohne COMT-Hemmer) auf 0,3 ± 0,05 (mit COMT-Hemmer) ab und nach 14-tägiger Inkubation von 3,9 ± 1,3 (ohne COMT-Hemmer) auf 1,7 ± 0,2 (mit COMT-Hemmer) ab.

Nach 21-tägiger Inkubation hingegen war kein statistisch signifikanter Unterschied des 2-HO-E2-PVF zwischen der Inkubation mit und derjenigen ohne COMT-Hemmer zu verzeichnen.

Im Vergleich hierzu nahm das PVF von E2 nach Inhibierung der COMT-Aktivität und 24-stündiger Inkubation statistisch signifikant von $8,3 \pm 0,4$ auf $9,1 \pm 0,2$ zu und nach 21-tägiger Inkubation von $11,7 \pm 0,7$ auf $9,9 \pm 0,6$ ab (Abb. 43, unten). Nach 14-tägiger Inkubation dagegen war kein statistisch signifikanter Unterschied des E2-PVF zwischen der Inkubation mit und derjenigen ohne COMT-Hemmer zu verzeichnen. Demgegenüber reduzierte sich das PVF von 4-MeO-E2 nach Hemmung der COMT-Aktivität und 24-stündiger Inkubation signifikant von $8,3 \pm 3,5$ auf $0,4 \pm 0,2$ (Abb. 43, unten).

Bei allen Inkubationen mit COMT-Inhibitor blieb das PVF der Analyten, bis auf dasjenige von E2 und 2-HO-E2, über die 21-tägige Versuchsdauer konstant. Bei diesen beiden Analyten war nach 14-tägiger Behandlung eine statistisch signifikante PVF-Erhöpfung gegenüber der 24-stündigen und der 21-tägigen Inkubation zu beobachten (Abb. 43, unten).

Zusammenfassend waren mit und ohne Hemmung der COMT grundsätzlich keine statistisch signifikanten Unterschiede der Metabolitenprofile und der PVF von E1, E2 und dessen Metaboliten über die gesamte Versuchsdauer zu verzeichnen. E2 und 2-HO-E2 bildeten hierbei die Ausnahme. Nach Inhibierung der COMT-Aktivität wurde eine Abnahme des PVF und des relativen Anteils dieser beiden Verbindungen beobachtet, welche über die Catecholoxidation zum Chinon zu erklären ist.

4.3.3.1 Metabolitenprofil in V79 hCYP1A1-Zellen nach Behandlung mit 0,1 μ M E2

Analog zur Inkubation mit 1 μ M E2, wurden nach 24-stündiger, 14- und 21-tägiger Inkubation mit 0,1 μ M E2 nicht umgesetztes E2, E1, 2-HO-E2, 4-HO-E2, 2-MeO-E2, 3-OMe-2-HO-E2 und 4-MeO-E2 im Kulturmedium nachgewiesen (Daten nicht dargestellt).

Nach 24-stündiger Inkubation machten von der Summe aller Peakflächen E2 ($88,9\% \pm 1,8\%$) und E1 ($9,6\% \pm 1,2\%$) den größten Anteil aus. Im Vergleich hierzu stellten 2-MeO-E2 $1,2\% \pm 0,7\%$ und 2-HO-E2 $0,1\% \pm 0,04\%$ der Summe aller Peakflächen dar. 4-HO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2 trugen mit einem Anteil von jeweils unter 0,1% kaum zur Gesamtpeakflächensumme bei. Am Tag der Selektionen (nach 14- und 21-tägiger Behandlung mit 0,1 μ M E2) unterschieden sich die Metabolitenprofile nicht statistisch signifikant von demjenigen, der nach 24-stündiger Behandlung beobachtet wurde (Abb. 45, oben). Einzige Ausnahme stellte der Anteil an 2-HO-E2 nach 21-tägiger Behandlung dar. Dieser erhöhte sich statistisch signifikant von $0,1\% \pm 0,03\%$ auf $0,2\% \pm 0,01\%$, und somit um Faktor 2, im Vergleich zur 24-stündigen Inkubation.

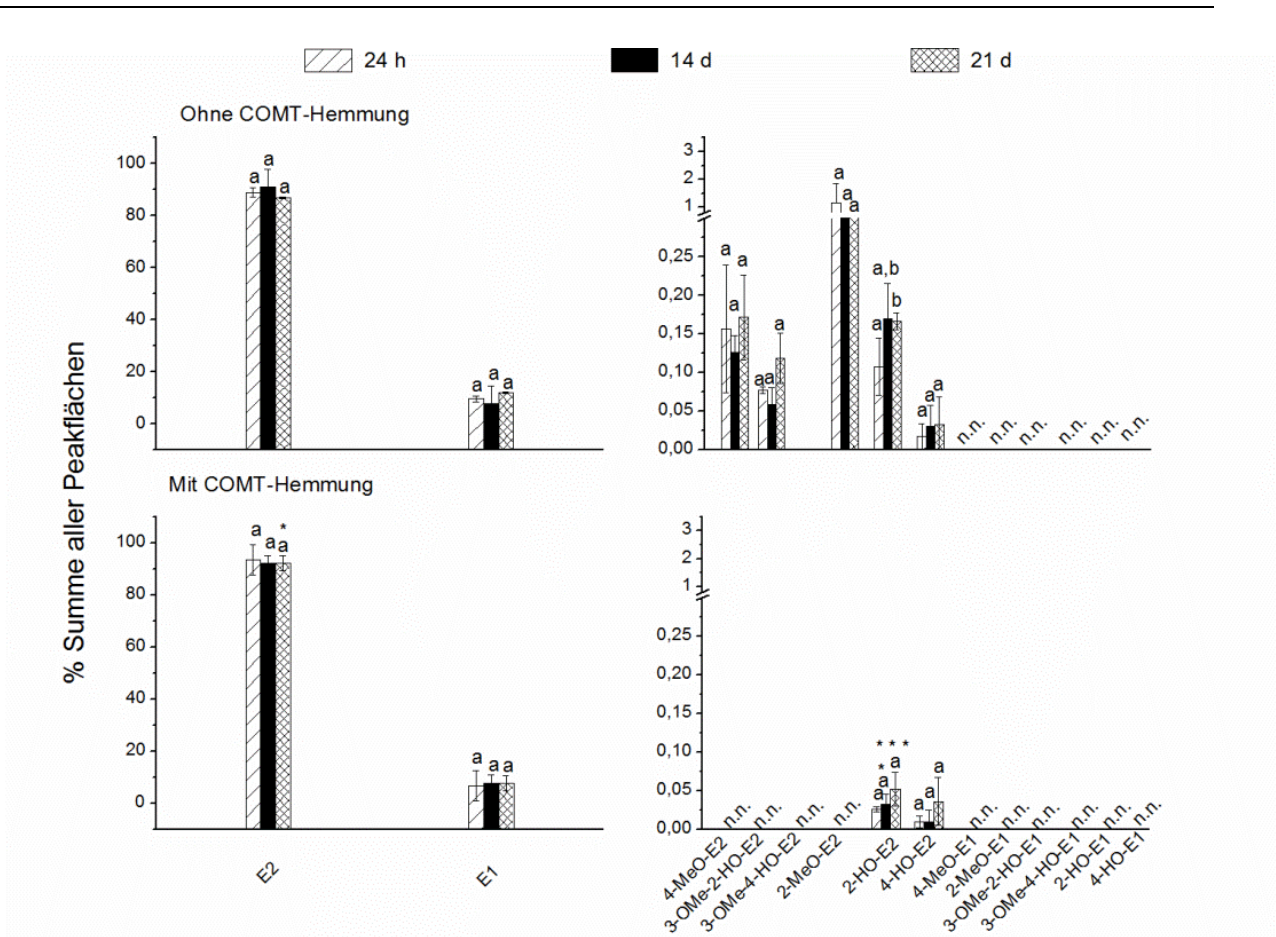


Abb. 45: Prozentuale Verteilung von E2 und E1 (links) sowie von den E2-Metaboliten (rechts) im Kulturmedium von V79 hCYP1A1-Zellen nach 24-stündiger, 14- und 21-tägiger Inkubation mit je 0,1 μM E2 sowie 0 μM des COMT-Hemmers OR-486 (oben) und 20 μM OR-486 (unten). Das Medium wurde am Tag der Selektionen gesammelt (48 h Zellkontakt). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Inkubationen, jeweils 1-fach mittels SPE aufgearbeitet und 2-fach mittels GC/MS/MS analysiert. Signifikante Unterschiede zwischen der 24-stündigen, 14- und 21-tägigen Inkubation wurden bei jedem einzelnen Analyten mittels ANOVA (Scheffé, $p < 0,05$) untersucht. Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit und ohne OR-486 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests (*: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$) ermittelt. n.n.: nicht nachgewiesen. Daten im Anhang, Tab. 57, Tab. 58 und Tab. 59.

Was die PVF von E1, E2 und dessen Metaboliten angeht, unterschieden sich diese über die gesamte Versuchsdauer nicht statistisch signifikant voneinander (Abb. 46, oben).

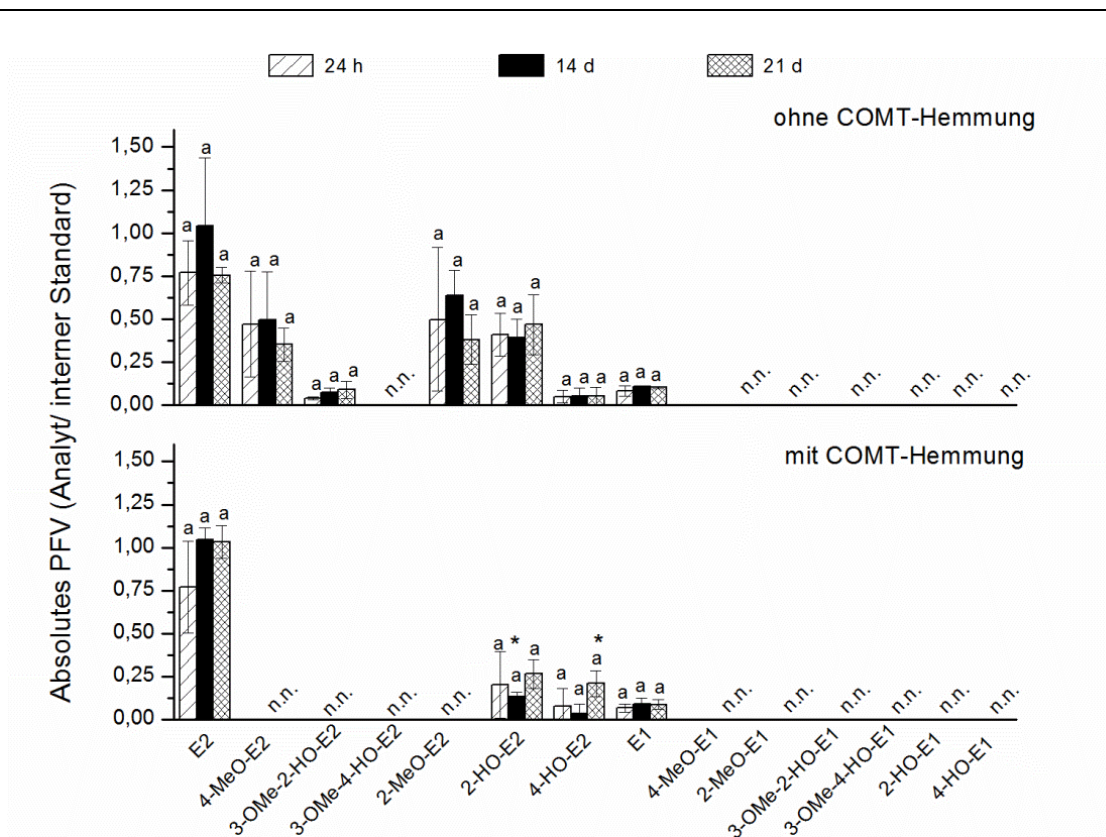


Abb. 46: Absolutes PFV von E1, E2 und dessen Metaboliten zu dem jeweiligen deuterierten internen Standard im Kulturmedium von V79 hCYP1A1-Zellen nach 24-stündiger, 14- und 21-tägiger Inkubation mit je 0,1 μM E2 sowie 0 μM des COMT-Hemmers OR-486 (oben) und 20 μM OR-486 (unten). Das Medium wurde am Tag der Selektionen gesammelt (48 h Zellkontakt). Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung von drei unabhängigen Inkubationen, jeweils 1-fach mittels SPE aufgearbeitet und 2-fach mittels GC/MS/MS analysiert. Signifikante Unterschiede zwischen der 24-stündigen, 14- und 21-tägigen Inkubation wurden bei jedem einzelnen Analyten mittels ANOVA (Scheffé, $p < 0,05$) untersucht. Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit und ohne OR-486 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests (*: $p < 0,05$) ermittelt. n.n.: nicht nachgewiesen. Daten im Anhang, Tab. 57, Tab. 58 und Tab. 59.

Einfluss der COMT-Hemmung auf das Metabolitenprofil

Nach Inhibierung der COMT-Aktivität wurden im Kulturmedium nach 24-stündiger Inkubation mit 0,1 μM E2 und am Tag der Selektionen (nach 14- und 21-tägiger Inkubation) nicht umgesetztes E2, E1, 2- und 4-HO-E2 nachgewiesen (Daten nicht dargestellt). Analog zur Inkubation mit 1 μM E2 und COMT-Hemmer waren hier über die 21-tägige Versuchsdauer keine Methylierungsprodukte nachweisbar. Somit war auch in diesem Fall von einer vollständigen Hemmung der COMT-Aktivität auszugehen. Im Vergleich zur Inkubation ohne COMT-Hemmer war folglich mit einem statistisch signifikanten Anstieg des Catechol-Anteils an der Summe aller Peakflächen zu rechnen.

Wie auch nach Inkubation 1 μM E2 und COMT-Hemmer nahm hier entgegen der Erwartung der 2-HO-E2-Anteil an der Summe aller Peakflächen von $0,1\% \pm 0,03\%$ auf $0,03\% \pm 0,003\%$ ab (Abb. 45, unten). Die Reduktion des 2-HO-E2-Anteils im Vergleich zur Inkubation ohne COMT-Hemmer war allerdings erst am Tag der Selektionen (nach 14- und 21-tägiger E2-Behandlung) statistisch signifikant. Im Vergleich hierzu unterschieden sich der 4-HO-E2- ($0,009\% \pm 0,007\%$) und der E1-Anteil ($6,6\% \pm 5,8\%$) über die 21-tägige Versuchsdauer nicht statistisch signifikant von der Inkubation ohne COMT-Inhibitor. Demgegenüber nahm der E2-Anteil nach Inhibierung der COMT-Aktivität und 21-tägiger Inkubation mit 0,1 μM E2 statistisch signifikant von $86,8\% \pm 0,2\%$ (ohne COMT-Hemmer) auf $92,2\% \pm 2,8$ (mit COMT-Hemmer) zu. Diese Zunahme, in Verbindung mit der gleichzeitigen Abnahme des 2-HO-E2-Anteils, könnte auf eine OR-486-vermittelte, partielle Inhibierung von hCYP1A1 hindeuten. Da nach Inhibierung der COMT-Aktivität und 21-tägiger Inkubation mit 1 μM E2 keine Zunahme des E2-Anteils beobachtet wurde (Kap.4.3.3), ist davon auszugehen, dass die vermutete hCYP 1A1-Inhibierung nur bei E2-Konzentrationen im nanomolaren Bereich stattfindet.

Die vermutete hCYP1A1-Inhibierung durch OR-486 könnte folgendermaßen ablaufen: hCYP1A1 oxidiert ein Teil von OR-486 und dadurch etwas weniger E2 im Vergleich zur Inkubation ohne COMT-Hemmer. Dadurch nimmt der E2-Anteil geringfügig zu und der Anteil der daraus gebildeten Catechole ab. Im Inkubationsmedium der Zellen wurde allerdings keine Untersuchung auf OR-486 Oxidationsprodukten durchgeführt, die diese These belegen würde.

Analog zur Inkubation mit COMT-Inhibitor und 1 μM E2 (Abb. 42, unten) blieb die prozentuale Metabolitenverteilung nach Inkubation mit COMT-Inhibitor und 0,1 μM E2 über die 21-tägige Versuchsdauer konstant (Abb. 45, unten).

Was die PVF von E1, E2 und dessen Metaboliten betrifft, unterschieden sich diese über die gesamte Versuchsdauer nicht statistisch signifikant voneinander (Abb. 46, unten). Im

Vergleich zur E2-Inkubation ohne COMT-Inhibitor war, bis auf das PVF von 2-HO-E2, welches am Tag der ersten Selektion (nach 14-tägiger Inkubation) abnahm, und das PVF von 4-HO-E2, welches am Tag der zweiten Selektion (nach 21-tägiger Behandlung) stieg, kein statistisch signifikanter Unterschied zu verzeichnen. Die Zunahme vom 4-HO-E2-PVF wirkte sich aber nicht auf den 4-HO-E2-Anteil an der Summe aller Peakflächen aus (Abb. 45, unten), da dieser trotz Zunahme nach COMT-Inhibierung immer noch unter 0,1% der Summe aller Peakflächen ausmachte.

4.4 Mikrokerntest

Im Gegensatz zum HPRT-Test, bei dem vorwiegend Basenpaarsubstitutionen, Leserasterverschiebungen und kleinere Deletionen detektiert werden können (Kap. 1.2.2), ist der MK-Test der einzige *in vitro* Test, der eine effiziente Detektion von aneugenem und klastogenen Substanzen ermöglicht (EFSA, 2011).

Aneugene führen zum Verlust oder Gewinn ganzer Chromosomen und Klastogene zu Chromosomen- oder Chromatidenbrüchen (Kap. 1.2.2). Wenn es dadurch zu einer irreparablen Schädigung des genetischen Materials kommt, kann dies zum Zelltod führen. In diesem Fall bleiben Mutationen im *hprt*-Lokus unerkannt und das Ergebnis des HPRT-Tests fällt folglich negativ aus.

Zur besseren Interpretation der Ergebnisse vom HPRT-Test und um herauszufinden, ob es eine Korrelation zwischen der Induktion von Genmutationen und Chromosomenmutationen gibt, wurden 2-HO-E2 und 4-HO-E2 beziehungsweise E2 auf deren Potential zur MK-Induktion in V79-Zellen beziehungsweise in V79 hCYP1A1-Zellen mit und ohne Hemmung der COMT-Aktivität untersucht. Zu diesem Zweck wurden Zellaliquote aus dem jeweiligen Ansatz vom HPRT-Test entnommen, auf Objektträger aufzentrifugiert, mit Carnoys Fixans fixiert und mit DAPI in Antifade-Lösung gefärbt (Kap. 3.2.10).

4.4.1 Induktion von Mikrokernen durch 2-HO-E2

Wie in Kap. 4.3.1 gezeigt, wurden nach Behandlung der Zellen mit $\geq 2,5 \mu\text{M}$ 2-HO-E2 2-MeO-E2, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-HO-E2 im Medium nachgewiesen, wobei 2-MeO-E2 mit einem Anteil von über 85% an der Summe aller Peakflächen den größten Anteil der detektierten Verbindungen ausmachte. Der 2-HO-E2-Anteil hingegen lag unter 0,5%.

2-MeO-E2 erwies sich nach Behandlung von V79-Zellen mit 30 natürlich vorkommenden Estrogenen und Estrogenderivaten (unter anderem E2, E1, 2-HO-E2, 4-HO-E2, 2-MeO-E2, 4-MeO-E2, 3-OMe-2-HO-E2 und 3-OMe-4-HO-E2) als der stärkste Mikrotubuli-Disruptor.

Störungen der Mitosespindel in 50% der Zellen traten bereits nach Behandlung mit 2 μM 2-MeO-E2 auf. Im Vergleich hierzu wiesen 2-HO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2 eine EC_{50} von 14 μM beziehungsweise 17 μM auf (Aizu-Yokota et al., 1995).

2-MeO-E2 stört die Mitosespindel, indem es an β -Tubulin, der Hauptkomponente der Mikrotubuli bindet, und dabei dessen Polymerisation inhibiert (D'Amato et al., 1994). 2-HO-E2 hingegen bedarf erst einer peroxidativen Aktivierung zu E2-2,3-Q, bevor es kovalent und spezifisch an der Carboxy-terminalen Region von β -Tubulin bindet (Epe et al., 1987). Eine solche Störung der Mitosespindel kann eine Induktion von Kinetochor-positiven MK zur Folge haben, welche in der ersten Mitose während oder nach der Zellbehandlung gebildet werden (Stopper et al., 1994).

Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen wurden die V79-Zellen einer 24-stündigen 2-HO-E2-Behandlung unterzogen. Da V79-Zellen eine Verdopplungszeit von 12 h aufweisen, und somit während der Behandlungsdauer 2 Mitosen durchlaufen haben, könnten durch 2-MeO-E2 induzierte, Kinetochor-positive MK nach 24 h miterfasst werden.

Die Lösungsmittelkontrolle wies eine MK-Rate von 5 MK-haltigen Zellen/ 10^3 Zellen auf (Abb. 47) und war somit nahezu identisch mit derjenigen, die Brugger et al. (2006) beobachteten (6 MK-haltige Zellen/ 10^3 Zellen).

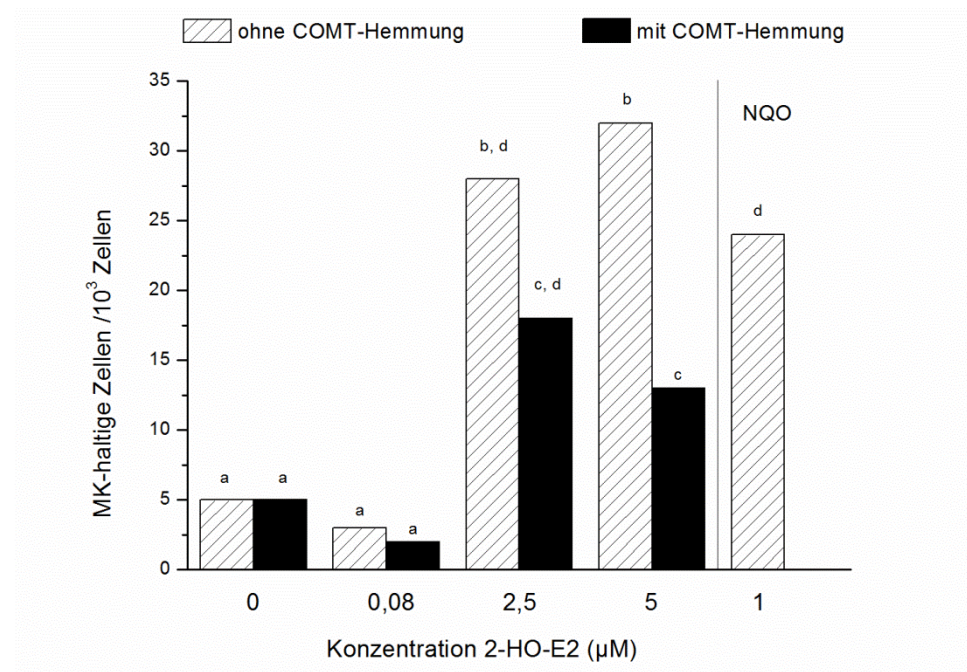


Abb. 47: MK-Induktion in V79-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 μM , Lösungsmittelkontrolle) und 2-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 (gestrichelte Balken) sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 μM OR-486 und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 2-HO-E2 (schwarze

Balken, Kap. 3.2.10). Statistisch signifikante Unterschiede zur Lösungsmittelkontrolle wurden mittels Chi-Quadrat-Test (Signifikanzniveau $p < 0,05$) ermittelt und durch unterschiedliche Buchstaben (a-d) kenntlich gemacht. Daten im Anhang, Tab. 46.

Erwartungsgemäß (Zettner et al., 2007) wurde nach 24-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit der Positivkontrolle NQO eine signifikante Erhöhung der MK-Rate (24 MK-haltige Zellen / 10^3 Zellen) im Vergleich zur Kontrollpopulation beobachtet (Abb. 47).

Die Behandlung der V79-Zellen mit 0,08-5 μM 2-HO-E2 induzierte erst ab einer Konzentration von 2,5 μM einen statistisch signifikanten Anstieg der MK-Rate um etwa Faktor 6 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (5 MK-haltige Zellen/ 10^3 Zellen). Im Vergleich zu den historischen Lösungsmittelkontrollen des Arbeitskreises Lehmann (4 - 14 MK-Zellen / 10^3 Zellen) führte die Behandlung der Zellen mit 2-HO-E2 in Konzentrationen $\geq 2,5 \mu\text{M}$ zu einer Verdopplung der MK-Rate. Eine Erhöhung der MK-Rate um Faktor ≥ 2 und < 3 wird in der Literatur als ein „schwach positives“ Ergebnis gewertet (Diaz et al., 2007). Somit wirkt 2-HO-E2 ab einer Konzentration von 2,5 μM als ein schwacher Induktor von MK in V79-Zellen. Dies könnte erklären, warum kein Anstieg der MF nach Behandlung mit 2,5 μM und 5 μM 2-HO-E2 beobachtet wurde (Kap. 4.2.1.3).

Da nach Behandlung der Zellen mit 2-HO-E2-Konzentrationen $\geq 2,5 \mu\text{M}$ hauptsächlich 2-MeO-E2 im Medium nachgewiesen wurde ($\geq 85\%$ der Summe aller Peakflächen) und dieses Metabolit ab 2 μM eine Störung der Mitosespindel hervorruft, ist die hier beobachtete MK-Induktion vermutlich auf 2-MeO-E2 zurückzuführen.

Einfluss der Hemmung der COMT auf die Induktion von Mikrokernen

Wie in Kap. 4.3.1 gezeigt, wurde nach Inhibierung der COMT-Aktivität und Inkubation mit 0,08 μM 2-HO-E2 ausschließlich 2-HO-E2 im Medium nachgewiesen. Im Gegensatz hierzu waren nach Erhöhung der 2-HO-E2-Konzentration auf 2,5 μM beziehungsweise auf 5 μM zusätzlich 2-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2 nachweisbar. Hierbei lag der Anteil an 3-OMe-2-HO-E2 bei höchstens 5% und die Anteile an 2-HO-E2 und 2-MeO-E2 bei 51% und 45% (nach Inkubation mit COMT-Hemmer und 2,5 μM 2-HO-E2) beziehungsweise bei 73% und 22% (nach Inkubation mit COMT-Hemmer und 5 μM 2-HO-E2).

Der 2-MeO-E2-Anteil unterschied sich zwar prozentual nicht statistisch signifikant im Vergleich zur Inkubation ohne Inhibitor (Kap. 4.3.1); absolut hingegen wurde weniger 2-MeO-E2 im Medium gefunden. Sollte 2-MeO-E2 für die MK-Induktion verantwortlich sein, würde dessen Abnahme möglicherweise in einer Reduktion der MK-Rate im Vergleich zu den Inkubationen ohne Inhibitor resultieren.

Die MK-Rate der Zellen, die einer 30-minütigen Inkubation mit dem COMT-Inhibitor und anschließend einer 23,5-stündigen Co-Inkubation mit 0,05% DMSO unterzogen wurden (5 MK-haltige Zellen/ 10^3 Zellen), unterschied sich nicht statistisch signifikant von derjenigen der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 47). Folglich induziert der COMT-Hemmer keine Bildung von MK in V79-Zellen.

Analog zu den Inkubationen ohne COMT-Hemmer bewirkte die Hemmung der COMT-Aktivität erst ab einer Konzentration von 2,5 μM 2-HO-E2 einen statistisch signifikanten Anstieg der MK-Rate im Vergleich zu den Zellen, die nur mit OR-486 inkubiert wurden und zur Lösungsmittelkontrolle (Abb. 47).

Beim direkten Vergleich zwischen den Inkubationen mit und ohne COMT-Hemmer fiel auf, dass die Hemmung der COMT-Aktivität ab 2,5 μM 2-HO-E2 zu einer statistisch signifikanten Abnahme der MK-Rate im Vergleich zu derjenigen der Inkubationen ohne COMT-Hemmer führte (von 28 auf 18 MK-haltige Zellen / 10^3 Zellen bei 2,5 μM und von 32 auf 13 MK-haltige Zellen / 10^3 Zellen bei 5 μM). Dieser Rückgang der MK-Rate korreliert mit der in Kap. 4.3.1 beobachteten Abnahme des PVF von 2-MeO-E2 in Anwesenheit des COMT-Inhibitors und bestätigt dadurch die Vermutung, dass 2-MeO-E2 für die MK-Induktion verantwortlich ist.

4.4.2 Induktion von Mikrokernen durch 4-HO-E2

Wie in Kap. 4.3.2 gezeigt, wurde nach Inkubation der V79-Zellen mit 4-HO-E2-Konzentrationen zwischen 5 und 40 μM sowohl nicht umgesetztes 4-HO-E2 als auch 4-MeO-E2 und 3-OMe-4-HO-E2 im Medium nachgewiesen, wobei 4-MeO-E2 mit einem Anteil von über 97% (nach Inkubation mit 5-20 μM 4-HO-E2) beziehungsweise von über 86% (nach Inkubation mit 40 μM 4-HO-E2) den größten Anteil der detektierten Verbindungen ausmachte.

4-MeO-E2 weist ab einer Konzentration von 27 μM eine Mikrotubuli-disruptive Wirkung in V79-Zellen auf (Aizu-Yokota et al., 1995). Wie in Kap. 4.4.1 und den dort zitierten Literaturquellen ausgeführt, können Störungen der Mitosespindel in einer Induktion von Kinetochor-positiven MK resultieren, welche in der ersten Mitose während oder nach der Zellbehandlung gebildet werden.

Da im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen die V79-Zellen einer 24-stündigen 4-HO-E2-Behandlung unterzogen wurden, konnten sie während der Behandlungsdauer 2 Mitosen durchlaufen. Demnach könnten durch 4-MeO-E2 induzierte, Kinetochor-positive MK nach 24 h miterfasst werden.

Die Lösungsmittelkontrolle wies eine MK-Rate von 6 MK-haltigen Zellen / 10^3 Zellen auf (Abb. 48) und stimmte zudem mit den von Brugger et al. (2006) publizierten Daten überein.

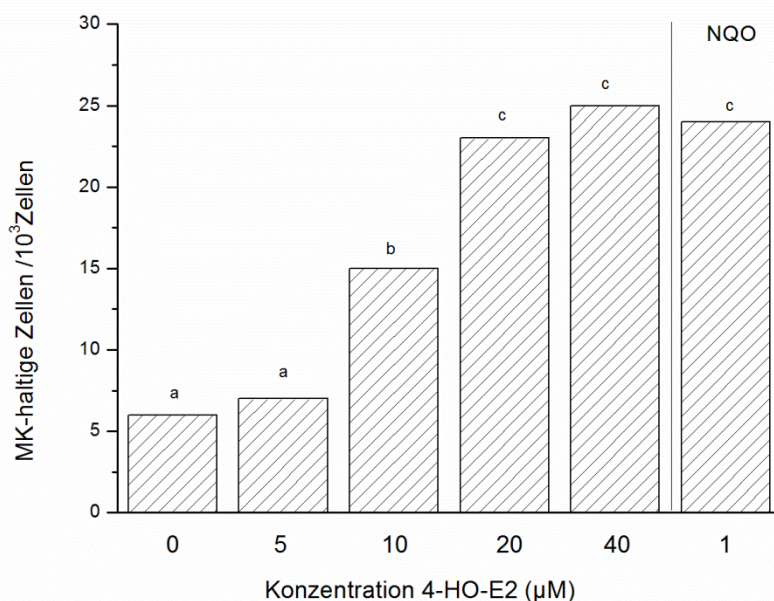


Abb. 48: MK-Induktion in V79-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle) und 4-HO-E2 (Kap. 3.2.10). Statistisch signifikante Unterschiede zur Lösungsmittelkontrolle wurden mittels Chi-Quadrat-Test (Signifikanzniveau $p < 0,05$) ermittelt und durch unterschiedliche Buchstaben (a-c) kenntlich gemacht. Daten im Anhang, Tab. 47.

Erwartungsgemäß (Zettner et al., 2007) war nach 24-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit der Positivkontrolle NQO eine signifikante Erhöhung der MK-Rate (von 6 auf 24 MK-haltige Zellen /10³ Zellen) im Vergleich zur Kontrollpopulation zu verzeichnen (Abb. 48).

In den mit 5-40 µM 4-HO-E2 behandelten V79-Zellen wurde ein konzentrationsabhängiger, ab 10 µM 4-HO-E2 auch statistisch signifikanter, Anstieg der MK-Rate im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle beobachtet (von 6 auf 15 MK-haltige Zellen /10³ Zellen bei 10 µM und von 6 auf 23 beziehungsweise auf 25 MK-haltige Zellen /10³ Zellen bei 20 µM beziehungsweise 40 µM). Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Beschreibungen von Rohnstock (2006), nach denen die Behandlung von V79-Zellen mit 4-HO-E2-Konzentrationen ≥ 6 µM die Bildung von MK induzierte.

Im Vergleich zu den historischen Lösungsmittelkontrollen des Arbeitskreises Lehmann (4 - 14 MK-Zellen /10³ Zellen) war jedoch erst ab 20 µM 4-HO-E2 ein statistisch signifikanter Anstieg der MK-Rate (um etwa Faktor 2) zu verzeichnen. Wie in Kap. 4.4.1 und den dort zitierten Literaturquellen ausgeführt, wird eine Erhöhung der MK-Rate um Faktor ≥ 2 und < 3 als ein „schwach positives“ Ergebnis gewertet. Demzufolge wirkt 4-HO-E2 ab einer Konzentration von 20 µM als ein schwacher Induktor von MK in V79-Zellen. Dies könnte

erklären, warum kein Anstieg der MF nach Behandlung mit 20 μM und 40 μM 4-HO-E2 beobachtet wurde (Kap. 4.2.2.3).

Da nach Behandlung der Zellen mit 5-40 μM 4-HO-E2 hauptsächlich 4-MeO-E2 im Medium nachgewiesen wurde ($\geq 86\%$ der Summe aller Peakflächen) und dieses Metabolit ab 27 μM eine Störung der Mitosespindel hervorruft, könnte 4-MeO-E2 für die hier beobachtete MK-Induktion verantwortlich sein.

4.4.3 Induktion von Mikrokernen durch E2

Der MK-Test mit E2 wurde in V79 hCYP1A1-Zellen durchgeführt. Aufgrund der Expression von hCYP1A1 ist diese Zelllinie in der Lage E2 zu metabolisieren. So wurden nach 24-stündiger Behandlung mit 1 μM E2 nicht umgesetztes E2, E1, 2-MeO-E2, 4-MeO-E2, 3-OMe-2-HO-E2, 4-HO-E2 und 2-HO-E2 im Kulturmedium nachgewiesen (Kap. 4.3.3). Bezogen auf die Summe aller Peakflächen machten E2 ($86,3\% \pm 1,9\%$) und E1 ($10,9\% \pm 1,5\%$) den größten Anteil aus.

E2 weist ab einer Konzentration von 10 μM eine Mikrotubuli-disruptive Wirkung in V79-Zellen auf (Aizu-Yokota et al., 1995). Es schädigt die Kinetochore und beeinträchtigt dadurch die Bindung der Spindelfaser an den Chromatiden (zusammengefasst von Metzler und Pfeiffer, 1995). Eine solche Störung des Mitosespindels geht häufig mit der Induktion von Kinetochor-positiven MK einher (Stopper et al., 1994), was sich *in vitro* am Beispiel der E2-vermittelten MK-Induktion in menschlichen peripheren Lymphozyten zeigte. Hierbei enthielten mehr als 50% der MK ganze Chromosomen (Banduhn und Obe, 1985). Auch in V79-Zellen wurden vorrangig Kinetochor-positive MK nach Behandlung mit 50-100 μM E2 gebildet (Wheeler et al., 1987; Eckert und Stopper, 1996). Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen war jedoch eine E2-vermittelte MK-Induktion aufgrund der eingesetzten Konzentration von 1 μM nicht zu erwarten.

E1 zeigt erst ab Konzentrationen über 100 μM eine Mikrotubuli-disruptive Wirkung in V79-Zellen (Aizu-Yokota et al., 1995), so dass hier eine E1-induzierte MK-Bildung auszuschließen war.

Im Hinblick auf die beobachtete Induktion von MK in V79-Zellen durch 2-HO-E2 ($\geq 2,5 \mu\text{M}$, Kap. 4.4.1) und 4-HO-E2 ($\geq 20 \mu\text{M}$, Kap. 4.4.2) war eine Catechol-vermittelte Induktion von MK nach E2-Behandlung von V79 hCYP1A1-Zellen zwar nicht auszuschließen, jedoch aufgrund des gering gebildeten Catecholanteils (jeweils unter 0,1%) eher unwahrscheinlich. Auch der geringe Anteil an 2- und 4-MeO-E2 (insgesamt unter 3%), welche vermutlich für die beobachtete MK-Induktion in V79-Zellen nach Behandlung mit 2- und 4-HO-E2 verantwortlich waren (Kap. 4.4.1 und 4.4.2), ließ keine MK-Induktion erwarten.

Die Lösungsmittelkontrolle wies eine MK-Rate von 7 MK-haltigen Zellen / 10^3 Zellen auf (Abb. 49). Demgegenüber war nach 24-stündiger Behandlung der V79 hCYP1A1-Zellen mit 1 μ M E2 eine leichte Erhöhung der MK-Rate auf 13 MK-haltige Zellen / 10^3 Zellen, und somit um etwa Faktor 2, zu verzeichnen. Diese Erhöhung war zwar statistisch signifikant, befand sich dennoch im Bereich der historischen Lösungsmittelkontrollen des Arbeitskreises Lehmann (4 - 14 MK- Zellen / 10^3 Zellen). Folglich zeigte E2 im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen keinen Einfluss auf Induktion von MK in V79 hCYP1A1-Zellen.

Einfluss der Hemmung der COMT auf die Induktion von Mikrokernen

Nach Inhibierung der COMT-Aktivität und E2-Behandlung (1 μ M) wurden nicht umgesetztes E2, E1, 2- und 4-HO-E2 im Kulturmedium nachgewiesen. Da sich die absoluten E2- und E1-Anteile nicht statistisch signifikant von denjenigen unterschieden, die bei den Inkubationen ohne COMT-Hemmer ermittelt wurden, und der Catecholanteil statistisch signifikant abnahm (Kap. 4.3.3), war hier keine MK-Induktion zu erwarten.

Die MK-Rate der Zellen, die einer 30-minütigen Inkubation mit dem COMT-Hemmer und anschließend einer 23,5-stündigen Co-Inkubation mit 0,05% DMSO unterzogen wurden (7 MK-haltige Zellen/ 10^3 Zellen), unterschied sich nicht statistisch signifikant von derjenigen der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 49). Folglich induziert der COMT-Hemmer keine Bildung von MK in V79 hCYP1A1-Zellen.

Im Vergleich zu den Zellen, die nur mit dem COMT-Hemmer inkubiert wurden, und zur Kontrollpopulation führte die Hemmung der COMT-Aktivität zu einem leichten, statistisch signifikanten Anstieg der MK-Rate (von 7 auf 17 MK-haltige Zellen/ 10^3 Zellen und somit um Faktor 2,4). Dieser Effekt war zwar ausgeprägter als bei den Inkubationen ohne COMT-Hemmer, jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 49).

Im Vergleich zu den historischen Lösungsmittelkontrollen (4 - 14 MK- Zellen / 10^3 Zellen) war die hier ermittelte MK-Rate von 17 MK-haltigen Zellen/ 10^3 Zellen nur minimal gesteigert (um Faktor 1,4). Somit führte die Inhibierung der COMT-Aktivität zu keiner Erhöhung der MK-Rate nach Behandlung von V79 hCYP1A1-Zellen mit 1 μ M E2.

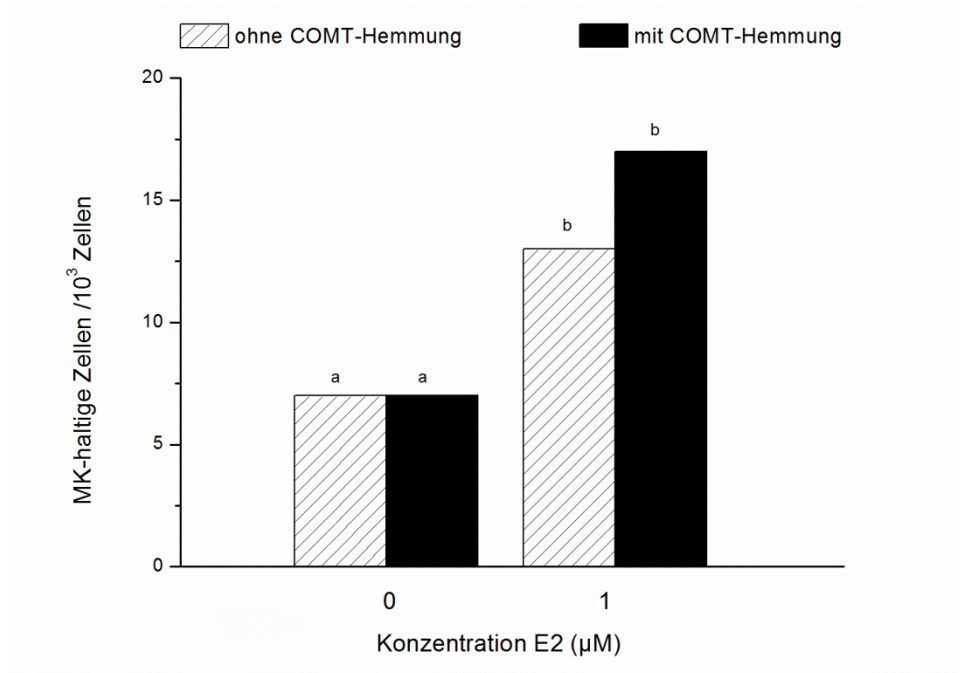


Abb. 49: Induktion von MK in V79 hCYP1A1-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle) und E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 (gestrichelte Balken) sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 µM OR-486 und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und E2 (schwarze Balken, Kap. 3.2.10). Statistisch signifikante Unterschiede zur Lösungsmittelkontrolle wurden mittels Chi-Quadrat-Test (Signifikanzniveau $p < 0,05$) ermittelt und durch unterschiedliche Buchstaben (a-b) kenntlich gemacht. Daten im Anhang, Tab. 48.

Induktion von Mikrokernen durch 0,1 µM E2

Wie in Kap. 4.3.3.1 gezeigt, wurde nach Reduktion der E2-Konzentration auf 0,1 µM das gleiche Metabolitenprofil wie nach Inkubation mit 1 µM E2 beobachtet. Da Letztere zu keiner MK-Induktion in V79 hCYP1A1-Zellen führte, war hier auch keine MK-Induktion zu erwarten.

Wie erwartet, wurde nach Behandlung mit 0,1 µM E2 kein statistisch signifikanter Unterschied der MK-Rate im Vergleich zur Kontrollpopulation (7 MK-haltige Zellen / 10³ Zellen) beobachtet (Abb. 50).

Einfluss der Hemmung der COMT auf die Induktion von Mikrokernen

Nach Inhibierung der COMT-Aktivität und Inkubation mit 0,1 µM E2 wurde das gleiche Metabolitenprofil wie nach Inkubation mit COMT-Hemmer und 1 µM E2 beobachtet (Kap. 4.3.3.1). Da Letztere zu keiner MK-Induktion in V79 hCYP1A1-Zellen führte, war hier auch keine MK-Induktion zu erwarten.

Analog zu den Inkubationen ohne COMT-Hemmer wurde nach Hemmung der COMT-Aktivität kein statistisch signifikanter Unterschied zu den Zellen, die nur mit dem COMT-Inhibitor wurden, oder zur Kontrollpopulation beobachtet (Abb. 50).

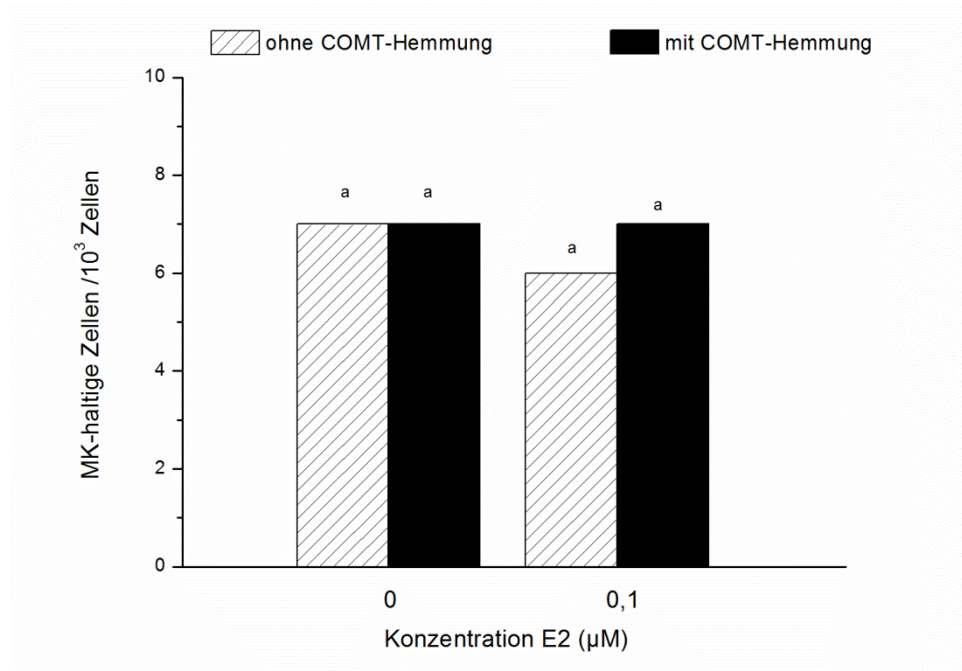


Abb. 50: Induktion von MK in V79 hCYP1A1-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle) und E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 (gestrichelte Balken) sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 µM OR-486 und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und E2 (schwarze Balken, Kap. 3.2.10). Statistisch signifikante Unterschiede zur Lösungsmittelkontrolle wurden mittels Chi-Quadrat-Test ermittelt (das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde nicht erreicht). Daten im Anhang, Tab. 48.

4.5 Zellzyklusverteilung

Für Mutagenitätstests, wie zum Beispiel der HPRT-Test oder der MK-Test, ist Zellproliferation eine unabdingbare Voraussetzung, damit genetische Schäden in Mutationen überführt werden können. Beim Vorliegen von DNA-Schäden kann die Zelle das Fortschreiten im Zellzyklus an verschiedenen Kontrollpunkten anhalten, um so das Abschließen von DNA-Reparaturmechanismen sicherzustellen. Dies kann unter anderem am G1-, S- oder G2/M-Kontrollpunkt geschehen (Kastan und Bartek, 2004). Ein solcher Arrest im Zellzyklus kann somit mit einer Störung der Zellproliferation einhergehen und dadurch die Detektion von Mutationen verhindern.

Zur besseren Interpretation der Ergebnisse vom HPRT- und vom MK-Test wurde daher die Zellzyklusverteilung bestimmt. Zu diesem Zweck wurde 1 Million Zellen aus dem jeweiligen

HPRT-Ansatz nach 24-stündiger Substanzbehandlung entnommen, mit Ethanol fixiert und die DNA mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Die Fluoreszenzintensität der angefärbten DNA wurde anschließend durchflusszytometrisch vermessen (Kap. 3.2.11).

In Anbetracht der Verdopplungszeit von V79-Zellen (12 h) war jedoch zu berücksichtigen, dass nach 24 h ein eventuell aufgetretener Zellzyklusarrest wieder aufgehoben sein könnte und somit unerkant bleiben würde.

4.5.1 Einfluss von 2-HO-E2 auf den Zellzyklus

Wie in Kap. 4.3.1 gezeigt, wurden nach Behandlung der Zellen mit $\geq 2,5 \mu\text{M}$ 2-HO-E2, 2-MeO-E2, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-HO-E2 im Kulturmedium nachgewiesen, wobei 2-MeO-E2 mit einem Anteil von über 85% (bezogen auf die Summe aller Peakflächen) den größten Anteil der detektierten Verbindungen ausmachte.

Aufgrund seiner stark Mikrotubuli-disruptiven Wirkung inhibiert 2-MeO-E2 ab $1 \mu\text{M}$ die Mitose in einer Vielzahl verschiedener Zelllinien, wie zum Beispiel SHE-Zellen, Rattenfibroblasten, humanen Leukämiezellen, human vaskulären glatten Muskelzellen oder MCF-7-Zellen und führt dadurch zu einem Arrest in dieser Zellzyklusphase (Attalla et al., 1996; Tsutsui et al., 2000a; Gui und Zheng, 2006; Kamath et al., 2006). Da 2-MeO-E2 als Hauptmetabolit im Kulturmedium nachgewiesen wurde, war eventuell mit einem Arrest in der G2/M-Phase zu rechnen.

Nach 24-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit 0,05% DMSO (Lösungsmittelkontrolle) befanden sich $48,5\% \pm 2,5\%$ der Zellen in der G1/G0-, $32,0\% \pm 2,2\%$ in der S- und $19,6\% \pm 0,4\%$ in der G2/M-Phase (Abb. 51). Eine ähnliche Zellzyklusverteilung ($51,5\% \pm 1,2\%$ Zellen in der G1/G0-, $24,75\% \pm 3,2\%$ in der S- und $23,7\% \pm 3,6\%$ in G2/M-Phase) wurde von Schuhmacher et al. (2005) für unbehandelte V79-Zellen publiziert.

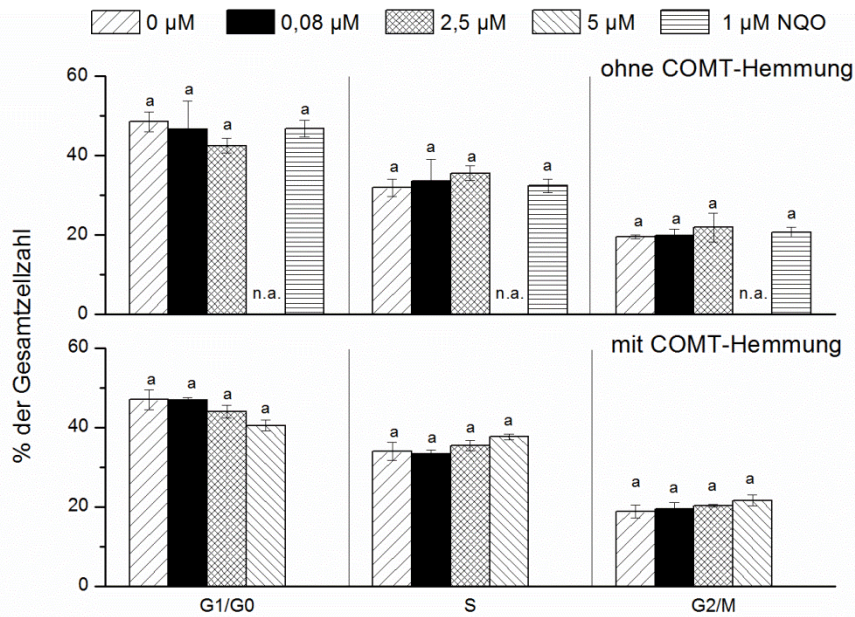


Abb. 51: Einfluss von 2-HO-E2 auf die Zellzyklusverteilung von V79-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle) und 2-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 (oben) sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 µM OR-486 und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 2-HO-E2 (unten). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Bestimmungen. Signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen wurden bei jeder einzelnen Zellzyklusphase mittels ANOVA (Scheffé, $p < 0,05$) untersucht und sind mit unterschiedlichen Buchstaben kenntlich gemacht. Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit und ohne OR-486 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests ermittelt (das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde nicht erreicht). n.a.: nicht auswertbar. Daten im Anhang, Tab. 49.

Erwartungsgemäß (Schumacher et al., 2005) hatte die Positivkontrolle NQO keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung (Abb. 51).

Nach Behandlung mit 0,08 -2,5 µM 2-HO-E2 war zwar kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollpopulation zu verzeichnen (Abb. 51); der Anteil der Zellen in der G1/G0-Phase nahm jedoch mit steigender Konzentration leicht ab und derjenige in der S- und der G2/M-Phase leicht zu. Dieser konzentrationsabhängige Trend könnte darauf hindeuten, dass die Behandlung mit 2-HO-E2 einen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung in V79-Zellen hatte.

2-HO-E2 war ab einer Konzentration von 5 µM so stark zytotoxisch, dass keine Bestimmung der Zellzyklusverteilung mehr möglich war. Dies steht im Einklang mit dem beobachteten Rückgang der PE1 bei 5 µM auf $0,05 \pm 0,01$ (entspricht $6,4\% \pm 1,9\%$ relativ zur Kontrollpopulation, Kap.4.2.1.1).

Dass im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen kein Arrest in der G2/M-Phase beobachtet wurde, könnte, wie zuvor erwähnt, daran liegen, dass ein eventuell eingetretener Arrest nach 24 h wieder aufgehoben sein kann und dadurch unerkant bleibt. Sollte dies der Fall gewesen sein, könnte es je nach Dauer des vermutlichen Arrests beispielsweise Auswirkungen auf die Detektion von MK gehabt haben, da mutierte Zellen, die zum Zeitpunkt der Zellzyklusbestimmung die Mitose aufgrund eines zuvor stattgefundenen Arrests noch nicht vollendet hatten, kein MK nach 24 h aufwiesen. Dies könnte dazu beigetragen haben, dass nach Behandlung von V79-Zellen mit 2,5 μM und 5 μM 2-HO-E2 lediglich eine schwache statt einer starken MK-Induktion festgestellt wurde (Kap. 4.4.1).

Was die Detektion von Mutationen im *hprt*-Lokus betrifft, dürfte ein reversibler Zellzyklusarrest keine bedeutende Auswirkung auf die MF haben, da die Zellen vor der Mutantenselektion einer 5-tägigen substanzfreien Nachinkubation unterzogen werden. Während dieser Zeit würde sich ein reversibler Arrest wieder auflösen.

Einfluss der Hemmung der COMT auf den Zellzyklus

Wie in Kap. 4.3.1 gezeigt, wurde nach Inkubation mit 2,5 μM beziehungsweise 5 μM 2-HO-E2 trotz Inhibierung der COMT-Aktivität 2-MeO-E2 zu 45% beziehungsweise 22% (bezogen auf die Summe aller Peakflächen) im Kulturmedium nachgewiesen. Im Vergleich hierzu war der 2-MeO-E2-Anteil bei den Inkubationen ohne COMT-Hemmer viel höher ($\geq 86\%$), führte dennoch zu keinem Zellzyklusarrest. Folglich war nach Hemmung der COMT-Aktivität ebenfalls kein Arrest zu erwarten.

Die Zellzyklusverteilung der Zellen, die einer 30-minütigen Inkubation mit 20 μM OR-486 und anschließend einer 23,5-stündigen Co-Inkubation mit 0,05% DMSO unterzogen wurden, unterschied sich nicht statistisch signifikant von derjenigen der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 51). Somit hat der COMT-Hemmer keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung von V79-Zellen.

Nach Coinkubation der Zellen mit 0,08 μM - 5 μM 2-HO-E2 und OR-486 wurde zwar kein statistisch signifikanter Unterschied der Zellzyklusverteilung im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit OR-486 beobachtet; der Anteil der Zellen in der G1/G0-Phase nahm jedoch mit steigender Konzentration leicht ab und derjenige in der S- und der G2/M-Phase leicht zu (Abb. 51). Dieser konzentrationsabhängige Trend wurde auch bei den Inkubationen ohne Hemmer beobachtet und könnte, wie zuvor erklärt, darauf hindeuten, dass die Hemmung der COMT-Aktivität und anschließende 2-HO-E2-Behandlung einen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung hatten. Eine Aussage darüber, ob es sich hierbei um einen Arrest handelte, ist jedoch nicht möglich, da sich ein Zellzyklusarrest nach 24 h wieder auflösen kann und dadurch unerkant bleibt.

Beim direkten Vergleich zwischen den Inkubationen mit und denjenigen ohne COMT-Hemmer war im Konzentrationsbereich 0,08 - 2,5 μM 2-HO-E2 kein statistisch signifikanter Unterschied der Zellzyklusverteilung zu verzeichnen. Im Gegensatz zur alleinigen Inkubation mit 5 μM 2-HO-E2, die so stark zytotoxisch auf die Zellen wirkte, dass keine Bestimmung der Zellzyklusverteilung mehr möglich war, wurde nach Hemmung der COMT-Aktivität bei derselben 2-HO-E2-Konzentration eine Zellzyklusverteilung beobachtet, die sich nicht statistisch signifikant von derjenigen der Lösungsmittelkontrolle unterschied. Dieser Effekt deckt sich mit der in Kap. 4.2.1.1 beschriebenen Zunahme der PE1 bei Inkubation mit OR-486 und 5 μM 2-HO-E2 ($0,64 \pm 0,08$, Abb. 22) im Vergleich zur Inkubation ohne OR-486 ($0,05 \pm 0,01$) und ist als weiteres Indiz dafür zu werten, dass 2-HO-E2 in Anwesenheit des COMT-Inhibitors eine viel schwächere Zytotoxizität auf V79-Zellen aufweist.

4.5.2 Einfluss von 4-HO-E2 auf den Zellzyklus

Wie in Kap. 4.3.2 gezeigt, wurden nach Behandlung der Zellen mit 5 - 40 μM 4-HO-E2 4-MeO-E2, 3-OMe-4-HO-E2 und 4-HO-E2 im Kulturmedium nachgewiesen, wobei 4-MeO-E2 mit einem Anteil von über 97% (nach Inkubation mit 5-20 μM 4-HO-E2) beziehungsweise von über 86% (nach Inkubation mit 40 μM 4-HO-E2) den größten Anteil der detektierten Verbindungen ausmachte.

4-MeO-E2 weist ab einer Konzentration von 27 μM eine Mikrotubuli-disruptive Wirkung in V79-Zellen auf (Aizu-Yokota et al., 1995). Substanzen, die die Stabilität der Mikrotubuli beeinflussen, aktivieren den Spindel-Kontrollpunkt und führen dadurch zu einem Mitosearrest (Jordan et al., 1992; Gorbsky, 1997; Bekier et al., 2009). Folglich war ein 4-MeO-E2-induzierter Arrest nach Behandlung mit 40 μM 4-HO-E2 möglich; im Konzentrationsbereich 5 – 20 μM hingegen war mit einem solchen Effekt aufgrund der niedrigen 4-MeO-E2-Konzentration nicht zu rechnen.

Ein Arrest in der G2/M-Phase kann aber auch durch die Entstehung von DNA-Strangbrüchen in der späten Phase der Replikation ausgelöst werden (Kaufmann und Paules, 1996). Im Kulturmedium wurde neben 4-MeO-E2 auch 4-HO-E2 nachgewiesen, welcher Strangbrüche in V79-Zellen ab einer Konzentration von 25 μM induziert (Gerstner et al., 2008). Da der 4-HO-E2-Anteil im Kulturmedium (bezogen auf die Summe aller Peakflächen) unter 1% (nach Inkubation mit 5 – 20 μM 4-HO-E2) beziehungsweise unter 7% (nach Inkubation mit 40 μM 4-HO-E2) lag, war im gesamten getesteten Konzentrationsbereich mit keinem Zellzyklusarrest zu rechnen.

Die Zellzyklusverteilung nach 24-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit 0,05% DMSO ($48,2\% \pm 2,6\%$ der Zellen in der G1/G0-, $32,2\% \pm 2,5\%$ in der S- und $19,6\% \pm 0,4\%$ in der

G2/M-Phase, Abb. 51) stimmte mit derjenigen, die Schuhmacher et al. (2005) beobachtete, überein.

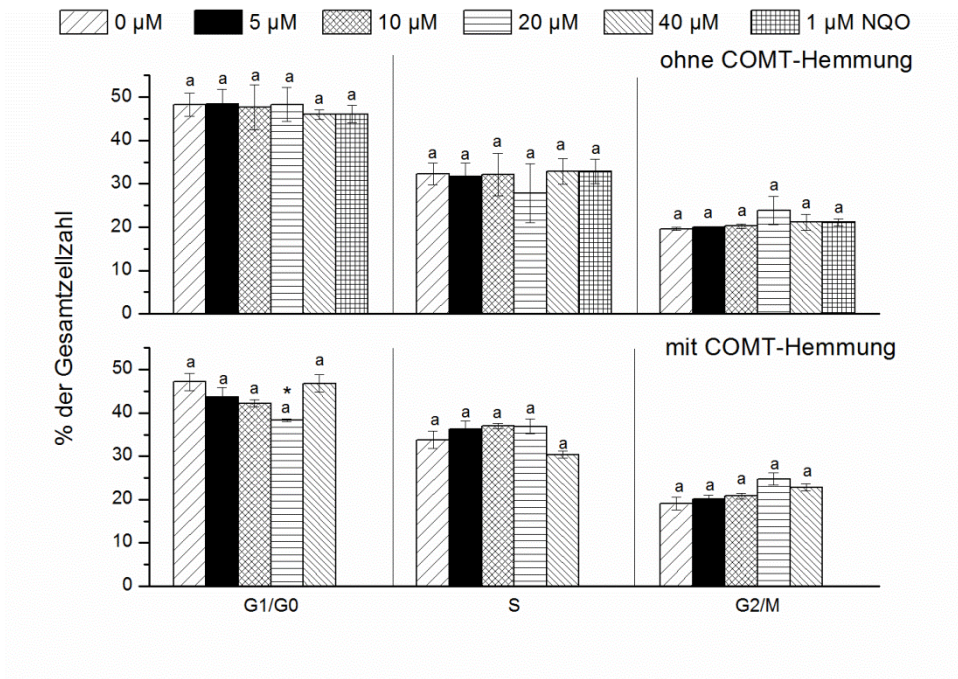


Abb. 52: Einfluss von 4-HO-E2 auf die Zellzyklusverteilung von V79-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle) und 2-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 (oben) sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 µM OR-486 und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 4-HO-E2 (unten). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Bestimmungen. Signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen wurden bei jeder einzelnen Zellzyklusphase mittels ANOVA (Scheffé, $p < 0,05$) untersucht und sind mit unterschiedlichen Buchstaben kenntlich gemacht. Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit und ohne OR-486 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests ermittelt (das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde nicht erreicht). n.a.: nicht auswertbar. Daten im Anhang, Tab. 51.

Wie erwartet (Schumacher et al., 2005) hatte die Positivkontrolle NQO keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung.

Über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich (5 - 40 μM) wurde nach 24-stündiger Inkubation mit 4-HO-E2 ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollpopulation beobachtet (Abb. 51). Da keine Anzeichen für einen Zellzyklusarrest vorlagen, war von einer sicheren Detektion von Mutationen im MK-Test und im HPRT-Test auszugehen.

Einfluss der COMT-Hemmung auf die Zellzyklusverteilung

Wie in Kap. 4.3.2 gezeigt, wurde nach Inhibierung der COMT-Aktivität und Behandlung der V79-Zellen mit 4-HO-E2 über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich (5 - 40 μM) ausschließlich 4-HO-E2 im Kulturmedium nachgewiesen.

4-HO-E2 weist ab einer Konzentration von 25 μM eine Mikrotubuli-disruptive Wirkung in V79-Zellen auf (Aizu-Yokota et al., 1995). Demnach war ein daraus resultierender Mitosearrest nach Zellinkubation mit 40 μM 4-HO-E2 möglich; im Bereich 5 – 20 μM hingegen aufgrund der geringen 4-HO-E2-Konzentration unwahrscheinlich.

Die Zellzyklusverteilung der Zellen, die einer 30-minütigen Inkubation mit 20 μM OR-486 und anschließend einer 23,5-stündigen Co-Inkubation mit 0,05% DMSO unterzogen wurden, unterschied sich nicht statistisch signifikant von derjenigen der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 51). Somit hat der COMT-Hemmer keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung von V79-Zellen.

Nach Coinkubation der Zellen mit 5 μM - 40 μM 4-HO-E2 und OR-486 wurde zwar kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit OR-486 beobachtet; der Anteil der Zellen in der G1/G0-Phase nahm jedoch mit steigender Konzentration im Bereich 5 - 20 μM leicht ab und derjenige in der S- und der G2/M-Phase leicht zu (Abb. 52). Dieser konzentrationsabhängige Trend könnte darauf hindeuten, dass die Hemmung der COMT-Aktivität und anschließende 4-HO-E2-Behandlung einen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung hatten. Im Hinblick auf die 4-HO-E2-Wirkkonzentration für eine Mikrotubuli-disruptive Wirkung beziehungsweise für die Induktion von DNA-Strangbrüchen war jedoch ein Mitosearrest beziehungsweise ein G2/M-Arrest erst ab einer Konzentration von 40 μM vorstellbar.

Beim direkten Vergleich zwischen den Inkubationen mit und denjenigen ohne COMT-Hemmer war über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich kein statistisch signifikanter Unterschied der Zellzyklusverteilung zu verzeichnen. Einzige Ausnahme stellte die Inkubation mit OR-486 und 20 μM 4-HO-E2 dar. Hier war die Standardabweichung so

gering (0,8% relativ), dass der Unterschied des prozentualen Zellanteils in der G1/G0-Phase ($38,4\% \pm 0,3\%$, Tab. 52) zur Inkubation ohne OR-486 statisch signifikant ausfiel. Da aber der prozentuale Zellanteil in keiner der anderen Zellzyklusphasen signifikant im Vergleich zur Kontrollpopulation zunahm, ist hier nicht von einem Arrest im Zellzyklus auszugehen. Wie zuvor erwähnt, war bei dieser Konzentration auch kein Arrest zu erwarten beziehungsweise würde ein eventuell aufgetretener Arrest aufgrund der langen Inkubationszeit, die zwei Zellpopulationsverdopplungszeiten entspricht, höchstwahrscheinlich nicht miterfasst werden.

4.5.3 Einfluss von E2 auf den Zellzyklus

Wie in Kap. 4.3.3 gezeigt, wurden nach 24-stündiger Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ E2 nicht umgesetztes E2, E1, 2-HO-E2 und 4-HO-E2 sowie die Methylierungsprodukte 2-MeO-E2, 4-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2 im Kulturmedium nachgewiesen. Hierbei machten E2 mit über 86% und E1 mit über 10% (bezogen auf die Summe aller Peakflächen) den größten Anteil der detektierten Verbindungen aus.

E2 weist ab einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ und E1 erst ab Konzentrationen über $100 \mu\text{M}$ eine Mikrotubuli-disruptive Wirkung in V79-Zellen auf (Aizu-Yokota et al., 1995). Demnach war ein daraus resultierender Mitosearrest nach Behandlung mit $1 \mu\text{M}$ E2 aufgrund der geringen Konzentration unwahrscheinlich.

Die beobachtete Zellzyklusverteilung nach 24-stündiger Behandlung von V79 hCYP1A1-Zellen mit 0,05% DMSO ($45,7\% \pm 3,5\%$ der Zellen in der G1/G0-, $34,0\% \pm 1,8\%$ in der S- und $20,3\% \pm 1,8\%$ in der G2/M-Phase, Abb. 53) ähnelte stark derjenigen von DMSO-behandelten V79-Zellen (Kap. 4.5.1 und 4.5.2) und steht im Einklang mit den publizierten Ergebnissen von Schuhmacher et al. (2005).

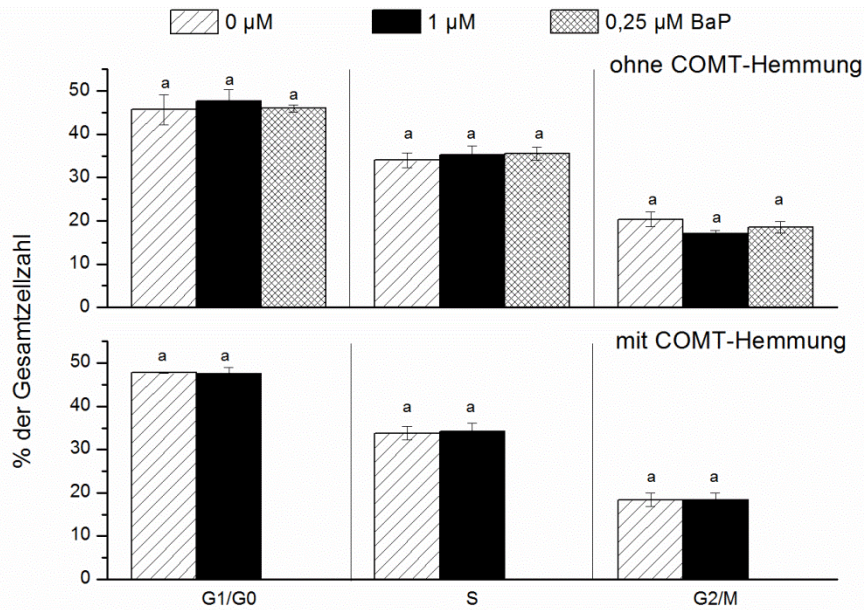


Abb. 53: Einfluss von E2 auf die Zellzyklusverteilung von V79 hCYP1A1-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit BaP beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 μ M, Lösungsmittelkontrolle) und 1 μ M E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 (oben) und mit 20 μ M OR-486 (unten). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Bestimmungen. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und den Behandlungsgruppen bei den Inkubationen ohne OR-486 wurden bei jeder einzelnen Zellzyklusphase mittels ANOVA (Scheffé, $p < 0,05$) untersucht und sind mit unterschiedlichen Buchstaben kenntlich gemacht. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe bei den Inkubationen mit OR-486 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests ermittelt ($p < 0,05$) und mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit und ohne OR-486 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests ermittelt (das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde nicht erreicht). Daten im Anhang, Tab. 53.

Weder nach Behandlung mit der Positivkontrolle BaP noch mit 1 μ M E2 war ein statistisch signifikanter Unterschied der Zellzyklusverteilung im Vergleich zur Kontrollpopulation zu verzeichnen (Abb. 53).

Einfluss der COMT-Hemmung auf die Zellzyklusverteilung

Wie im Kap. 4.3.3 gezeigt, wurden nach Hemmung der COMT-Aktivität und Inkubation von V79 hCYP1A1-Zellen mit 1 μ M E2 nicht umgesetztes E2, E1, 2- und 4-HO-E2 im Kulturmedium nachgewiesen. Hierbei machten E2 mit über 91% und E2 mit über 8% (bezogen auf die Summe aller Peakflächen) den größten Anteil der detektierten Verbindungen aus. Da sich die Metabolitenprofile zwischen den Inkubationen mit und denjenigen ohne Hemmer nicht signifikant voneinander unterschieden und ohne Inhibierung

der COMT-Aktivität kein Einfluss auf die Zellzyklusverteilung festgestellt wurde, war auch nach Hemmung der COMT-Aktivität kein Einfluss der Zellzyklusverteilung zu erwarten.

Die Zellzyklusverteilung der Zellen, die einer 30-minütigen Inkubation mit 20 µM OR-486 und anschließend einer 23,5-stündigen Co-Inkubation mit 0,05% DMSO unterzogen wurden, unterschied sich nicht statistisch signifikant von derjenigen der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 53). Analog zu den Versuchen in V79-Zellen (Kap. 4.5.1 und 4.5.2) zeigte der COMT-Inhibitor keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung von V79 hCYP1A1-Zellen.

Nach Coinkubation der Zellen mit OR-486 und 1 µM E2 wurde kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit OR-486 beobachtet (Abb. 53).

Auch zwischen den Inkubationen mit und denjenigen ohne COMT-Inhibitor war kein statistisch signifikanter Unterschied der Zellzyklusverteilung zu verzeichnen.

Die Reduktion der E2-Behandlungskonzentration von 1 µM auf 0,1 µM hatte keine Auswirkungen auf die beobachteten Ergebnisse (Abb. 54). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die 24-stündige Inkubation von V79 hCYP1A1-Zellen mit 0,1 und 1 µM E2, sowohl mit als auch ohne Hemmung der COMT-Aktivität, keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung zeigte. Somit war von einer sicheren Detektion von Mutationen im MK-Test und im HPRT-Test auszugehen.

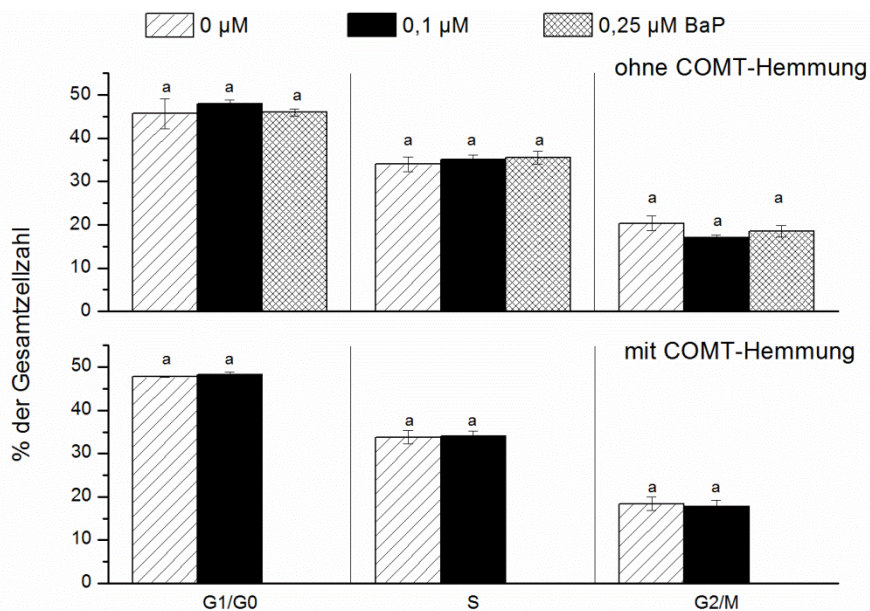


Abb. 54: Einfluss von E2 auf die Zellzyklusverteilung von V79 hCYP1A1-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit BaP beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle)

und 0,1 μM E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 (oben) und mit 20 μM OR-486 (unten). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Bestimmungen. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und den Behandlungsgruppen bei den Inkubationen ohne OR-486 wurden bei jeder einzelnen Zellzyklusphase mittels ANOVA (Scheffé, $p < 0,05$) untersucht und sind mit unterschiedlichen Buchstaben kenntlich gemacht. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe bei den Inkubationen mit OR-486 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests ermittelt ($p < 0,05$) und mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationen mit und ohne OR-486 wurden mittels eines unabhängigen t-Tests ermittelt (das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde nicht erreicht). Daten im Anhang, Tab. 53.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität auf die Mutagenität von 17β -Estradiol und dessen Catecholestrogenen untersucht. Zu diesem Zweck wurden der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Test und der Mikrokern-Test eingesetzt. Die Untersuchungen erfolgten in kultivierten Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters (V79-Zellen) und in V79-Zellen, die mit humanem Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenase Isoenzym 1A1 transfiziert wurden. Begleitend zu den Mutagenitätsuntersuchungen wurde das Metabolitenprofil der Testsubstanzen anhand von Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie bestimmt.

Vor Beginn des Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Tests sollten die Zelllinien hinsichtlich ihrer Koloniebildungsfähigkeit und Spontanmutantenfrequenz charakterisiert werden. Die Charakterisierung der V79-Zellen und der V79-Zellen, die mit humanem Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenase Isoenzym 1A1 transfiziert wurden, erfolgte im Rahmen einer anderen Arbeit. Beide Zelllinien wiesen eine Koloniebildungsfähigkeit von mindestens 0,7 und eine Spontanmutantenfrequenz zwischen 1 und 20 auf. Somit erwiesen sie sich als geeignet für die Verwendung im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Test. Die V79-Zellen, die mit humanem Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenase Isoenzym 1B1 transfiziert wurden, wiesen zwar eine ausreichend hohe Koloniebildungsfähigkeit (0,7-0,8), dennoch schwankte ihre Spontanmutantenfrequenz sehr stark (7-108). Folglich waren sie für die Verwendung im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Test nicht geeignet.

Ferner sollte bestimmt werden, ob die Testsubstanzen und deren Metabolite im Medium oder in den Zellen nachweisbar sind. Nach Behandlung von V79-Zellen mit 2-Hydroxyestradiol wurden, sowohl in den Zellen als auch im zellhaltigen und -freien Kulturmedium der behandelten Zellen, nicht umgesetztes 2-Hydroxyestradiol, 2-Methoxyestradiol und 3-OMethyl-2-Hydroxyestradiol nachgewiesen. Da sich die Metabolitenprofile im zellhaltigen und -freien Medium nicht statistisch signifikant voneinander unterschieden, wurde zur Untersuchung des Metabolitenprofils von 17β -Estradiol und dessen Catecholestrogenen nur das Kulturmedium aufgearbeitet.

Für die Festphasenextraktion wurden 5 ml Kulturmedium eingesetzt, da dieses Volumen bei der gaschromatographischen/massenspektrometrischen Analyse ein Signal-Rausch-Verhältnis zwischen 250 und 7804 ergab, welches sich bei Aufarbeitung von größeren Volumina nicht signifikant steigern ließ.

Zur Quantifizierung von 4-Hydroxyestradiol und dessen Methylcatecholen diente ein Standardgemisch aus 2-Hydroxy-, 2-Methoxy- und 3-OMethyl-2-Hydroxyestradiol und zur Quantifizierung von 2-Hydroxyestradiol und dessen Methylcatecholen eins aus 4-Hydroxy-, 4-Methoxy- und 3-OMethyl-4-Hydroxyestradiol. Die Synthese dieser Standardgemische erfolgte durch Umsetzung von 2- beziehungsweise 4-Hydroxyestradiol mit cytosolischer Catechol-O-Methyltransferase aus Leber von Sprague Dawley-Ratten.

Zur Quantifizierung von 17β -Estradiol und dessen Metaboliten wurde ein Standardgemisch aus jeweils deuteriertem 17β -Estradiol, 2-Hydroxy-, 3-OMethyl-2-Hydroxy-, 2- und 4-Methoxyestradiol verwendet, welches im Arbeitskreis Lehmann, jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit, auf enzymatischem Wege ausgehend von dreifach deuteriertem 17β -Estradiol synthetisiert wurde.

Die Wiederfindungsraten der einzelnen Standardkomponenten lagen zwischen $4,1\% \pm 0,8\%$ und $24\% \pm 2\%$ und wiesen somit auf hohe Analytverluste bei der Festphasenextraktion hin. Dies wurde in den nachfolgenden Versuchen bei der Zudotierung der Proben mit internem Standardgemisch berücksichtigt.

Da die Inkubation mit $20\ \mu\text{M}$ 3,5-Dinitrocatechol eine 13,6-fache Erhöhung der prozentualen Menge an freiem 2-Hydroxyestradiol im Vergleich zur Kontrollpopulation bewirkte, ohne dabei die Zellzahl oder die Koloniebildungsfähigkeit statistisch signifikant zu reduzieren, wurde diese Konzentration zur Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität eingesetzt.

Nach Inkubation mit $0,08\ \mu\text{M}$ 2-Hydroxyestradiol wurde dieses vollständig zu 2-Methoxyestradiol und 3-OMethyl-2-Hydroxyestradiol umgesetzt; ab $2,5\ \mu\text{M}$ hingegen war zusätzlich 2-Hydroxyestradiol im Medium nachweisbar. Demnach war die Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität bei der Inkubation mit $0,08\ \mu\text{M}$ 2-Hydroxyestradiol vollständig und ab $2,5\ \mu\text{M}$ partiell. Mit und ohne Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität war 2-Methoxyestradiol der Hauptmetabolit.

2-Hydroxyestradiol induzierte im Konzentrationsbereich $0,08\ \mu\text{M}$ - $5\ \mu\text{M}$, mit und ohne Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität, keine Erhöhung der Mutantenfrequenz im *hprt*-Lokus von V79-Zellen. Im Gegensatz hierzu induzierte 2-Hydroxyestradiol ab $2,5\ \mu\text{M}$, mit und ohne Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität, mindestens eine Verdreifachung der Mikrokernrate im Vergleich zur Kontrollpopulation, wobei dieser Effekt ohne Inhibierung der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität stärker ausgeprägt war.

Über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich (5-40 μM) wurde 4-Hydroxyestradiol hauptsächlich zu 4-Methoxyestradiol und 3-OMethyl-4-Hydroxyestradiol umgesetzt, wobei Ersteres den größten Anteil der detektierten Verbindungen ($\geq 86\%$) ausmachte. Nach der Behandlung mit 3,5-Dinitrocatechol waren keine Methylierungsprodukte mehr nachweisbar, weswegen von einer vollständigen Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität im gesamten getesteten Konzentrationsbereich auszugehen war.

4-Hydroxyestradiol induzierte über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich keine Genmutationen im *hprt*-Lokus. Erst nach Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität und Behandlung mit 20 μM 4-Hydroxyestradiol wurde eine Verdreifachung der Mutantenfrequenz im Vergleich zur Kontrollpopulation beobachtet. Mit und ohne Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität induzierte 4-Hydroxyestradiol ab 20 μM eine Verdopplung der Mikrokernrate im Vergleich zur Kontrollpopulation.

Im Kulturmedium der V79-Zellen, die mit humanem Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenase Isoenzym 1A1 transfiziert und mit 0,1 und 1 μM 17 β -Estradiol für bis zu drei Wochen behandelt wurden, waren über die gesamte Versuchsdauer nicht umgesetztes 17 β -Estradiol, Estron, 2- und 4-Hydroxy-, 2-Methoxy-, 4-Methoxy- und 3-OMethyl-2-Hydroxyestradiol nachweisbar. Hierbei machten 17 β -Estradiol mit über 86% und Estron mit über 10% (bezogen auf die Summe aller Peakflächen) den größten Anteil der detektierten Verbindungen aus. Wie erwartet, waren nach Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität keine Methylierungsprodukte mehr nachweisbar.

Die durchgehende, zwei- und dreiwöchige Behandlung mit jeweils 0,1 und 1 μM 17 β -Estradiol bewirkte keine Induktion von Genmutationen im *hprt*-Lokus. Demgegenüber erhöhte sich die Mutantenfrequenz nach Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität und dreiwöchiger Behandlung mit 0,1 μM 17 β -Estradiol um Faktor 4 im Vergleich zur Kontrollpopulation. Was die Mikrokerninduktion betrifft, so wurde nach 24-stündiger Inkubation mit 0,1 und 1 μM 17 β -Estradiol, mit und ohne Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität, keine Erhöhung der Mikrokernrate im Vergleich zur Kontrollpopulation beobachtet.

Über die gesamte Dauer der Mutagenitätstests von 17 β -Estradiol und dessen Catecholestrogenen unterschieden sich die Zellzyklusverteilung, die Wachstumskurven und die Koloniebildungsfähigkeit zum Zeitpunkt der Selektion, mit und ohne Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität, nicht statistisch signifikant von denjenigen der Kontrollpopulationen. Demnach war von einer sicheren Detektion von Mutationen im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase- und im Mikrokerntest auszugehen.

Zusammenfassend bestätigen die durchgeführten Untersuchungen, dass die zelluläre Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität eine essentielle Rolle zur Entgiftung mutagener Catecholestrogene spielt. Eine hundertprozentige Inhibierung der Aktivität dieses Enzyms führt zur Induktion von Genmutationen durch 4-Hydroxyestradiol in V79-Zellen ohne Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase Aktivität und durch 17 β -Estradiol in V79-Zellen, die das Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase Isoenzym 1A1 exprimieren. Demnach könnte eine Reduktion der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität durch Polymorphismen und/oder durch Nahrungsbestandteile, die mit dem Enzym selbst oder seiner Genexpression wechselwirken, die Induktion von Genmutationen durch 17 β -Estradiol und dessen Catecholestrogenen begünstigen.

6 Summary

Oxidative metabolism of the female sex hormone 17 β -estradiol is considered to play a major role in the initiation of hormone-induced carcinogenesis. In extrahepatic tissues, 17 β -estradiol undergoes metabolic activation by cytochrome P450-dependent monooxygenase isozyme 1A1 to 2-hydroxy- and, to a lesser extent, to 4-hydroxyestradiol. If not conjugated, these catecholestrogens can further oxidize to electrophilic quinones, which may react with DNA and induce thereby mutations. Conjugation of these catechols in extrahepatic tissues is mainly catalyzed by catechol-O-methyltransferase. A low catechol-O-methyltransferase activity, caused for example by polymorphisms and certain food components, which influence the enzyme activity or its gene expression, may therefore enhance quinone formation and thereby the induction of mutations.

The aim of the present work was to determine the effect of inhibition of catechol-O-methyltransferase on the mutagenic potential of a) the catechols 2- and 4-hydroxyestradiol in V79 wild type cells without cytochrome P450-dependent monooxygenase activity and b) 17 β -estradiol in V79 cells expressing human cytochrome P450-dependent monooxygenase isozyme 1A1. 3,5-dinitrocatechol (20 μ M) served as catechol-O-methyltransferase inhibitor. Gene and chromosomal mutations were assessed using the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and the micronuclei assay. In addition, the metabolite profile of 17 β -estradiol and its catechols in the culture medium was analyzed via gas chromatography/mass spectrometry.

For quantification of 2- and 4-hydroxyestradiol and their corresponding methylated inactivation products, standard mixtures were synthesized by reaction of these catecholestrogens with cytosolic catechol-O-methyltransferase from liver of Sprague-Dawley rats. For quantification of 17 β -estradiol and its metabolites, a standard mixture biosynthesized by enzymatic conversion of deuterated 17 β -estradiol was used.

After incubation of V79 cells with 2-hydroxyestradiol, 2-methoxyestradiol was the major metabolite, whereas in the presence of the catechol-O-methyltransferase inhibitor, disappearance (0.08 μ M) and a decreased amount (2.5 μ M or more) of methylated inactivation products was observed. Treatment of V79 cells with 0.08 μ M – 5 μ M 2-hydroxyestradiol, neither with nor without inhibition of catechol-O-methyltransferase, induced a significant increase in mutant frequency at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase locus. In contrast, at concentrations above or equal to 2.5 μ M 2-hydroxyestradiol, at least a 3-fold increase of the micronuclei rate compared to control cells was observed with and without inhibition of catechol-O-methyltransferase.

Over the entire concentration range (5-40 μM) 4-hydroxyestradiol was mainly converted to 4-methoxy- and 3-Omethyl-4-hydroxyestradiol, the former being the major metabolite ($\geq 86\%$) of the detected compounds. After treatment with 3,5-dinitrocatechol no methylation products were detected, thus indicating a complete inhibition of catechol-*O*-methyltransferase over the entire concentration range.

4-hydroxyestradiol did not induce gene mutations at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase locus in V79 cells with active catechol-*O*-methyltransferase. Yet, after inhibition of catechol-*O*-methyltransferase and treatment with 20 μM 4-hydroxyestradiol, a 3-fold increase in the mutant frequency was observed in comparison to control cells. Like 2-hydroxyestradiol, induction of micronuclei by 20 μM 4-hydroxyestradiol and more, was not affected by inhibition of catechol-*O*-methyltransferase.

In the culture medium of V79 cells expressing human cytochrome P450-dependent monooxygenase isozyme 1A1, which were incubated with 0.1 and 1 μM 17 β -estradiol for up to three weeks, over the entire assay duration, 17 β -estradiol, estrone, 2- and 4-hydroxy-, 2-methoxy-, 4-methoxy- and 3-Omethyl-2-hydroxyestradiol were detected. 17 β -estradiol and estrone (86% and 10% of the sum of all peak areas, respectively) were the major metabolites. As expected, no methylation products were detected after inhibition of catechol-*O*-methyltransferase.

Treatment of V79 cells expressing human cytochrome P450-dependent monooxygenase isozyme 1A1, for two and three weeks with 0.1 and 1 μM 17 β -estradiol, did not induce gene mutations at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase locus in. In contrast, a 4-fold increase in mutant frequency was observed in comparison to control cells after inhibition of catechol-*O*-methyltransferase and treatment with 0.1 μM 17 β -estradiol for three weeks. With and without inhibition of catechol-*O*-methyltransferase, no increase in micronuclei rate compared to control cells was observed after incubation with 0.1 and 1 μM 17 β -estradiol for 24 hours.

Over the entire duration of the mutagenicity assays of 17 β -estradiol and its catechols, cell-cycle distribution, cell growth and plating efficiency at the time of mutant selection, with and without inhibition of catechol-*O*-methyltransferase, did not differ statistically significant from control cells; therefore a reliable detection of mutations in the micronuclei and the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase assay can be assumed.

The present work confirms that cellular catechol-*O*-methyltransferase is essential for the inactivation of mutagenic catechols. Complete inhibition of its enzyme activity results in the induction of gene mutations by 4-hydroxyestradiol in V79 wildtype cells without cytochrome P450-dependent monooxygenase activity and also by 17 β -estradiol in cells expressing

cytochrome P450-dependent monooxygenase isozyme 1A1. Polymorphisms and food components lowering catechol-*O*-methyltransferase activity could therefore mediate the potential of 17 β -estradiol and its metabolites to induce gene mutations.

Anhang

Zytotoxizität von 4-HO-E2 in V79-Zellen

Tab. 12: Absolute und relative Zellzahlen (bezogen auf Lösungsmittelkontrolle) nach 24-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit 4-HO-E2.

Konzentration 4-HO-E2 (μM)	Absolute Zellzahl	STABW	Relative Zellzahl	STABW
0	193175	5613	100,0	2,9
5	180619	3087	93,5	1,6
10	149517	1158	77,4	0,6
20	64134	8681	33,2	4,5
40	47415	33570	25,5	17,4
60	4944	1779	2,7	0,9
80	3330	521	1,8	0,3
100	5647	662	3,0	0,3
120	6399	633	3,4	0,3

Tab. 13: Absolute und relative PE1 (bezogen auf Lösungsmittelkontrolle) nach 24-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit 4-HO-E2.

Konzentration 4-HO-E2 (μM)	Absolute PE1	STABW	Relative PE1	STABW
0	0,82	0,01	100,00	1,52
5	0,81	0,01	99,67	1,15
10	0,78	0,04	95,00	4,36
20	0,32	0,07	39,33	8,08
40	0,08	0,03	25,04	3,57
60	0,12	0,00	1,95	0,49
80	0,16	0,00	2,11	0,37
100	0,20	0,00	0,00	0,00
120	0,24	0,00	0,00	0,00

Zytotoxizität von 2-HO-E2 in V79-Zellen

Tab. 14: Absolute und relative Zellzahl (bezogen auf Lösungsmittelkontrolle) nach 24-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit 2-HO-E2.

Konzentration 2-HO-E2 (μM)	Absolute Zellzahl	STABW	Relative Zellzahl	STABW
0	288550	26198	100,00	9,08
0,08	285567	121506	98,97	42,11
0,15	241467	74098	83,68	25,68
0,3	267367	87502	92,66	30,32
0,6	266963	56759	92,52	19,67
1,25	267968	53923	92,87	18,69
2,5	262647	50979	91,02	17,67
5 μM	255154	16997	88,43	5,89
7,5	202327	17839	70,12	6,18
10	183562	4326	63,62	1,50
15	171660	41571	59,49	14,41

Tab. 15: Absolute und relative PE1 (bezogen auf Lösungsmittelkontrolle) nach 24-stündiger Behandlung von V79 Zellen mit 2-HO-E2.

Konzentration 2-HO-E2 (μM)	Absolute PE1	STABW	Relative PE1	STABW
0	0,79	0,03	100,00	3,78
0,08	0,79	0,13	99,92	16,38
0,15	0,74	0,03	94,24	3,67
0,3	0,83	0,02	105,51	2,08
0,6	0,79	0,08	100,88	9,66
1,25	0,86	0,10	108,73	12,55
2,5	0,68	0,21	85,96	26,78
5	0,58	0,14	74,10	17,22
7,5	0,12	0,07	15,19	9,13
10	0,02	0,01	2,28	1,03
15	0,07	0,06	9,22	7,23

Zytotoxizität von OR-486 in V79-Zellen

Tab. 16: Absolute und relative Zellzahl (bezogen auf Lösungsmittelkontrolle) nach 24-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit OR-486.

Konzentration OR-486	Absolute Zellzahl	STABW	Relative Zellzahl	STABW
0	289810	15097	100,00	5,21
1 nM	301820	15867	104,14	5,47
10 nM	295060	8047	101,81	2,78
0,1 µM	276800	20728	95,51	7,15
1 µM	284060	14233	98,02	4,91
10 µM	278280	13735	96,02	4,74
20 µM	277631	12033	95,80	4,15
40 µM	260370	8028	89,84	2,77
60 µM	190350	7187	65,68	2,48

Tab. 17: Absolute und relative PE1 (bezogen auf Lösungsmittelkontrolle) nach 24-stündiger Behandlung von V79 Zellen mit OR-486.

Konzentration OR-486	Absolute PE1	STABW	Relative PE1	STABW
0	0,79	0,02	100,00	2,99
1 nM	0,78	0,07	97,93	8,30
10 nM	0,76	0,04	95,43	5,49
0,1 µM	0,73	0,04	91,77	5,29
1 µM	0,76	0,01	96,16	0,82
10 µM	0,75	0,08	94,40	9,56
20 µM	0,81	0,07	101,56	8,73
40 µM	0,64	0,06	80,81	7,80
60 µM	0,63	0,07	79,19	9,13

Chromatographische Eigenschaften von E2, dessen Catecholderivaten sowie Methylcatecholen

Tab. 18: Retentionszeiten von E2, dessen Catecholderivaten sowie Methylcatecholen (GC/MS/MS-Untersuchung nach Kap. 3.2.14) sowie relative Retentionszeiten bezogen auf E2.

Analyt	Retentionszeit t_R (min)	Relative t_R bezogen auf E2 (min)
2-HO-E2	15,1	1,9
2-MeO-E2	15,2	2,0
3-OMe-2-HO-E2	14,9	1,7
4-HO-E2	15,9	2,7
4-MeO-E2	14,5	1,3
3-OMe-4-HO-E2	15,3	2,1
E2	13,2	0

Metabolitenverteilung zwischen Zellen und Kulturmedium

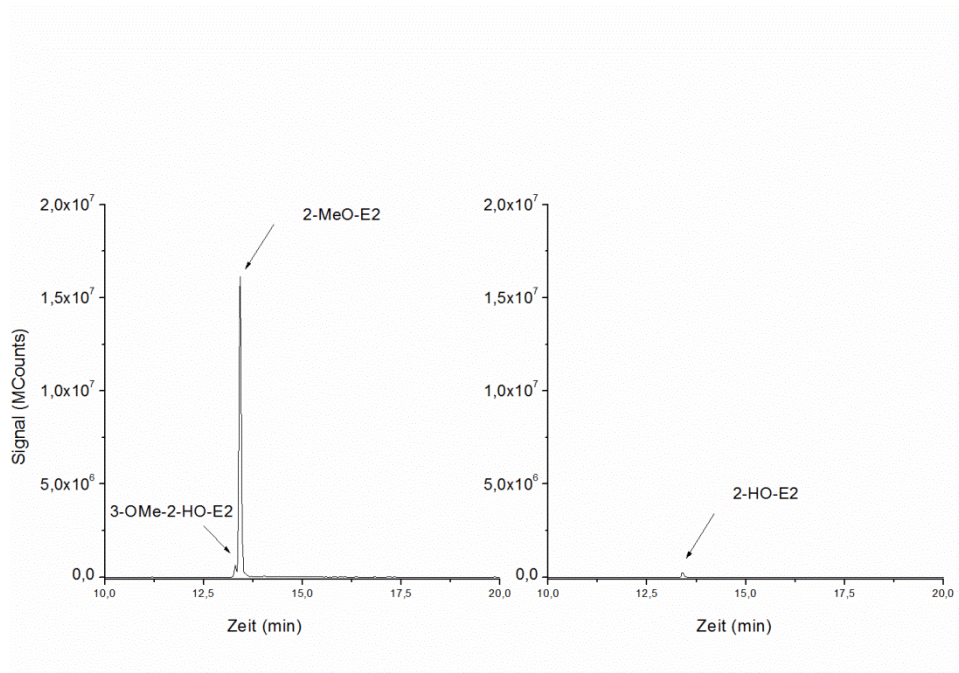


Abb. 55: MRM-Chromatogramm nach 24-stündiger Inkubation von V79-Zellen mit $2,5 \mu\text{M}$ 2-HO-E2 (Kap. 3.2.5) und anschließender Aufarbeitung der Zellsuspension in 25 ml Kulturmedium (ca. 800000 Zellen/ml), mittels SPE (Kap. 3.2.12). Dargestellt sind die extrahierten Quantifier-Massenspuren der Übergänge $446>315$ für die derivatisierten Methylierungsprodukte, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-MeO-E2 (links), sowie $504>373$ für trimethylsilyliertes 2-HO-E2 (rechts). Säule: Varian Factor Four TM, Analysebedingungen: Kapitel 3.2.8. Daten im Anhang, Tab. 19-Tab. 21).

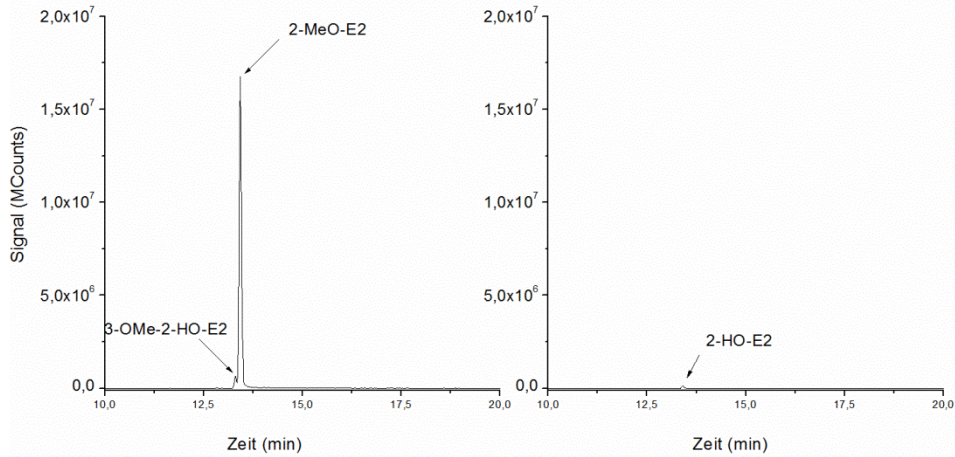


Abb. 56: MRM-Chromatogramm nach 24-stündiger Inkubation von V79-Zellen mit 2,5 μM 2-HO-E2 (Kap. 3.2.5) und anschließender Aufarbeitung von 25 ml des Kulturmediums ohne Zellen mittels SPE (Kap. 3.2.12). Dargestellt sind die extrahierten Quantifizier-Massenspuren der Übergänge 446>315 für die derivatisierten Methylierungsprodukte, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-MeO-E2 (links), sowie 504>373 für trimethylsilyliertes 2-HO-E2 (rechts). Daten im Anhang, Tab. 19-Tab. 21). Säule: Varian Factor Four TM, Analysebedingungen: Kapitel 3.2.8.

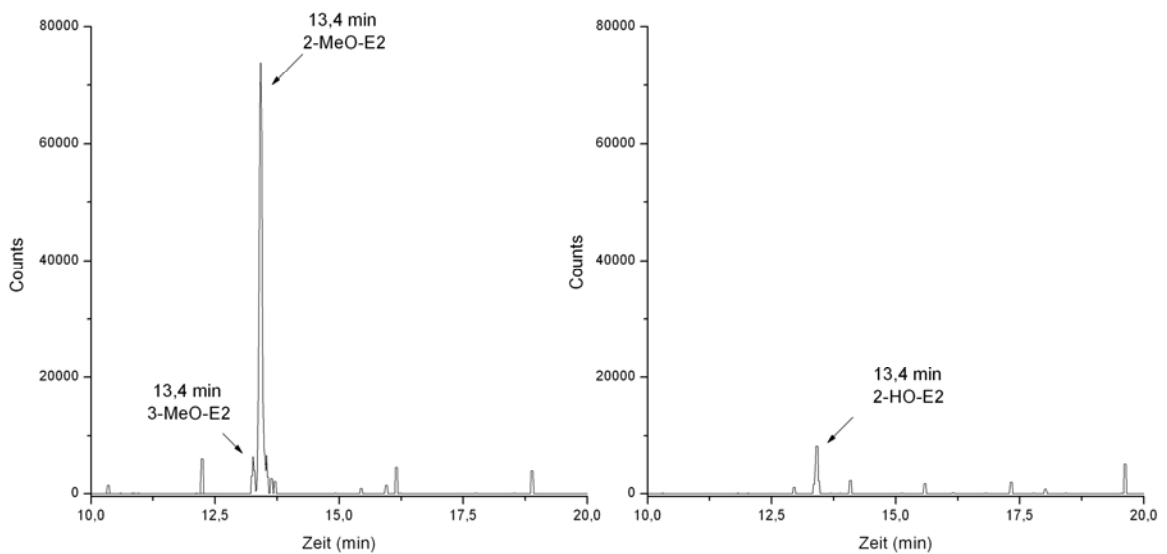


Abb. 57: MRM-Chromatogramm nach 24-stündiger Inkubation von V79-Zellen mit 2,5 μM 2-HO-E2 (Kap. 3.2.5) und anschließender Aufarbeitung der Zellen (suspendiert in 5 ml PBS-CMF)

mittels SPE (Kap. 3.2.12). Dargestellt sind die extrahierten Quantifier-Massenspuren der Übergänge 446>315 für die derivatisierten Methylierungsprodukte, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-MeO-E2 (links), sowie 504>373 für trimethylsilyliertes 2-HO-E2 (rechts). Säule: Varian Factor Four TM, Analysebedingungen: Kapitel 3.2.8. Daten im Anhang, Tab. 19-Tab. 21).

Tab. 19: Peakflächen ± STABW von 2-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukten sowie für ChAN nach gemeinsamer und separater Aufarbeitung von V79-Zellen und deren Kulturmedium nach 24-stündiger Behandlung mit 2,5 µM 2-HO-E2. MW: Mittelwert

	Peakflächen			MW ± STABW
	1	2	3	
Zellen				
3-MeO-E2	88776	48654	26578	54669 ± 31532
2-MeO-E2	4708000	2416000	13139000	6754333 ± 5646795
2-HO-E2	167659	109483	70579	115907 ± 48858
ChAN	11130000	9603000	10670000	10467667 ± 783349
Medium				
3-MeO-E2	620422	381548	3296000	1432657 ± 1618117
2-MeO-E2	11710000	8056000	76990000	32252000 ± 38787297
2-HO-E2	154942	106275	378714	213310 ± 145296
ChAN	1441000	843744	9084000	3789581 ± 4594816
Medium+Zellen				
3-MeO-E2	20083	179710	252239	150677 ± 118770
2-MeO-E2	7111000	5463000	5905000	6159667 ± 853005
2-HO-E2	65471	27494	73597	55521 ± 24610
ChAN	597667	546333	518000	554000 ± 40383

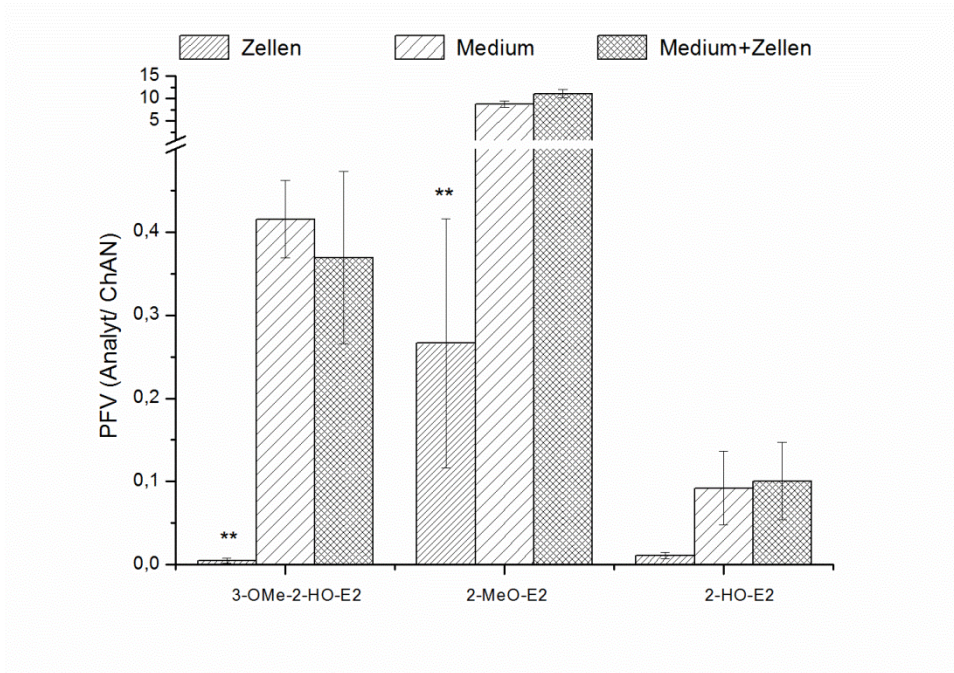


Abb. 58: PFV von 2-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukten zu ChAN nach 24-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit 2,5 μM 2-HO-E2 (Kap. 3.2.5) und anschließender Aufarbeitung (Kap. 3.2.12) und Analyse der Zellen und deren Kulturmedium separat und vereinigt (Kap. 3.2.14). Dargestellt sind Mittelwert und STABW aus drei unabhängigen Bestimmungen. Signifikante Unterschiede in der prozentualen Verteilung wurden mit Hilfe des t-Tests untersucht (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$). Daten im Anhang, Tab. 20.

Anhang

Tab. 20: Verhältnisse der Peakflächen aus Analyten und Standard (ChAN) \pm STABW nach gemeinsamer und separater Aufarbeitung von V79-Zellen und deren Kulturmedium nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit 2,5 μ M 2-HO-E2.

		Verhältnis Analyt/ChAN			MW \pm STABW
		1	2	3	
Zellen	3-MeO-E2	0,008	0,005	0,002	0,005 \pm 0,003
	2-MeO-E2	0,423	0,252	0,124	0,266 \pm 0,150
	2-HO-E2	0,015	0,011	0,007	0,011 \pm 0,004
Medium	3-MeO-E2	0,431	0,452	0,363	0,415 \pm 0,047
	2-MeO-E2	8,126	9,548	8,475	8,716 \pm 0,741
	2-HO-E2	0,108	0,126	0,042	0,092 \pm 0,044
Medium+Zellen	3-MeO-E2	0,292	0,329	0,487	0,369 \pm 0,104
	2-MeO-E2	11,898	9,999	11,400	11,099 \pm 0,985
	2-HO-E2	0,110	0,050	0,142	0,101 \pm 0,047

Tab. 21: Metabolitenverhältnisse mit Mittelwert \pm STABW nach gemeinsamer und separater Aufarbeitung von Zellen und Kulturmedium nach 24 –stündiger Inkubation mit 2,5 μ M 2-HO-E2.

		Metabolitenverhältnisse (%)			MW \pm STABW
		1	2	3	
Zellen					
	2-MeO-E2	94,8	93,8	93,1	93,90 \pm 0,85%
	3-MeO-E2	1,8	1,9	1,9	1,87 \pm 0,06%
	2-HO-E2	3,4	4,3	5,0	4,23 \pm 0,80%
25 ml Medium					
	2-MeO-E2	95,4	93,8	94,3	94,50 \pm 0,82%
	3-MeO-E2	4,1	5,0	4,5	4,53 \pm 0,45%
	2-HO-E2	0,5	1,2	1,2	0,97 \pm 0,40%
25 ml Medium+Zellen					

2-MeO-E2	96,4	95,2	94,8	96,47 ± 0,83%
3-MeO-E2	2,7	3,9	4,0	3,53 ± 0,72%
2-HO-E2	0,9	0,9	1,2	1,00 ± 0,17%

Optimierung des Probevolumens für die Festphasenextraktion

Tab. 22: Peakflächen von 2-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukten, 2-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2 sowie für ChAN nach Aufarbeitung von 5 ml, 10 ml und 25 ml Kulturmedium von V79-Zellen, die zuvor 24 h mit 2,5 µM 2-HO-E2 behandelt wurden.

	Peakflächen			MW ± STABW
	1	2	3	
5 ml				
3-MeO-E2	531829	235270	178615	315238 ± 189700
2-MeO-E2	14630000	5143000	4176000	7983000 ± 5776740
2-HO-E2	156089	37139	31803	75010 ± 70267
ChAN	15610000	4078000	3654000	7780667 ± 6783715
10 ml				
3-MeO-E2	5400000	4836000	3862000	4699333 ± 778055
2-MeO-E2	159400000	138000000	108900000	135433333 ± 25347650
2-HO-E2	1865000	831414	580733	1092382 ± 680745
ChAN	14620000	14550000	13670000	14280000 ± 529434
25 ml				
3-MeO-E2	6358000	5976000	2628000	4987333 ± 2052150
2-MeO-E2	178900000	163000000	75030000	138976667 ± 55947159
2-HO-E2	748862	543037	238714	510204 ± 256654
ChAN	8808000	8450000	4220000	4624333 ± 3996868

Anhang

Tab. 23: PVF von 2-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukten, 2-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2 zu ChAN nach Aufarbeitung von 5 ml, 10 ml und 25 ml Kulturmedium von V79-Zellen, die zuvor 24 h mit 2,5 μ M 2-HO-E2 behandelt wurden.

		Verhältnis Analyt/Standard			MW \pm STABW
		1	2	3	
5 ml	3-MeO-E2	0,034	0,058	0,049	0,047 \pm 0,012
	2-MeO-E2	0,899	1,261	1,143	1,101 \pm 0,185
	2-HO-E2	0,010	0,009	0,009	0,009 \pm 0,001
10 ml	3-MeO-E2	0,369	0,332	0,283	0,328 \pm 0,043
	2-MeO-E2	10,903	9,485	7,966	9,451 \pm 1,469
	2-HO-E2	0,128	0,057	0,042	0,076 \pm 0,046
25 ml	3-MeO-E2	0,722	0,707	0,623	0,684 \pm 0,053
	2-MeO-E2	20,311	19,290	17,780	19,127 \pm 1,273
	2-HO-E2	0,085	0,064	0,057	0,069 \pm 0,015

Tab. 24: S/N von 2-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukten, 2-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2 sowie ChAN nach Aufarbeitung von 5 ml, 10 ml und 25 ml Kulturmedium von V79-Zellen, die zuvor 24 h mit 2,5 μ M 2-HO-E2 behandelt wurden.

		S/N			MW \pm STABW
		1	2	3	
5 ml					
3-MeO-E2	264	130	355	250 \pm 113	
2-MeO-E2	781	564	2057	1134 \pm 807	
2-HO-E2	5325	9012	9075	7804 \pm 2147	
ChAN	3327	848	2488	2221 \pm 1261	
10 ml					
3-MeO-E2	415	181	244	280 \pm 121	
2-MeO-E2	4972	2730	2391	3364 \pm 1403	

Anhang

2-HO-E2	414	149	333	299 ± 136
ChAN	1979	1381	1643	1668 ± 300
25 ml				
3-MeO-E2	709	537	271	506 ± 221
2-MeO-E2	10698	3879	2294	5624 ± 4465
2-HO-E2	663	386	4328	1792 ± 2200
ChAN	833	1056	1340	1076 ± 254

Wiederfindung der internen Standards

Tab. 25: Peakflächen von 3-OMe-2-HO-E2, 2-MeO-E2 und 2-HO-E2 in 10 µl Standardgemisch ohne SPE-Aufarbeitung sowie in 10 µl Standardgemisch zugegeben zu 1 ml Kulturmedium von V79-Zellen und anschließend mittels SPE aufgearbeitet.

	Peakflächen		
	1	2	3
Ohne SPE			
3-OMe-2-HO-E2	79980000	39720000	126400000
2-MeO-E2	109900000	58370000	176300000
2-HO-E2	35010000	15620000	45810000
ChAN	1249000	581966	2165000
Mit SPE			
3-OMe-2-HO-E2	21090000	19630000	19780000
2-MeO-E2	29430000	27250000	28100000
2-HO-E2	2023000	1667000	1502000
ChAN	1794000	1483000	1740000

Anhang

Tab. 26: PFV von 3-OMe-2-HO-E2, 2-MeO-E2 und 2-HO-E2 in 10 µl Standardgemisch ohne SPE-Aufarbeitung sowie in 10 µl Standardgemisch zugegeben zu 1 ml Kulturmedium von V79-Zellen und anschließend mittels SPE aufgearbeitet.

	PFV			MW	STABW
	1	2	3		
Ohne SPE					
3-OMe-2-HO-E2	64,0	68,3	58,4	63,6	5,0
2-MeO-E2	88,0	100,3	81,4	89,9	9,6
2-HO-E2	28,0	26,8	21,2	25,3	3,7
Mit SPE					
3-OMe-2-HO-E2	11,8	13,2	11,4	12,1	1,0
2-MeO-E2	16,4	18,4	16,1	17,0	1,2
2-HO-E2	1,1	1,1	0,9	1,0	0,2

Tab. 27: Peakflächen von 4-MeO-E2, 3-OMe-4-HO-E2 und 4-HO-E2 in 10 µl Standardgemisch ohne SPE-Aufarbeitung sowie in 10 µl Standardgemisch zugegeben zu 1 ml Kulturmedium von V79-Zellen und anschließend mittels SPE aufgearbeitet.

	Peakflächen		
	1	2	3
Ohne SPE			
4-MeO-E2	404200000	312900000	472400000
3-OMe-4-HO-E2	15380000	11650000	18490000
4-HO-E2	574700000	514200000	552800000
ChAN	18300000	14020000	23440000
Mit SPE			
4-MeO-E2	81930000	77140000	79490000
3-OMe-4-HO-E2	6254000	5754000	6126000
4-HO-E2	45800000	44290000	44450000
ChAN	30590000	31230000	29020000

Anhang

Tab. 28: PFV von 4-MeO-E2, 3-OMe-4-HO-E2 und 4-HO-E2 in 10 µl Standardgemisch ohne SPE-Aufarbeitung sowie in 10 µl Standardgemisch zugegeben zu 1 ml Kulturmedium von V79-Zellen und anschließend mittels SPE aufgearbeitet.

	PFV			MW	STABW
	1	2	3		
Ohne SPE					
4-MeO-E2	22,1	22,3	20,2	21,5	1,2
3-OMe-4-HO-E2	0,8	0,8	0,8	0,8	0,0
4-HO-E2	31,4	28,1	30,2	29,9	1,7
Mit SPE					
4-MeO-E2	2,7	2,5	2,7	2,6	0,1
3-OMe-4-HO-E2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,0
4-HO-E2	1,5	1,4	1,5	1,5	0,1

Tab. 29: Peakflächen von D-E2, D-4-MeO-E2, D-3-OMe-2-HO-E2, D-2-MeO-E2, D-2-HO-E2 und ChAN in 10 µl Standardgemisch ohne SPE-Aufarbeitung sowie in 10 µl Standardgemisch zugegeben zu 5 ml Kulturmedium von V79 hCYP1A1-Zellen und anschließend mittels SPE aufgearbeitet.

	Peakflächen		
	1	2	3
Ohne SPE			
D-E2	261200000	284500000	266500000
D-4-MeO-E2	952608	1075000	979457
D-3-OMe-2-HO-E2	11110000	13880000	11170000
D-2-MeO-E2	15640000	16530000	15690000
D-2-HO-E2	2245000	2277000	2046000
ChAN	16160000	16750000	14660000
Mit SPE			
	1	1	1
D-E2	20990000	22900000	n.n.
D-4-MeO-E2	113922	40364	66579
D-3-OMe-2-HO-E2	472382	424770	660849
D-2-MeO-E2	676318	908759	798996
D-2-HO-E2	117852	105832	100753

Anhang

ChAN	5950000	6849000	5898000
	2	2	2
D-E2	17610000	17070000	17000000
D-4-MeO-E2	55991	79090	49610
D-3-OMe-2-HO-E2	693271	529202	645647
D-2-MeO-E2	981248	624522	598351
D-2-HO-E2	300349	39423	20075
ChAN	7452000	11430000	11470000
	3	3	3
D-E2	19010000	20830000	17490000
D-4-MeO-E2	68250	64608	41045
D-3-OMe-2-HO-E2	594633	529390	466472
D-2-MeO-E2	959361	1040000	656236
D-2-HO-E2	n.n.	n.n.	n.n.
ChAN	8250000	9206000	7479000

Tab. 30: PFV von D-E2, D-4-MeO-E2, D-3-OMe-2-HO-E2, D-2-MeO-E2, D-2-HO-E2 in 10 µl Standardgemisch ohne SPE-Aufarbeitung sowie in 10 µl Standardgemisch zugegeben zu 5 ml Kulturmedium von V79 hCYP1A1-Zellen und anschließend mittels SPE aufgearbeitet.

	PFV			MW	STABW
	1	2	3		
Ohne SPE					
D-E2	16,2	17,6	16,5	16,8	0,8
D-4-MeO-E2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,004
D-3-OMe-2-HO-E2	0,7	0,8	0,8	0,8	0,1
D-2-MeO-E2	1,0	1,0	1,1	1,0	0,1
D-2-HO-E2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,002
Mit SPE					
D-E2	2,3	1,9	2,3	2,2	0,24
D-4-MeO-E2	0,0	0,0	0,0	0,01	0,003
D-3-OMe-2-HO-E2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,01
D-2-MeO-E2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,03
D-2-HO-E2	0,02	0,01		0,01	0,004

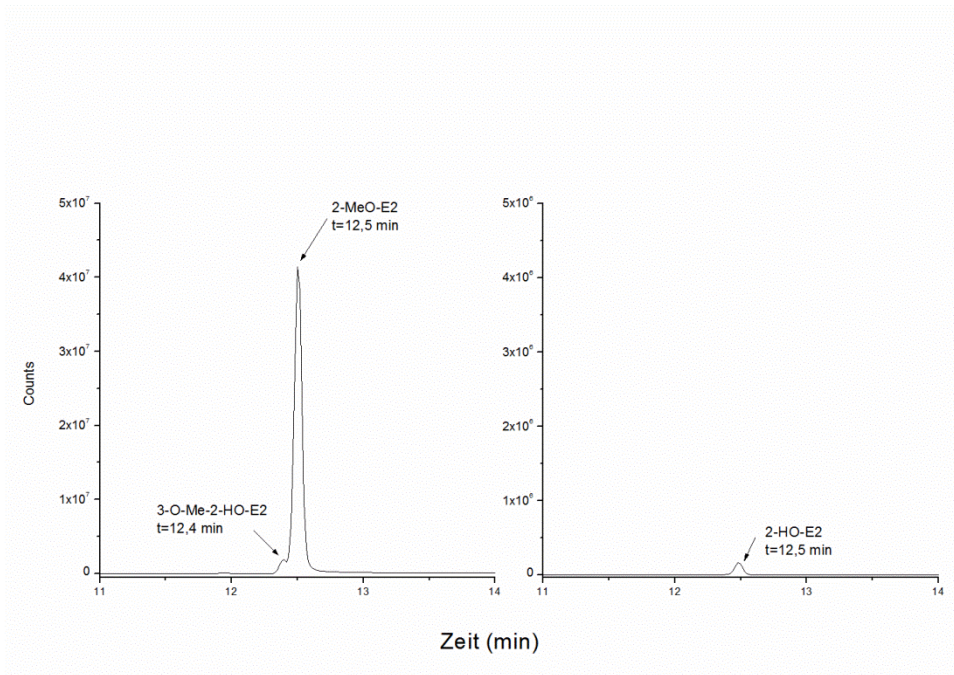


Abb. 59: MRM-Chromatogramm nach 24-stündiger Inkubation von V79-Zellen mit $1,25 \mu\text{M}$ 2-HO-E2 (Kap.3.2.5) und anschließender SPE-Aufarbeitung (Kap. 3.2.12). Dargestellt sind die extrahierten Quantifier-Massenspuren für die derivatisierten Methylierungsprodukte von 2-HO-E2 ($446 > 315$, links) und für trimethylsilyliertes 2-HO-E2 ($504 > 373$, rechts). Säule: Varian Factor Four TM, Analysebedingungen: Kap. 3.2.8.

Anhang

Tab. 31: Peakflächen ± STABW von 2-HO-E2 und dessen Methylierungsprodukten, 2-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2, nach 24 stündiger Behandlung von V79-Zellen mit 1,25 µM 2-HO-E2 sowie 0 nM, 1 nM, 100 nM, 10 µM und 20 µM OR-486.

	Peakflächen			MW ± STABW
	1	2	3	
0 nM OR-486				
3-OMe-2-HO-E2	160555	222090	210338	197661 ± 32668
2-MeO-E2	5240000	634000	6749000	4207667 ± 3185528
2-HO-E2	44575	34219	80947	53247 ± 24541
1 nM OR-486				
3-OMe-2-HO-E2	1298000	11779	17252	442344 ± 741025
2-MeO-E2	54460000	467568	564779	18497449 ± 31144521
2-HO-E2	204899	2664	3416	70326 ± 116544
100 nM OR-486				
3-OMe-2-HO-E2	2771000	2853000	662	1874887 ± 1623645
2-MeO-E2	65740000	74860000	26808	46875603 ± 40827696
2-HO-E2	4285000	1598000	1515	1961505 ± 2164755
10 µM OR-486				
3-OMe-2-HO-E2	-	-	-	-
2-MeO-E2	314443	126907	144625	195325 ± 103539
2-HO-E2	38473	15446	16022	23314 ± 13132
20 µM OR-486				
3-OMe-2-HO-E2	-	-	-	-
2-MeO-E2	157600	46830	41150	81860 ± 65654
2-HO-E2	19016	5279	5573	9956 ± 7849

Anhang

Tab. 32: Anteil der Summe der Peakflächen von 2-HO-E2, 2-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2 mit Mittelwert \pm STABW nach 24 stündiger Behandlung von V79-Zellen mit 1,25 μ M 2-HO-E2 sowie 0 nM, 1 nM, 100 nM, 10 μ M und 20 μ M OR-486.

OR-486		Metabolitenverhältnisse (%)			MW \pm STABW
		1	2	3	
0 nM	3-OMe-2-HO-E2	3,0	3,4	3,0	3,13 \pm 0,23
	2-MeO-E2	96,2	96,1	95,9	96,07 \pm 0,15
	2-HO-E2	0,8	0,5	1,1	0,80 \pm 0,30
1 nM	3-OMe-2-HO-E2	2,3	2,4	2,9	2,53 \pm 0,32
	2-MeO-E2	97,3	97,0	96,5	96,93 \pm 0,40
	2-HO-E2	0,4	0,6	0,6	0,53 \pm 0,12
100 nM	3-OMe-2-HO-E2	3,8	3,6	2,3	2,23 \pm 0,81
	2-MeO-E2	90,3	94,4	92,5	92,40 \pm 2,05
	2-HO-E2	5,9	2,0	5,2	4,37 \pm 2,08
10 μ M	2-MeO-E2	89,1	89,1	90,0	89,40 \pm 0,52
	2-HO-E2	10,9	10,9	10,0	10,60 \pm 0,52
20 μ M	2-MeO-E2	89,2	89,9	88,1	89,07 \pm 0,91
	2-HO-E2	10,8	10,1	11,9	10,93 \pm 0,91

HPRT mit 2-HO-E2

Tab. 33: PE 1 nach 24-stündiger Behandlung mit 1 μ M NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 μ M, Lösungsmittelkontrolle) und 2-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 μ M OR-486 (+ H) und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 2-HO-E2. n.b.: nicht bestimmt.

PE1							
Konzentration 2-HO-E2 (μ M)	1	2	3	4	5	MW	STABW
0	0,83	0,80	0,79	0,82	0,85	0,82	0,02
0+H	0,76	0,71	0,79	0,77	0,79	0,76	0,03
0,08	0,79	0,77	0,79	n.b.	n.b.	0,78	0,01
0,08+H	0,75	0,74	0,72	n.b.	n.b.	0,74	0,01
2,5	0,19	0,15	0,47	0,31	n.b.	0,28	0,14

Anhang

2,5+H	0,65	0,76	0,73	0,69	n.b.	0,71	0,03
5	0,03	0,05	0,06	0,06	n.b.	0,05	0,01
5+H	0,62	0,73	0,57	0,63		0,64	0,08
1 μ M NQO	0,75	0,66	0,79	0,74	0,79	0,75	0,05

Tab. 34: Absolute Zellzahl nach 24-stündiger Behandlung mit 1 μ M NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 μ M, Lösungsmittelkontrolle) und 2-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 μ M OR-486 (+ H), anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 2-HO-E2. n.b.: nicht bestimmt.

Konzentration 2-HO-E2 (μ M)	Zellzahl					MW	STABW
	1	2	3	4	5		
0	1,82E+07	1,83E+07	2,40E+07	2,21E+07	2,22E+07	2,10E+07	2,56E+06
0+H	1,94E+07	1,63E+07	1,98E+07	1,85E+07	1,84E+07	1,85E+07	1,36E+06
0,08	2,14E+07	1,84E+07	2,49E+07	n.b.	n.b.	2,16E+07	3,26E+06
0,08+H	1,96E+07	1,55E+07	2,01E+07	n.b.	n.b.	1,84E+07	2,55E+06
2,5	1,35E+07	7,25E+06	n.b.	1,31E+07	1,42E+07	1,20E+07	3,20E+06
2,5+H	1,67E+07	7,28E+06	n.b.	8,17E+06	8,26E+06	1,01E+07	4,42E+06
5	1,18E+07	5,07E+06	n.b.	8,42E+06	1,08E+07	9,02E+06	2,99E+06
5+H	8,01E+06	7,24E+06	n.b.	1,40E+07	8,62E+06	9,46E+06	3,07E+06
1 μ M NQO	2,25E+07	1,71E+07	2,29E+07	2,09E+07	1,81E+07	2,03E+07	2,59E+06

Tab. 35: PE2 nach 24-stündiger Behandlung mit 1 μ M NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 μ M, Lösungsmittelkontrolle) und 2-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 und anschließender substanzfreier 5-tägiger Nachinkubation sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 μ M OR-486 (+ H), anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 2-HO-E2 und anschließender substanzfreier 5-tägiger Nachinkubation n.b.: nicht bestimmt.

Konzentration 2-HO-E2 (μ M)	PE2					MW	STABW
	1	2	3	4	5		
0	0,80	0,75	0,63	0,71	0,71	0,72	0,07
0 + H	0,74	0,81	0,60	0,78	0,70	0,73	0,09
0,08	0,79	0,73	0,65	0,75	n.b.	0,74	0,06
0,08 + H	n.b.	n.b.	0,60	0,75	0,70	0,73	0,09
2,5	n.b.	n.b.	0,61	0,79	0,71	0,73	0,06
2,5 + H	0,76	0,82	0,60	0,77	n.b.	0,73	0,07
5	0,69	0,76	0,66	0,71	n.b.	0,72	0,08
5 + H	0,74	0,84	0,64	0,73	n.b.	0,73	0,09
1 μ M NQO	0,76	0,80	0,60	0,73	0,71	0,74	0,09

Anhang

Tab. 36: MF nach 24-stündiger Behandlung mit 1 μM NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 μM , Lösungsmittelkontrolle), 0,08, 2,5 und 5 μM 2-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 und anschließender substanzfreier 5-tägiger Nachinkubation sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 μM OR-486 (+ H), anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO, 0,08, 2,5 und 5 μM 2-HO-E2 und anschließende substanzfreie 5-tägige Nachinkubation. n.b.: nicht bestimmt.

Konzentration 2-HO-E2 (μM)	MF					MW	STABW
	1	2	3	4	5		
0	5	7	8	7	9	7	1
0 + H	2	6	11	5	13	7	4
0	n.b.	n.b.	17	12	17	15	4
0,08 + H	n.b.	n.b.	7	11	15	11	3
3	0	4	6	13	n.b.	6	6
2,5 + H	8	5	10	12	n.b.	9	3
5	2	5	7	8	n.b.	5	3
5 + H	9	21	21	12	n.b.	16	6
1 μM NQO	150	150	199	176	104	156	23

Tab. 37: Absolute Zellzahlen im Verlauf des HPRTs mit 2-HO-E2.

Tag	Zellzahl					MW	STABW
	1	2	3	4	5		
0 μM							
-1	1,50E+05	1,45E+06	1,48E+06	1,54E+06	1,50E+06	1,22E+06	6,01E+05
0	4,36E+06	4,42E+06	4,65E+06	5,45E+06	5,00E+06	4,78E+06	4,54E+05
1	1,82E+07	1,83E+07	2,40E+07	2,21E+07	2,22E+07	2,10E+07	2,56E+06
3	3,73E+08	5,98E+08	5,07E+08	7,14E+08	6,71E+08	5,73E+08	1,36E+08
5	1,31E+10	1,05E+10	1,72E+10	1,86E+10	1,97E+10	1,58E+10	3,89E+09
0 μM +H							
-1	1,50E+05	1,45E+06	1,48E+06	1,54E+06	1,50E+06	1,22E+06	6,01E+05
0	4,36E+06	4,42E+06	4,65E+06	5,45E+06	5,00E+06	4,78E+06	4,54E+05
1	1,94E+07	1,63E+07	1,98E+07	1,85E+07	1,84E+07	1,85E+07	1,36E+06
3	3,95E+08	4,43E+08	3,79E+08	4,58E+08	5,07E+08	4,36E+08	5,11E+07
5	1,43E+10	7,87E+09	1,30E+10	1,26E+10	1,49E+10	1,25E+10	2,77E+09
0,8 μM							
-1	1,50E+05	1,45E+06	1,48E+06	n.b.	n.b.	1,03E+06	7,59E+05
0	4,36E+06	4,42E+06	4,65E+06	n.b.	n.b.	4,48E+06	1,54E+05
1	2,14E+07	1,84E+07	2,49E+07	n.b.	n.b.	2,16E+07	3,26E+06
3	4,86E+08	5,94E+08	6,28E+08	n.b.	n.b.	5,69E+08	7,42E+07
5	1,67E+10	1,03E+10	2,20E+10	n.b.	n.b.	1,63E+10	5,83E+09
0,8 μM +H							

Anhang

-1	1,50E+05	1,45E+06	1,48E+06	n.b.	n.b.	1,03E+06	7,59E+05
0	4,36E+06	4,42E+06	4,65E+06	n.b.	n.b.	4,48E+06	1,54E+05
1	1,96E+07	1,55E+07	2,01E+07	n.b.	n.b.	1,84E+07	2,55E+06
3	3,89E+08	4,56E+08	4,40E+08	n.b.	n.b.	4,28E+08	3,50E+07
5	1,36E+10	8,36E+09	1,58E+10	n.b.	n.b.	1,26E+10	3,80E+09
2,5 µM							
-1	1,50E+05	1,45E+06	1,54E+06	1,50E+06	n.b.	1,16E+06	6,73E+05
0	4,36E+06	4,42E+06	5,45E+06	5,00E+06	n.b.	4,81E+06	5,18E+05
1	2,69E+07	1,45E+07	1,31E+07	1,42E+07	n.b.	1,72E+07	6,54E+06
3	4,33E+08	4,73E+08	1,02E+08	8,03E+07	n.b.	2,72E+08	2,10E+08
5	1,55E+10	8,68E+09	2,64E+09	2,36E+09	n.b.	7,28E+09	6,18E+09
2,5 µM +H							
-1	1,50E+05	1,45E+06	1,54E+06	1,50E+06	n.b.	1,16E+06	6,73E+05
0	4,36E+06	4,42E+06	5,45E+06	5,00E+06	n.b.	4,81E+06	5,18E+05
1	3,34E+07	1,46E+07	1,63E+07	1,65E+07	n.b.	2,02E+07	8,83E+06
3	6,65E+08	3,97E+08	4,52E+08	3,99E+08	n.b.	4,78E+08	1,27E+08
5	2,31E+10	7,99E+09	1,12E+10	1,17E+10	n.b.	1,35E+10	6,59E+09
5 µM							
-1	1,50E+05	1,45E+06	1,54E+06	1,50E+06	n.b.	1,16E+06	6,73E+05
0	4,36E+06	4,42E+06	5,45E+06	5,00E+06	n.b.	4,81E+06	5,18E+05
1	2,35E+07	1,01E+07	8,42E+06	1,08E+07	n.b.	1,32E+07	6,93E+06
3	7,22E+07	3,27E+08	9,65E+06	1,55E+07	n.b.	1,06E+08	1,50E+08
5	2,07E+09	5,38E+09	2,73E+08	3,02E+08	n.b.	2,01E+09	2,40E+09
5 µM+H							
-1	1,50E+05	1,45E+06	1,54E+06	1,50E+06	n.b.	1,16E+06	6,73E+05
0	4,36E+06	4,42E+06	5,45E+06	5,00E+06	n.b.	4,81E+06	5,18E+05
1	1,60E+07	1,45E+07	1,40E+07	1,72E+07	n.b.	1,54E+07	1,48E+06
3	2,66E+08	4,26E+08	3,25E+08	4,16E+08	n.b.	3,58E+08	7,66E+07
5	9,29E+09	7,85E+09	8,28E+09	1,20E+10	n.b.	9,34E+09	1,84E+09
1 µM NQO							
-1	1,50E+05	1,45E+06	1,48E+06	1,54E+06	1,50E+06	1,22E+06	6,01E+05
0	4,36E+06	4,42E+06	4,65E+06	5,45E+06	5,00E+06	4,78E+06	4,54E+05
1	2,25E+07	1,71E+07	2,29E+07	2,09E+07	1,81E+07	2,03E+07	2,59E+06
3	6,47E+08	5,27E+08	5,77E+08	6,11E+08	5,79E+08	5,88E+08	4,45E+07
5	2,17E+10	8,09E+09	2,09E+10	1,39E+10	1,42E+10	1,58E+10	5,62E+09

HPRT mit 4-HO-E2

Tab. 38: PE1 nach 24-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle), 4-HO-E2 beziehungsweise 1 µM NQO ohne COMT-Hemmer OR-486 sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 µM OR-486 (+ H) und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 4-HO-E2. n.b.: nicht bestimmt.

Konzentration 4-HO-E2 (µM)	PE1						MW	STABW
	1	2	3	4	5	6		
0	0,83	0,85	0,85	0,79	0,82	0,86	0,83	0,01
0+H	0,73	0,80	0,80	0,79	0,77	0,79	0,78	0,04
5	0,69	0,78	0,78	n.b.	n.b.	n.b.	0,75	0,05
5+H	0,74	0,70	0,70	n.b.	n.b.	n.b.	0,71	0,03
10	0,77	0,79	0,79	n.b.	n.b.	n.b.	0,79	0,01
10+H	0,71	0,73	0,73	n.b.	n.b.	n.b.	0,72	0,01
20	0,65	0,67	0,67	n.b.	n.b.	n.b.	0,66	0,01
20+H	0,56	0,69	0,69	n.b.	n.b.	n.b.	0,65	0,08
40	0,39	0,50	0,26	n.b.	n.b.	n.b.	0,38	0,12
40+H	0,44	0,44	0,34	n.b.	n.b.	n.b.	0,41	0,06
1 µM NQO	0,64	0,71	0,75	0,79	0,74	0,79	0,74	0,06

Tab. 39: Relative PE1 von V79-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 1 µM NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle), 4-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 µM OR-486 (+ H) und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 4-HO-E2.

Konzentration 4-HO-E2 (µM)	Relative PE1 %	STABW
0	100,0	1,2
0+H	93,5	5,2
5	89,8	6,1
5+H	85,3	3,5
10	94,4	2,0
10+H	86,7	1,8
20	79,2	1,9
20+H	77,5	9,6
40	45,7	14,3
40+H	48,8	6,8
1 µM NQO	88,2	6,9

Anhang

Tab. 40: Absolute Zellzahlen im Verlauf des HPRTs mit 4-HO-E2.

		Zellzahl						MW	STABW
0 μM									
-1		1,68E+06	1,54E+06	1,43E+06	1,50E+05	1,45E+06	1,48E+06	1,29E+06	5,64E+05
0		5,12E+06	5,20E+06	5,08E+06	4,36E+06	4,42E+06	4,65E+06	4,81E+06	3,75E+05
1		2,06E+07	2,26E+07	1,66E+07	1,82E+07	1,83E+07	2,40E+07	2,01E+07	2,86E+06
3		5,90E+08	6,38E+08	4,95E+08	3,73E+08	5,98E+08	5,07E+08	5,34E+08	9,63E+07
5		1,57E+10	1,32E+10	1,03E+10	1,31E+10	1,05E+10	1,72E+10	1,33E+10	2,76E+09
0μM+H									
-1		1,68E+06	1,54E+06	1,43E+06	1,50E+05	1,45E+06	1,48E+06	1,29E+06	5,64E+05
0		5,12E+06	5,20E+06	5,08E+06	4,36E+06	4,42E+06	4,65E+06	4,81E+06	3,75E+05
1		1,81E+07	2,07E+07	1,70E+07	1,94E+07	1,63E+07	1,98E+07	1,85E+07	1,71E+06
3		5,13E+08	6,10E+08	4,89E+08	3,95E+08	4,43E+08	3,79E+08	4,71E+08	8,54E+07
5		1,39E+10	1,17E+10	1,05E+10	1,43E+10	7,87E+09	1,30E+10	1,19E+10	2,42E+09
5 μM									
-1		1,68E+06	1,54E+06	1,43E+06	1,68E+06	1,54E+06	1,43E+06	1,55E+06	1,12E+05
0		5,12E+06	5,20E+06	5,08E+06	5,12E+06	5,20E+06	5,08E+06	5,13E+06	5,69E+04
1		2,03E+07	2,30E+07	1,85E+07	2,03E+07	2,30E+07	1,85E+07	2,06E+07	2,03E+06
3		6,23E+08	6,94E+08	5,45E+08	6,23E+08	6,94E+08	5,45E+08	6,21E+08	6,68E+07
5		1,66E+10	1,63E+10	1,32E+10	1,66E+10	1,63E+10	1,32E+10	1,54E+10	1,69E+09
5 μM+H									
-1		1,68E+06	1,54E+06	1,43E+06	1,68E+06	1,54E+06	1,43E+06	1,55E+06	1,12E+05
0		5,12E+06	5,20E+06	5,08E+06	5,12E+06	5,20E+06	5,08E+06	5,13E+06	5,69E+04
1		1,83E+07	1,88E+07	1,62E+07	1,83E+07	1,88E+07	1,62E+07	1,78E+07	1,22E+06
3		5,03E+08	5,92E+08	4,82E+08	5,03E+08	5,92E+08	4,82E+08	5,26E+08	5,21E+07
5		1,29E+10	1,04E+10	9,78E+09	1,29E+10	1,04E+10	9,78E+09	1,10E+10	1,49E+09
10 μM									
-1		1,68E+06	1,54E+06	1,43E+06	1,68E+06	1,54E+06	1,43E+06	1,55E+06	1,12E+05
0		5,12E+06	5,20E+06	5,08E+06	5,12E+06	5,20E+06	5,08E+06	5,13E+06	5,69E+04
1		2,47E+07	1,98E+07	1,47E+07	2,47E+07	1,98E+07	1,47E+07	1,97E+07	4,48E+06
3		6,30E+08	5,81E+08	4,91E+08	6,30E+08	5,81E+08	4,91E+08	5,67E+08	6,33E+07
5		1,73E+10	1,28E+10	1,20E+10	1,73E+10	1,28E+10	1,20E+10	1,40E+10	2,57E+09
10 μM+H									
-1		1,68E+06	1,54E+06	1,43E+06	1,68E+06	1,54E+06	1,43E+06	1,55E+06	1,12E+05
0		5,12E+06	5,20E+06	5,08E+06	5,12E+06	5,20E+06	5,08E+06	5,13E+06	5,69E+04
1		1,62E+07	1,66E+07	1,39E+07	1,62E+07	1,66E+07	1,39E+07	1,56E+07	1,30E+06
3		4,52E+08	5,66E+08	3,66E+08	4,52E+08	5,66E+08	3,66E+08	4,61E+08	9,01E+07
5		1,16E+10	1,05E+10	8,31E+09	1,16E+10	1,05E+10	8,31E+09	1,01E+10	1,48E+09
20 μM									
-1		1,68E+06	1,54E+06	1,43E+06	1,68E+06	1,54E+06	1,43E+06	1,55E+06	1,12E+05
0		5,12E+06	5,20E+06	5,08E+06	5,12E+06	5,20E+06	5,08E+06	5,13E+06	5,69E+04
1		1,31E+07	1,24E+07	1,37E+07	1,31E+07	1,24E+07	1,37E+07	1,31E+07	5,74E+05
3		3,39E+08	3,34E+08	3,76E+08	3,39E+08	3,34E+08	3,76E+08	3,49E+08	2,07E+07
5		9,97E+09	6,88E+09	8,35E+09	9,97E+09	6,88E+09	8,35E+09	8,40E+09	1,38E+09

Anhang

20 $\mu\text{M}+\text{H}$								
-1	1,68E+06	1,54E+06	1,43E+06	1,68E+06	1,54E+06	1,43E+06	1,55E+06	1,12E+05
0	5,12E+06	5,20E+06	5,08E+06	5,12E+06	5,20E+06	5,08E+06	5,13E+06	5,69E+04
1	1,08E+07	1,36E+07	9,23E+06	1,08E+07	1,36E+07	9,23E+06	1,12E+07	1,98E+06
3	2,45E+08	3,71E+08	2,09E+08	2,45E+08	3,71E+08	2,09E+08	2,75E+08	7,59E+07
5	6,98E+09	7,07E+09	4,45E+09	6,98E+09	7,07E+09	4,45E+09	6,17E+09	1,33E+09
40 μM								
-1	1,50E+05	1,45E+06	1,48E+06	n.b.	n.b.	n.b.	1,03E+06	7,59E+05
0	4,36E+06	4,42E+06	4,65E+06	n.b.	n.b.	n.b.	4,48E+06	1,54E+05
1	5,69E+06	2,92E+06	2,13E+06	n.b.	n.b.	n.b.	3,58E+06	1,87E+06
3	7,51E+07	4,75E+07	4,51E+07	n.b.	n.b.	n.b.	5,59E+07	1,67E+07
5	2,79E+09	9,85E+08	1,56E+09	n.b.	n.b.	n.b.	1,78E+09	9,21E+08
40 $\mu\text{M}+\text{H}$								
-1	1,50E+05	1,45E+06	1,48E+06	n.b.	n.b.	n.b.	1,03E+06	7,59E+05
0	4,36E+06	4,42E+06	4,65E+06	n.b.	n.b.	n.b.	4,48E+06	1,54E+05
1	7,59E+06	2,05E+06	1,19E+06	n.b.	n.b.	n.b.	3,61E+06	3,47E+06
3	1,20E+08	5,58E+07	2,28E+07	n.b.	n.b.	n.b.	6,62E+07	4,94E+07
5	4,29E+09	1,04E+09	8,06E+08	n.b.	n.b.	n.b.	2,04E+09	1,95E+09
1 μM NQO								
Tag								
-1	1,54E+06	1,54E+06	1,43E+06	1,50E+05	1,45E+06	1,48E+06	1,26E+06	5,47E+05
0	5,45E+06	5,20E+06	5,08E+06	4,36E+06	4,42E+06	4,65E+06	4,86E+06	4,48E+05
1	2,09E+07	1,65E+07	1,58E+07	2,25E+07	1,71E+07	2,29E+07	1,93E+07	3,18E+06
3	6,11E+08	5,04E+08	4,84E+08	6,47E+08	5,27E+08	5,77E+08	5,58E+08	6,38E+07
5	1,39E+10	9,09E+09	9,31E+09	2,17E+10	8,09E+09	2,09E+10	1,38E+10	6,13E+09

Tab. 41: PE2 nach 24-stündiger Behandlung mit 1 μM NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 μM , Lösungsmittelkontrolle), 5, 10, 20 und 40 μM 4-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 μM OR-486 (+ H), anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO. n.b. nicht bestimmt.

Konzentration 4-HO-E2 (μM)	PE2						MW	STABW
	1	2	3	4	5	6		
0	0,80	0,80	0,79	0,63	0,71	0,71	0,74	0,07
0+H	0,73	0,78	0,74	0,60	0,78	0,70	0,72	0,07
5	0,74	0,80	0,77	n.b.	n.b.	n.b.	0,77	0,03
5+H	0,77	0,80	0,81	n.b.	n.b.	n.b.	0,79	0,02
10	0,73	0,78	0,81	n.b.	n.b.	n.b.	0,77	0,04
10+H	0,80	0,84	0,77	n.b.	n.b.	n.b.	0,80	0,04
20	0,72	0,78	0,70	n.b.	n.b.	n.b.	0,73	0,04
20+H	0,84	0,72	0,77	n.b.	n.b.	n.b.	0,78	0,06
40	0,55	0,77	0,71	n.b.	n.b.	n.b.	0,68	0,11
40+H	0,59	0,76	0,71	n.b.	n.b.	n.b.	0,68	0,09
1 μM NQO	0,79	0,83	0,76	0,60	0,73	0,71	0,74	0,08

Anhang

Tab. 42: MF nach 24-stündiger Behandlung mit 1 μM NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 μM , Lösungsmittelkontrolle), 5, 10, 20 und 40 μM 4-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 und anschließender substanzfreier 5-tägiger Nachinkubation sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 μM OR-486 (+ H), anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO, 5, 10, 20 und 40 μM 4-HO-E2 und anschließende substanzfreie 5-tägige Nachinkubation. n.b.: nicht bestimmt.

Konzentration 4-HO-E2 (μM)	MF						MW	STABW
	1	2	3	4	5	6		
0	7	7	7	8	7	9	8	1
0+H	6	7	8	11	5	13	8	3
5	9	10	10	n.b.	n.b.	n.b.	10	0
5+H	11	12	11	n.b.	n.b.	n.b.	11	1
10	14	16	12	n.b.	n.b.	n.b.	14	2
10+H	14	9	16	n.b.	n.b.	n.b.	13	4
20	11	16	19	n.b.	n.b.	n.b.	15	4
20+H	20	22	22	n.b.	n.b.	n.b.	21	1
40	21	18	44	n.b.	n.b.	n.b.	28	14
40+H	11	2	1	n.b.	n.b.	n.b.	5	5
1 μM NQO	150	170	164	199	176	104	160	32

HPRT mit E2

Tab. 43: Absolute Zellzahlen im Verlauf des HPRT-Tests mit E2. H: COMT-Hemmer (OR-486).

0 μM Tag	Zellzahl			MW	STABW
-1	1,44E+06	1,49E+06	1,62E+06	1,52E+06	8,94E+04
0	4,01E+06	3,47E+06	4,43E+06	3,97E+06	4,82E+05
1	1,49E+07	1,17E+07	1,14E+07	1,26E+07	1,94E+06
3	1,65E+08	8,94E+07	9,62E+07	1,17E+08	4,16E+07
6	3,03E+09	1,12E+09	1,76E+09	1,97E+09	9,73E+08
8	2,00E+10	4,96E+09	9,77E+09	1,16E+10	7,67E+09
10	2,63E+11	6,21E+10	9,63E+10	1,41E+11	1,08E+11
13	4,63E+12	1,26E+12	1,59E+12	2,49E+12	1,86E+12
15	7,68E+13	1,08E+13	1,13E+13	3,30E+13	3,80E+13
17	1,01E+15	2,35E+14	1,14E+14	4,52E+14	4,83E+14
20	1,73E+16	4,46E+15	2,27E+15	8,00E+15	8,11E+15
22	2,69E+17	3,48E+16	2,16E+16	1,08E+17	1,39E+17
0 μM + H					
-1	1,44E+06	1,49E+06	1,62E+06	1,52E+06	8,94E+04
0	4,01E+06	3,47E+06	4,43E+06	3,97E+06	4,82E+05
1	1,20E+07	1,01E+07	9,41E+06	1,05E+07	1,33E+06

Anhang

3	9,52E+07	5,09E+07	5,74E+07	6,79E+07	2,39E+07
6	1,08E+09	3,42E+08	6,19E+08	6,79E+08	3,71E+08
8	3,90E+09	1,16E+09	1,87E+09	2,31E+09	1,42E+09
10	3,54E+10	7,10E+09	9,73E+09	1,74E+10	1,56E+10
13	4,41E+11	1,22E+11	1,16E+11	2,26E+11	1,86E+11
15	4,99E+12	7,34E+11	5,39E+11	2,09E+12	2,51E+12
17	4,60E+13	5,54E+12	3,67E+12	1,84E+13	2,39E+13
20	6,50E+14	7,98E+13	4,21E+13	2,57E+14	3,41E+14
22	7,17E+15	5,33E+14	4,96E+14	2,73E+15	3,84E+15

0,1 µM

-1	1,44E+06	1,49E+06	1,62E+06	1,52E+06	8,94E+04
0	4,01E+06	3,47E+06	4,43E+06	3,97E+06	4,82E+05
1	1,52E+07	1,11E+07	1,07E+07	1,23E+07	2,45E+06
3	1,93E+08	9,20E+07	1,01E+08	1,29E+08	5,58E+07
6	3,35E+09	1,12E+09	1,69E+09	2,05E+09	1,16E+09
8	2,28E+10	6,54E+09	1,11E+10	1,35E+10	8,40E+09
10	3,55E+11	6,65E+10	1,01E+11	1,74E+11	1,58E+11
13	6,30E+12	1,70E+12	1,69E+12	3,23E+12	2,66E+12
15	1,05E+14	1,33E+13	1,22E+13	4,34E+13	5,31E+13
17	1,42E+15	1,76E+14	2,44E+14	6,15E+14	7,01E+14
20	2,78E+16	3,19E+15	4,72E+15	1,19E+16	1,38E+16
22	4,26E+17	3,27E+16	4,36E+16	1,67E+17	2,24E+17

0,1 µM + H

-1	1,44E+06	1,49E+06	1,62E+06	1,52E+06	8,94E+04
0	4,01E+06	3,47E+06	4,43E+06	3,97E+06	4,82E+05
1	1,39E+07	1,03E+07	9,54E+06	1,12E+07	2,34E+06
3	1,21E+08	4,90E+07	6,08E+07	7,68E+07	3,83E+07
6	1,80E+09	3,05E+08	7,04E+08	9,35E+08	7,71E+08
8	7,83E+09	1,05E+09	2,45E+09	3,78E+09	3,58E+09
10	8,47E+10	6,99E+09	1,35E+10	3,51E+10	4,31E+10
13	1,15E+12	1,15E+11	1,52E+11	4,72E+11	5,87E+11
15	1,31E+13	6,37E+11	7,77E+11	4,85E+12	7,17E+12
17	1,91E+14	4,43E+12	5,21E+12	6,70E+13	1,08E+14
20	2,79E+15	6,47E+13	6,06E+13	9,73E+14	1,58E+15
22	3,24E+16	4,04E+14	3,43E+14	1,11E+16	1,85E+16

1 µM

-1	1,44E+06	1,49E+06	1,616E+06	1,52E+06	8,94E+04
0	4,01E+06	3,47E+06	4,428E+06	3,97E+06	4,82E+05
1	1,52E+07	1,11E+07	1,148E+07	1,26E+07	2,26E+06
3	2,05E+08	8,43E+07	9,369E+07	1,28E+08	6,71E+07
6	4,43E+09	8,38E+08	1,597E+09	2,29E+09	1,89E+09
8	3,22E+10	4,58E+09	5,933E+09	1,42E+10	1,55E+10
10	4,82E+11	4,24E+10	5,521E+10	1,93E+11	2,50E+11
13	8,72E+12	1,02E+12	8,479E+11	3,53E+12	4,50E+12
15	1,51E+14	8,59E+12	5,438E+12	5,50E+13	8,32E+13
17	1,97E+15	9,17E+13	5,394E+13	7,06E+14	1,10E+15
20	3,93E+16	1,93E+15	8,669E+14	1,40E+16	2,19E+16
22	5,96E+17	1,50E+16	7,354E+15	2,06E+17	3,37E+17

1 µM + H

-1	1,44E+06	1,488E+06	1,616E+06	1,52E+06	8,94E+04
----	----------	-----------	-----------	----------	----------

Anhang

0	4,01E+06	3,467E+06	4,428E+06	3,97E+06	4,82E+05
1	1,25E+07	1,069E+07	9,842E+06	1,10E+07	1,35E+06
3	1,18E+08	5,683E+07	6,186E+07	7,88E+07	3,37E+07
6	1,60E+09	3,130E+08	6,817E+08	8,63E+08	6,60E+08
8	7,52E+09	1,051E+09	2,953E+09	3,84E+09	3,32E+09
10	7,94E+10	7,270E+09	1,700E+10	3,45E+10	3,91E+10
13	1,07E+12	1,252E+11	1,668E+11	4,55E+11	5,36E+11
15	1,29E+13	7,157E+11	6,760E+11	4,76E+12	7,04E+12
17	9,83E+13	4,920E+12	3,818E+12	3,57E+13	5,43E+13
20	1,48E+15	7,510E+13	4,188E+13	5,31E+14	8,18E+14
22	1,79E+16	4,654E+14	2,339E+14	6,21E+15	1,02E+16

Tab. 44: Absolute PE2 nach 24-stündiger Behandlung mit BaP beziehungsweise nach durchgehender, zweiwöchiger Behandlung (Selektion 1, S1) und durchgehender, dreiwöchiger Behandlung (S2) mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle) und E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 und mit 20 µM OR-486 (+ H). Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung von drei (Proben ohne OR-486) beziehungsweise fünf (Proben mit OR-486) unabhängigen Bestimmungen.

PE2							
S1						MW	STABW
Konzentration E2 (µM)							
0	0,76	0,82	0,66	0,62	0,60	0,69	0,09
0 + H	0,71	0,66	0,55			0,64	0,08
0,1	0,67	0,85	0,65	0,59	0,63	0,68	0,10
0,1 + H	0,66	0,69	0,68			0,68	0,02
1	0,75	0,73	0,54	0,55	0,63	0,64	0,10
1 + H	0,68	0,62	0,68			0,66	0,04
0,25 BaP	0,73	0,76	0,66	0,68	0,61	0,69	0,06
S2						MW	STABW
0	0,74800	0,69	0,72	0,65	0,58	0,68	0,07
0 + H	0,74867	0,69	0,66			0,70	0,04
0,1	0,76933	0,70	0,76	0,67	0,64	0,71	0,06
0,1 + H	0,65867	0,70	0,68			0,68	0,02
1	0,76467	0,75	0,70	0,67	0,60	0,70	0,06
1 + H	0,67867	0,67	0,66			0,67	0,01
0,25 BaP	0,78067	0,76	0,72	0,60	0,63	0,70	0,08

Anhang

Tab. 45: MF nach 24-stündiger Behandlung mit BaP beziehungsweise nach durchgehender, zweiwöchiger Behandlung (Selektion 1, S1) und durchgehender, dreiwöchiger Behandlung (S2) mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle) und E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 und mit 20 µM OR-486 (+ H). Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung von drei (Proben ohne OR-486) beziehungsweise fünf (Proben mit OR-486) unabhängigen Bestimmungen.

	MF					MW	STABW
S1							
Konzentration							
E2							
(µM)							
0	3	4	5	6	4	5	1
0 + H	7	14	6			9	4
0,1	18	6	17	20	15	15	5
0,1 + H	30	7	27			21	13
1	0	7	5	2	6	4	3
1 + H	2	6	3			4	2
0,25 BaP	25	118	117	300	233	158	108
S2							
0	7	4	4	5	9	6	2
0 + H	9	2	6			6	3
0,1	12	9	15	27	19	16	7
0,1 + H	31	15	19			22	8
1	6	10	4	2	6	6	3
1 + H	7	14	1			7	6
0,25 BaP	38	141	113	162	103	112	47

MK-Test mit 2-HO-E2

Tab. 46: Anzahl an MK pro Objektträger (OT) nach 24-stündiger Inkubation mit NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 μ M, Lösungsmittelkontrolle) und 2-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 μ M OR-486 (+ H) und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 2-HO-E2.

Konzentration 2-HO-E2 (μ M)	OT1	OT2	OT3	OT4	OT5	gezählte MK (gesamt)	MK-Rate (MK/1000 Zellen)
0	6	3	2	5	n.b.	16	5
0 + H	1	4	4	7	n.b.	16	5
0,08	3	3	3	n.b.	n.b.	9	3
0,08 + H	1	3	3	n.b.	n.b.	7	2
2,5	34	27	33	11	33	138	28
2,5 + H	31	13	17	11	17	89	18
5	52	33	16	26	n.b.	127	32
5 + H	20	11	12	9	n.b.	52	13
0,5 μ M NQO	24	21	27	n.b.	n.b.	72	24

MK-Test mit 4-HO-E2

Tab. 47: Anzahl an MK pro OT nach 24-stündiger Inkubation mit NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 μ M, Lösungsmittelkontrolle) und 4-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 μ M OR-486 (+ H) und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 4-HO-E2.

Konzentration 4-HO-E2 (μ M)	OT1	OT2	OT3	OT4	OT5	OT6	OT7	gezählte MK (gesamt)	MK-Rate (MK/1000 Zellen)
0	9	8	8	9	8	4	4	50	6
5	4	9	9	5	8	7	n.b.	42	7
10	14	15	15	14	18	12	n.b.	88	15
20	22	24	25	25	18	23	n.b.	137	23
40	20	38	18	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	76	25
NQO	24	21	27	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	72	24

MK-Test mit E2

Tab. 48: Anzahl an MK pro OT nach 24-stündiger Inkubation mit NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 μ M, Lösungsmittelkontrolle) und E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 μ M OR-486 (+ H) und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und E2.

Konzentration E2 (μ M)	OT1	OT2	OT3	gezählte MK (gesamt)	MK-Rate (MK/1000 Zellen)
0	10	6	5	21	7
0 + H	10	4	6	20	7
0,1	8	8	3	19	6
0,1 + H	10	6	4	20	7
1	15	15	10	40	13
1 + H	15	19	16	50	17
0,5 μ M NQO	24	21	27	72	24

Einfluss von 2-HO-E2 auf die Zellzyklusverteilung

Tab. 49: Einfluss von 2-HO-E2 auf die Zellzyklusverteilung von V79-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 μ M, Lösungsmittelkontrolle) und 2-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 μ M OR-486 (+ H) und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 2-HO-E2. n.a.: nicht auswertbar, n.b.: nicht bestimmt. V: Versuch.

Konzentration 2-HO-E2 (μ M)	G1/G0, V1	G1/G0, V2	G1/G0, V3	G1/G0, V4	G1/G0, V5
0	9031	9118	9147	7865	9279
0 + H	8201	8162	9211	9132	9074
0,08	n.b.	n.b.	9547	6946	9793
0,08 + H	n.b.	n.b.	9045	8765	9028
2,5	n.a.	n.a.	6965	8334	n.b.
2,5 + H	8158	7662	8457	5329	n.b.
5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.b.
5 + H	6987	7548	6953	7944	n.b.
0,5 μ M NQO	8203	8194	n.b.	8702	9308
	S, V1	S, V2	S, V3	S, V4	S, V5
0	5822	5860	5511	6368	5683
0 + H	6610	6570	6227	5650	6575
0,08	n.b.	n.b.	5892	7214	5700
0,08 + H	n.b.	n.b.	6466	6121	6478
2,5	n.a.	n.a.	5764	7040	n.b.
2,5 + H	6656	6604	6306	6127	n.b.
5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.b.

Anhang

5 + H	6856	7102	6386	7019	n.b.
0,5 µM NQO	6170	6119	n.b.	5505	5988
	G2/M, V1	G2/M, V2	G2/M, V3	G2/M, V4	G2/M, V5
0	3583	3584	3601	3604	3533
0 + H	3432	3845	3365	3755	3154
0,08	n.b.	n.b.	3790	3897	3457
0,08 + H	n.b.	n.b.	3689	4038	3460
2,5	n.a.	n.a.	4375	3428	n.b.
2,5 + H	3782	3723	3716	4173	n.b.
5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.b.
5 + H	4135	3787	3960	3835	n.b.
0,5 µM NQO	3734	3950	n.b.	3936	3595

Tab. 50: Prozentuale Verteilung von V79-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle) und 2-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 µM OR-486 (+ H) und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 2-HO-E2. n.a.: nicht auswertbar.

Konzentration 2-HO-E2 (µM)	MW G1/G0 (%)	STABW	MW S (%)	STABW	MW G2/M (%)	STABW
0	48,5	2,5	32,0	2,2	19,6	0,4
0 + H	47,1	2,5	34,0	2,3	18,9	1,6
0,08	46,6	7,1	33,6	5,5	19,8	1,7
0,08 + H	47,0	0,6	33,4	0,9	19,6	1,6
2,5	42,5	1,8	35,6	1,9	21,9	3,7
2,5 + H	41,6	5,2	36,5	2,1	22,0	3,2
5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
5 + H	40,6	1,4	37,7	0,7	21,7	1,4
0,5 µM NQO	46,9	2,1	32,4	1,7	20,7	1,2

Einfluss von 4-HO-E2 auf die Zellzyklusverteilung

Tab. 51: Einfluss von 4-HO-E2 auf die Zellzyklusverteilung von V79-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle) und 4-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 µM OR-486 (+ H) und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 4-HO-E2.

Konzentration 4-HO-E2 (µM)	G1/G0, V1	G1/G0, V2	G1/G0, V3	G1/G0, V4	G1/G0, V5	G1/G0, V6
0	9147	7865	9279	9285	9002	7897
0 + H	9211	9132	9074	8705	8307	8042

Anhang

5	n.b.	n.b.	n.b.	9602	9291	7870
5 + H	n.b.	n.b.	n.b.	8494	7595	7767
10	n.b.	n.b.	n.b.	9673	9558	7586
10 + H	n.b.	n.b.	n.b.	8171	7793	7734
20	n.b.	n.b.	n.b.	9537	9303	7740
20 + H	n.b.	n.b.	n.b.	7032	7164	6763
40	8387	8463	8306	n.b.	n.b.	n.b.
40 + H	8168	8682	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
0,5 µM NQO	n.b.	8702	n.b.	n.b.	8612	7775
	S, V1	S, V2	S, V3	S, V4	S, V5	S, V6
0	5511	6368	5683	5663	5689	6071
0 + H	6227	5650	6575	6150	6588	6398
5	n.b.	n.b.	n.b.	5668	5550	6257
5 + H	n.b.	n.b.	n.b.	6984	7018	5877
10	n.b.	n.b.	n.b.	5634	5504	6859
10 + H	n.b.	n.b.	n.b.	6958	7045	6749
20	n.b.	n.b.	n.b.	4815	4152	6284
20 + H	n.b.	n.b.	n.b.	6417	6883	6861
40	5410	6821	5795	n.b.	n.b.	n.b.
40 + H	5689	5257	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
0,5 µM NQO	n.b.	5505	n.b.	n.b.	6001	6347
	G2/M, V1	G2/M, V2	G2/M, V3	G2/M, V4	G2/M, V5	G2/M, V6
0	3601	3604	3533	3621	3611	3314
0 + H	3365	3755	3154	3812	3659	3448
5	n.b.	n.b.	n.b.	3766	3679	3587
5 + H	n.b.	n.b.	n.b.	3648	3853	3499
10	n.b.	n.b.	n.b.	3750	3862	3759
10 + H	n.b.	n.b.	n.b.	4041	4029	3630
20	n.b.	n.b.	n.b.	4447	5028	3658
20 + H	n.b.	n.b.	n.b.	4785	4560	4166
40	4070	3619	3844	n.b.	n.b.	n.b.
40 + H	4393	3851	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
0,5 µM NQO	n.b.	3936	n.b.	n.b.	3990	3580

Tab. 52: Prozentuale Verteilung von V79-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit NQO beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle) und 4-HO-E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 sowie nach 30-minütiger Inkubation mit 20 µM OR-486 (+ H) und anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,05% DMSO und 4-HO-E2.

Konzentration 4-HO-E2 (µM)	MWG1/G0 (%)	STABW	MW S (%)	STABW	MW G2/M (%)	STABW
0	48,2	2,6	32,2	2,5	19,6	0,4
0 + H	47,1	2,0	33,8	2,0	19,1	1,4
5	48,3	3,4	31,7	3,1	20,0	0,2
5 + H	43,6	2,2	36,3	1,9	20,1	0,9
10	47,6	5,2	32,1	4,8	20,2	0,5
10 + H	42,2	0,8	37,0	0,6	20,8	0,7
20	48,3	3,9	27,9	6,8	23,8	3,3

Anhang

20 + H	38,4	0,3	36,9	1,7	24,7	1,4
40	46,0	1,1	32,9	2,9	21,1	1,8
40 + H	46,8	2,0	30,4	0,8	22,9	0,7
0,5 µM NQO	46,1	2,0	32,8	2,8	21,1	0,8

Einfluss von E2 auf die Zellzyklusverteilung

Tab. 53: Einfluss von E2 auf die Zellzyklusverteilung von V79 hCYP1A1-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 0,25 µM BaP beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle) und E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 und mit 20 µM OR-486 (+ H).

Konzentration E2 (µM)	G1/G0, V1	G1/G0, V2	G1/G0, V3
0	8009	8370	8527
0 + H	8885	8644	8100
0,1	8369	8079	8898
0,1 + H	8942	8568	8713
1	8030	8418	8760
1 + H	8957	8291	8695
0,25 µM BaP	8522	7827	8582
	S, V1	S, V2	S, V3
0	6591	6482	5503
0 + H	6108	5962	6049
0,1	6360	6004	6176
0,1 + H	6025	6186	6231
1	6734	6066	5875
1 + H	5952	6462	6285
0,25 µM BaP	6501	6420	6359
	G2/M, V1	G2/M, V2	G2/M, V3
0	3949	4050	3144
0 + H	3630	3451	2827
0,1	3114	2754	3164
0,1 + H	3559	3191	2896
1	3186	2997	2872
1 + H	3660	3413	2955
0,25 µM BaP	3181	3117	3737

Anhang

Tab. 54: Prozentuale Verteilung von V79 hCYP1A1-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 0,25 µM BaP beziehungsweise mit je 0,05% DMSO (0 µM, Lösungsmittelkontrolle) und E2 ohne COMT-Hemmer OR-486 und mit 20 µM OR-486 (+ H).

Konzentration E2 (µM)	MW G1/G0 (%)	STABW	MW S (%)	STABW	MW G2/M (%)	STABW
0	45,7	3,5	34,0	1,8	20,3	1,8
0 + H	47,8	0,1	33,8	1,6	18,4	1,5
0,1	47,9	0,9	35,1	1,0	17,1	0,6
0,1 + H	48,3	0,5	34,0	1,3	17,7	1,5
1	47,6	2,7	35,3	2,0	17,1	0,7
1 + H	47,5	1,6	34,2	1,9	18,3	1,7
0,25 µM BaP	45,9	0,9	35,6	1,5	18,5	1,3

Metabolitenprofil in V79-Zellen nach Behandlung mit 2-HO-E2

Tab. 55: Peakflächen nach 30-minütiger Inkubation von V79-Zellen mit 20 µM OR-486 (+ H) und 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,08; 2,5 µM und 5 µM 2-HO-E2. Dargestellt sind die extrahierten Quantifizier-Massenspuren der Übergänge 446>315 für die derivatisierten Methylierungsprodukte, 3-OMe-2-HO-E2 und 2-MeO-E2 und deren internen Standards 3-OMe-4-HO-E2 und 4-MeO-E2, sowie 504>373 für trimethylsilyliertes 2-HO-E2 und dessen internen Standard 4-HO-E2.

0,8 µM						
4-MeO-E2	7,566E+06	7,625E+06	8,117E+06	8,725E+06	1,095E+07	1,084E+07
3-OMe-2-HO-E2	5,728E+04	2,210E+04	2,042E+05	1,679E+05	7,384E+04	1,555E+05
2-MeO-E2	1,143E+06	1,241E+06	2,250E+06	3,006E+06	1,988E+06	2,124E+06
3-OMe-4-HO-E2	6,470E+05	8,998E+05	9,960E+05	1,172E+06	1,061E+06	1,228E+06
2-HO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
4-HO-E2	2,978E+04	4,636E+04	5,520E+04	1,806E+04	5,196E+04	4,180E+04
0,8 µM + H						
4-MeO-E2	6,179E+06	5,960E+06	2,678E+06	2,798E+06	1,218E+06	1,286E+06
3-OMe-2-HO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2-MeO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
3-OMe-4-HO-E2	4,998E+05	4,441E+05	8,811E+04	2,522E+04	1,319E+05	1,941E+05
2-HO-E2	n.n.	n.n.	1,592E+04	1,511E+04	7,801E+03	1,342E+03
4-HO-E2	4,460E+05	4,630E+05	2,165E+04	2,043E+04	4,784E+04	7,825E+04
2,5 µM						
4-MeO-E2	1,531E+06	1,297E+06	4,267E+06	3,542E+06	4,710E+06	5,432E+06
3-OMe-2-HO-E2	1,143E+06	1,299E+06	4,463E+06	4,067E+06	8,954E+06	8,745E+06
2-MeO-E2	2,329E+07	2,199E+07	8,069E+07	8,071E+07	1,632E+08	1,650E+08

Anhang

3-OMe-4-HO-E2	1,404E+05	1,205E+05	4,496E+05	4,570E+05	4,305E+05	5,255E+05
2-HO-E2	1,388E+04	6,464E+04	1,837E+05	1,689E+05	1,676E+05	1,614E+05
4-HO-E2	5,355E+04	7,936E+04	2,660E+04	2,390E+04	7,005E+04	1,575E+05
2,5 µM + H						
4-MeO-E2	3,782E+06	4,009E+06	8,008E+05	8,386E+05	6,121E+06	5,779E+06
3-OMe-2-HO-E2	2,840E+04	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2-MeO-E2	2,458E+04	7,830E+03	1,279E+05	1,101E+05	3,981E+05	5,171E+05
3-OMe-4-HO-E2	4,217E+05	3,841E+05	5,822E+05	7,150E+04	5,234E+05	5,947E+05
2-HO-E2	6,227E+04	2,188E+04	1,046E+04	3,151E+04	5,496E+05	6,080E+05
4-HO-E2	9,179E+04	6,713E+04	1,573E+04	2,972E+04	9,546E+05	8,493E+05
5 µM						
4-MeO-E2	6,766E+06	6,182E+06	5,510E+06	5,839E+06	4,242E+06	4,290E+06
3-OMe-2-HO-E2	9,762E+06	1,015E+07	2,277E+06	2,157E+06	1,780E+07	1,820E+07
2-MeO-E2	1,604E+08	1,617E+08	1,353E+07	1,281E+07	2,362E+08	2,278E+08
3-OMe-4-HO-E2	5,047E+05	6,167E+05	5,869E+05	5,876E+05	6,333E+05	6,971E+05
2-HO-E2	2,242E+05	2,126E+05	3,672E+06	2,477E+06	2,089E+05	1,530E+05
4-HO-E2	1,028E+05	5,367E+04	8,778E+05	7,782E+05	8,425E+04	7,754E+04
5 µM + H						
4-MeO-E2	5,256E+06	5,086E+06	2,336E+06	2,258E+06	5,084E+06	5,944E+06
3-OMe-2-HO-E2	n.n	1,381E+04	2,669E+04	n.n	7,951E+04	4,551E+04
2-MeO-E2	1,795E+05	1,839E+05	1,345E+05	1,689E+05	7,112E+05	9,722E+05
3-OMe-4-HO-E2	5,115E+05	5,128E+05	2,107E+05	3,782E+05	4,814E+05	5,320E+05
2-HO-E2	1,091E+05	7,206E+04	5,853E+04	2,147E+04	1,492E+05	1,355E+05
4-HO-E2	6,718E+05	5,893E+05	2,646E+05	2,196E+05	5,516E+05	6,845E+05

Metabolitenprofil in V79-Zellen nach Behandlung mit 4-HO-E2

Tab. 56: Peakflächen nach 30-minütiger Inkubation von V79-Zellen mit 20 µM OR-486 (+ H) und 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 5; 10 µM und 20 µM 4-HO-E2. Dargestellt sind die extrahierten Quantifizier-Massenspuren der Übergänge 446>315 für die derivatisierten Methylierungsprodukte, 3-OMe-4-HO-E2 und 4-MeO-E2 und deren internen Standards 3-OMe-2-HO-E2 und 2-MeO-E2, sowie 504>373 für trimethylsilyliertes 4-HO-E2 und dessen internen Standard 2-HO-E2.

5 µM						
4-MeO-E2	1,852E+08	1,76E+08	1,123E+08	1,086E+08	8,842E+07	8,739E+07
3-OMe-2-HO-E2	3,420E+07	3,07E+07	2,260E+07	2,312E+07	1,619E+07	1,542E+07
2-MeO-E2	4,199E+07	43260000	3,134E+07	3,034E+07	2,047E+07	2,002E+07
3-OMe-4-HO-E2	2,033E+06	2,46E+06	1,666E+06	1,873E+06	1,223E+06	1,013E+06
2-HO-E2	1,822E+05	271409	2,265E+05	1,938E+05	9,127E+04	1,937E+05

Anhang

4-HO-E2	3,356E+05	330736	3,330E+05	3,660E+05	1,899E+05	2,336E+05
5 µM + H						
4-MeO-E2	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n.
3-OMe-2-HO-E2	3,25E+07	3,21E+07	2,216E+07	2,203E+07	2,446E+07	2,468E+07
2-MeO-E2	4,352E+07	44970000	2,985E+07	2,894E+07	3,348E+07	3,362E+07
3-OMe-4-HO-E2	n.n.	n.n	n.n	n.n	n.n.	n.n.
2-HO-E2	218070	185671	73568	1,429E+05	569260	4,574E+05
4-HO-E2	149020	159470	67497	7,244E+04	95554	1,174E+05
10 µM						
4-MeO-E2	2,410E+08	2,387E+08	1,763E+08	1,789E+08	2,910E+08	2,859E+08
3-OMe-2-HO-E2	3,439E+07	3,795E+07	3,145E+07	3,134E+07	3,693E+07	3,486E+07
2-MeO-E2	4,558E+07	4,547E+07	4,065E+07	4,091E+07	5,091E+07	5,233E+07
3-OMe-4-HO-E2	6,161E+06	5,924E+06	4,943E+06	5,007E+06	5,516E+06	6,211E+06
2-HO-E2	172497	1,869E+05	82642	1,576E+05	955557	8,914E+05
4-HO-E2	628518	8,720E+05	383761	4,463E+05	598347	8,107E+05
10 µM + H						
4-MeO-E2	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n.
3-OMe-2-HO-E2	2,402E+07	2,451E+07	3,221E+07	3,080E+07	2,218E+07	2,124E+07
2-MeO-E2	3,269E+07	3,345E+07	4,068E+07	4,072E+07	2,834E+07	2,918E+07
3-OMe-4-HO-E2	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n	n.n.
2-HO-E2	171054	1,836E+05	160731	2,277E+05	852820	7,734E+05
4-HO-E2	182705	1,915E+05	157130	1,320E+05	158767	1,985E+05
20 µM						
4-MeO-E2	5,080E+07	4,972E+07	9,324E+07	9,263E+07	2,032E+07	1,884E+07
3-OMe-2-HO-E2	8,185E+06	7,881E+06	1,899E+07	2,042E+07	3,980E+06	3,688E+06
2-MeO-E2	1,124E+07	1,020E+07	2,805E+07	2,833E+07	4,489E+06	4,766E+06
3-OMe-4-HO-E2	4,130E+05	3,661E+05	1,963E+06	2,132E+06	1,513E+05	1,792E+05
2-HO-E2	35072	2,824E+04	6,906E+04	1,396E+05	3,273E+05	2,625E+05
4-HO-E2	523308	3,648E+05	7,658E+05	7,838E+05	1,336E+05	1,247E+05
20 µM + H						
4-MeO-E2	n.n	n.n	n.n	n.n.	n.n.	n.n.
3-OMe-2-HO-E2	3,463E+07	1,524E+07	1,550E+07	1,524E+07	4,860E+07	4,640E+07
2-MeO-E2	4,572E+07	1,987E+07	2,011E+07	1,986E+07	6,726E+07	6,366E+07
3-OMe-4-HO-E2	n.n.	n.n.	n.n	n.n.	n.n.	n.n.
2-HO-E2	160573	2,115E+05	111208	1,326E+05	2512000	2,320E+06
4-HO-E2	1399000	1,298E+06	356617	3,597E+05	1333000	1,367E+06
40 µM						
4-MeO-E2	3,639E+07	3,342E+07	3,684E+07	3,672E+07	7,074E+07	6,901E+07
3-OMe-2-HO-E2	1,878E+07	1,838E+07	2,093E+07	2,090E+07	3,656E+07	3,856E+07
2-MeO-E2	2,758E+07	2,539E+07	2,809E+07	2,771E+07	4,863E+07	4,990E+07
3-OMe-4-HO-E2	2,005E+06	1,885E+06	2,026E+06	2,357E+06	4,450E+06	4,263E+06
2-HO-E2	119751	8,780E+04	123225	9,929E+04	136462	1,302E+05
4-HO-E2	3013000	3,413E+06	3263000	3,388E+06	7156000	5,850E+06
40 µM + H						
4-MeO-E2	n.n	n.n.	n.n	n.n.	n.n.	n.n.
3-OMe-2-HO-E2	2,054E+07	2,146E+07	1,767E+07	1,760E+07	4,649E+07	4,616E+07
2-MeO-E2	2,728E+07	2,787E+07	2,264E+07	2,385E+07	5,606E+07	6,166E+07

Anhang

3-OMe-4-HO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2-HO-E2	83262	9,432E+04	141415	1,328E+05	105166	1,794E+05
4-HO-E2	2253000	2,237E+06	5335000	6,637E+06	5085000	4,936E+06

Metabolitenprofil nach Behandlung der V79 hCYP1A1-Zellen mit E2

Tab. 57: Peakflächen nach 30 minütiger Inkubation von V79 hCYP1A1-Zellen mit 20 µM OR-486 (+ H), anschließender 23,5-stündiger Co-Inkubation mit 0,1 und 1 µM E2 .Dargestellt sind die extrahierten Quantifizier-Massenspuren der Übergänge 416>285 für trimethylsilyliertes E2, 342>257 für trimethylsilyliertes E1, 504>373 für trimethylsilyliertes 2- und 4-HO-E2 sowie 446>315 für die derivatisierten Methylierungsprodukte 2- und 4-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2.

0,1 µM						
E2	1,035E+08	9,990E+07	1,692E+08	1,472E+08	1,119E+08	1,028E+08
D-E2	1,500E+08	1,549E+08	1,669E+08	1,538E+08	1,750E+08	1,534E+08
4-MeO-E2	1,666E+05	2,382E+05	3,865E+05	3,813E+05	1,819E+05	7,483E+04
D-4-MeO-E2	4,106E+05	4,933E+05	4,235E+05	5,646E+05	7,227E+05	7,263E+05
3-OMe-2-HO-E2	8,412E+04	1,003E+05	1,084E+05	1,262E+05	5,005E+04	8,609E+04
D-3-OMe-2-HO-E2	2,292E+06	1,985E+06	2,644E+06	2,590E+06	2,544E+06	2,292E+06
2-MeO-E2	9,117E+05	7,123E+05	3,696E+06	3,325E+06	8,684E+05	9,641E+05
D-2-MeO-E2	3,311E+06	3,166E+06	3,536E+06	3,637E+06	3,971E+06	3,122E+06
2-HO-E2	1,341E+05	1,174E+05	3,461E+05	1,168E+05	1,142E+05	1,638E+05
D-2-HO-E2	3,449E+05	2,452E+05	4,525E+05	4,306E+05	5,168E+05	4,958E+05
4-HO-E2	6,053E+03	0,000E+00	3,957E+04	2,147E+04	3,320E+04	4,122E+04
E1	9,834E+06	9,461E+06	1,971E+07	1,842E+07	1,150E+07	1,082E+07
0,1 µM + H						
E2	1,685E+08	1,482E+08	1,519E+08	1,353E+08	1,614E+08	1,495E+08
D-E2	3,627E+08	3,110E+08	1,735E+08	1,619E+08	1,590E+08	1,560E+08
4-MeO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-4-MeO-E2	1,452E+06	1,257E+06	5,567E+05	4,886E+05	5,174E+05	6,855E+05
3-OMe-2-HO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-3-OMe-2-HO-E2	8,262E+06	7,144E+06	3,488E+06	3,434E+06	2,862E+06	2,744E+06
2-MeO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-2-MeO-E2	1,247E+07	1,154E+07	5,569E+06	5,323E+06	4,098E+06	4,416E+06
2-HO-E2	3,180E+04	5,906E+04	3,097E+04	2,934E+04	1,542E+05	4,617E+04
D-2-HO-E2	7,399E+05	6,645E+05	2,143E+05	3,289E+05	2,310E+05	2,569E+05
4-HO-E2	2,153E+03	7,655E+03	0,000E+00	2,344E+04	8,152E+04	1,052E+04
E1	2,080E+07	1,797E+07	1,740E+07		1,496E+07	1,446E+07
1 µM						
E2	1,062E+08	1,006E+08	6,628E+07	6,625E+07	3,092E+08	3,135E+08
D-E2	1,247E+07	1,204E+07	8,273E+06	7,621E+06	3,872E+07	4,012E+07
4-MeO-E2	3,488E+05	2,628E+05	9,211E+04	3,184E+04	4,822E+05	5,499E+05
D-4-MeO-E2	2,226E+04	3,286E+04	1,190E+04	1,646E+04	6,548E+04	6,012E+04
3-OMe-2-HO-E2	5,914E+04	1,220E+05	5,282E+04	2,126E+04	1,669E+05	3,443E+05
D-3-OMe-2-HO-E2	4,956E+05	4,539E+05	3,624E+05	2,539E+05	1,945E+06	2,019E+06
2-MeO-E2	3,380E+06	3,515E+06	1,224E+06	1,387E+06	8,599E+06	8,761E+06

Anhang

D-2-MeO-E2	5,114E+05	7,115E+05	4,141E+05	3,652E+05	2,771E+06	2,836E+06
2-HO-E2	1,186E+05	1,405E+05	3,688E+04	6,715E+04	1,510E+05	1,551E+05
D-2-HO-E2	2,610E+04	1,999E+04	1,879E+04	1,008E+04	2,721E+05	3,944E+04
4-HO-E2			1,189E+05	1,515E+05	2,721E+05	2,035E+05
E1	1,434E+07	1,323E+07	7,448E+06	6,950E+06	1,34E+06	4,540E+07
1 µM + H						
E2	1,584E+08	1,535E+08	7,974E+07	1,683E+08	4,290E+08	4,061E+08
D-E2	1,717E+07	1,648E+07	8,671E+06	1,859E+07	4,877E+07	4,538E+07
4-MeO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-4-MeO-E2	6,977E+04	5,636E+04	2,640E+04	8,263E+04	1,766E+05	2,002E+05
3-OMe-2-HO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-3-OMe-2-HO-E2	6,315E+05	6,036E+05	3,290E+05	6,811E+05	2,243E+06	2,352E+06
2-MeO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-2-MeO-E2	8,670E+05	6,879E+05	3,285E+05	9,625E+05	3,040E+06	2,975E+06
2-HO-E2	4,347E+03	2,500E+04	0,000E+00	1,232E+04	3,130E+04	2,804E+04
D-2-HO-E2	2,214E+04	5,977E+04	7,975E+05	1,891E+04	6,705E+04	8,251E+04
4-HO-E2	0,000E+00	2,148E+04	9,119E+05	6,898E+03	2,894E+04	1,861E+04
E1	1,692E+07	n.n.	8,804E+06	1,619E+07	5,547E+07	5,409E+07

Tab. 58: Peakflächen nach 30 minütiger Inkubation von V79 hCYP1A1-Zellen mit 20 µM OR-486 (+ H), anschließender 21-tägiger Co-Inkubation mit 0,1 und 1 µM E2 .Dargestellt sind die extrahierten Quantifier-Massenspuren der Übergänge 416>285 für trimethylsilyliertes E2, 342>257 für trimethylsilyliertes E1, 504>373 für trimethylsilyliertes 2- und 4-HO-E2 sowie 446>315 für die derivatisierten Methylierungsprodukte 2- und 4-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2.

0,1 µM						
E2	8,571E+07	8,114E+07	8,706E+07	8,497E+07	2,581E+07	2,43E+07
D-E2	1,042E+08	1,010E+08	1,062E+08	1,060E+08	1,551E+07	1,83E+07
4-MeO-E2	7,548E+04	1,152E+05	1,284E+05	1,402E+05	3,950E+04	3,274E+04
D-4-MeO-E2	2,976E+05	3,619E+05	3,662E+05	3,344E+05	4,881E+04	4,000E+04
3-OMe-2-HO-E2	4,866E+04	2,903E+04	4,651E+04	5,270E+04	1,573E+04	2,046E+04
D-3-OMe-2-HO-E2	6,854E+05	8,154E+05	6,952E+05	8,045E+05	8,536E+04	8,850E+05
2-MeO-E2	4,525E+05	4,670E+05	2,727E+05	3,690E+05	2,178E+05	2,393E+05
D-2-MeO-E2	5,792E+05	5,822E+05	6,644E+05	6,230E+05	2,073E+05	1,220E+06
2-HO-E2	2,064E+05	2,163E+05	1,255E+05	1,497E+05	1,460E+04	3,308E+04
D-2-HO-E2	5,400E+05	4,470E+05	6,170E+05	4,503E+05	1,855E+04	2,093E+05
4-HO-E2	3,855E+04	3,070E+04	3,816E+04	5,248E+04	n.n.	n.n.
E1	1,127E+07	1,112E+07	1,113E+07	1,150E+07	3,267E+06	n.n.
0,1 µM + Hemmer						
E2	1,260E+08	1,260E+08	1,186E+08	1,183E+08	1,369E+08	1,277E+08
D-E2	1,157E+08	1,133E+08	1,257E+08	1,197E+08	1,243E+08	1,228E+08
4-MeO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-4-MeO-E2	4,941E+05	3,423E+05	5,209E+05	4,270E+05	3,908E+05	4,620E+05
3-OMe-2-HO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-3-OMe-2-HO-E2	1,599E+06	1,652E+06	1,566E+06	1,601E+06	2,022E+06	2,068E+06
2-MeO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-2-MeO-E2	2,637E+06	2,721E+06	2,145E+06	2,343E+06	3,178E+06	2,431E+06

Anhang

2-HO-E2	7,309E+04	2,193E+04	3,894E+04	5,724E+04	1,101E+05	2,426E+04
D-2-HO-E2	3,856E+05	3,273E+05	4,471E+05	4,144E+05	4,202E+05	3,782E+05
4-HO-E2	n.n.	2,504E+03	5,184E+04	3,542E+04	n.n.	n.n.
E1	1,240E+07	n.n.	1,446E+07	1,266E+07	1,427E+07	1,316E+07
1 µM						
E2	6,047E+08	5,962E+08	6,047E+08	5,936E+08	9,194E+08	8,745E+08
D-E2	4,843E+07	4,787E+07	4,843E+07	4,734E+07	1,083E+08	1,044E+08
4-MeO-E2	5,402E+05	5,967E+05	5,402E+05	4,841E+05	5,998E+05	6,377E+05
D-4-MeO-E2	1,322E+05	2,024E+05	1,322E+05	1,163E+05	4,159E+05	2,827E+05
3-OMe-2-HO-E2	3,150E+05	3,690E+05	3,150E+05	3,366E+05	2,877E+05	3,712E+05
D-3-OMe-2-HO-E2	1,066E+06	1,081E+06	1,066E+06	9,703E+05	6,988E+05	6,353E+05
2-MeO-E2	1,037E+07	9,905E+06	1,037E+07	1,097E+07	3,142E+06	2,890E+06
D-2-MeO-E2	1,856E+06	1,626E+06	1,856E+06	1,733E+06	8,852E+05	6,582E+05
2-HO-E2	2,367E+05	1,654E+05	2,367E+05	2,192E+05	1,457E+06	1,434E+06
D-2-HO-E2	5,531E+04	3,083E+04	5,531E+04	4,749E+04	4,866E+05	4,044E+05
4-HO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	3,583E+05	1,644E+05
E1	7,933E+07	8,103E+07	7,933E+07	7,717E+07	1,237E+08	1,131E+08
1 µM + Hemmer						
E2	4,528E+08	4,368E+08	2,875E+08	2,88E+08	4,267E+08	4,220E+08
D-E2	3,601E+07	3,425E+07	2,172E+07	2,18E+07	3,511E+07	3,293E+07
4-MeO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-4-MeO-E2	1,413E+05	1,013E+05	9,308E+04	102558	6,292E+04	1,178E+05
3-OMe-2-HO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-3-OMe-2-HO-E2	7,768E+05	8,260E+05	4,935E+05	4,90E+05	6,629E+05	8,531E+05
2-MeO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-2-MeO-E2	1,235E+06	1,204E+06	8,577E+05	8,58E+05	1,346E+06	1,322E+06
2-HO-E2	5,057E+04	7,868E+04	4,322E+04	4,319E+04	2,241E+04	6,224E+04
D-2-HO-E2	4,157E+04	4,049E+04	2,266E+04	2,382E+04	4,846E+04	2,346E+04
4-HO-E2	4,066E+04	2,387E+04	3,638E+04	3,570E+04	7,948E+03	5,092E+03
E1	5,462E+07	n.n.	3,170E+07	3,057E+07	5,092E+07	4,879E+07

Tab. 59: Peakflächen nach 30 minütiger Inkubation von V79 hCYP1A1-Zellen mit 20 µM OR-486 (+ H), anschließender 21-tägiger Co-Inkubation mit 0,1 und 1 µM E2 .Dargestellt sind die extrahierten Quantifier-Massenspuren der Übergänge 416>285 für trimethylsilyliertes E2, 342>257 für trimethylsilyliertes E1, 504>373 für trimethylsilyliertes 2- und 4-HO-E2 sowie 446>315 für die derivatisierten Methylierungsprodukte 2- und 4-MeO-E2 und 3-OMe-2-HO-E2.

0,1 µM						
E2	6,840E+07	7,001E+07	1,265E+08	1,194E+08	7,576E+07	7,115E+07
D-E2	9,433E+07	9,921E+07	1,553E+08	1,506E+08	1,008E+08	9,703E+07
4-MeO-E2	8,649E+04	8,675E+04	1,917E+05	2,942E+05	1,075E+05	1,577E+05
D-4-MeO-E2	2,892E+05	3,914E+05	8,098E+05	6,690E+05	2,899E+05	2,931E+05
3-OMe-2-HO-E2	1,291E+05	1,186E+05	1,171E+05	1,501E+05	7,489E+04	7,544E+04
D-3-OMe-2-HO-E2	8,132E+05	9,197E+05	2,893E+06	2,967E+06	9,747E+05	9,687E+05
2-MeO-E2	6,706E+05	5,386E+05	9,778E+05	8,694E+05	6,906E+05	5,333E+05
D-2-MeO-E2	1,225E+06	1,347E+06	4,839E+06	3,867E+06	1,404E+06	1,266E+06
2-HO-E2	1,250E+05	1,259E+05	3,727E+05	2,457E+05	1,834E+05	1,340E+05

Anhang

D-2-HO-E2	3,486E+05	3,481E+05	5,405E+05	3,791E+05	4,341E+05	4,139E+05
4-HO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	3,805E+04	2,844E+04	5,808E+04
E1	9,416E+06	9,387E+06	1,627E+07	1,695E+07	1,026E+07	9,727E+06
0,1 µM + Hemmer						
E2	1,197E+08	1,128E+08	7,611E+07	7,390E+07	1,257E+08	1,127E+08
D-E2	1,054E+08	1,063E+08	8,367E+07	7,898E+07	1,142E+08	1,069E+08
4-MeO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-4-MeO-E2	4,182E+05	3,801E+05	1,465E+05	2,449E+05	2,337E+05	3,604E+05
3-OMe-2-HO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-3-OMe-2-HO-E2	2,946E+06	2,673E+06	1,359E+06	1,314E+06	2,521E+06	2,868E+06
2-MeO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-2-MeO-E2	4,000E+06	3,628E+06	1,971E+06	1,874E+06	4,428E+06	4,051E+06
2-HO-E2	8,828E+04	2,898E+04	1,718E+04	6,141E+04	4,993E+04	4,125E+04
D-2-HO-E2	2,465E+05	2,284E+05	1,418E+05	1,032E+05	2,577E+05	2,077E+05
4-HO-E2	7,873E+04	2,918E+03	3,963E+04	5,903E+03	4,652E+04	8,611E+04
E1	1,160E+07		8,316E+06	7,470E+06	1,316E+07	1,177E+07
1 µM						
E2	5,618E+07	2,012E+08	3,283E+08	3,112E+08	3,054E+08	3,218E+08
D-E2	4,357E+06	1,644E+07	2,799E+07	2,756E+07	2,777E+07	2,816E+07
4-MeO-E2	3,124E+03	4,267E+04	9,258E+04	6,565E+04	4,510E+04	1,440E+05
D-4-MeO-E2	1931	8,074E+04	5,487E+04	9,143E+04	1,129E+05	1,244E+05
3-OMe-2-HO-E2	3,008E+03	3,639E+04	4,584E+04	6,593E+04	9,134E+04	3,680E+04
D-3-OMe-2-HO-E2	1,47E+05	5,911E+05	8,839E+05	7,908E+05	8,448E+05	8,105E+05
2-MeO-E2	1,173E+05	3,256E+05	5,897E+05	5,774E+05	5,617E+05	3,906E+05
D-2-MeO-E2	1,86E+05	8,720E+05	1,405E+06	1,414E+06	1,728E+06	1,154E+06
2-HO-E2	4,237E+04	2,029E+05	3,438E+05	3,133E+05	3,157E+05	2,633E+05
D-2-HO-E2	5,254E+04	1,771E+05	1,228E+05	2,708E+05	2,177E+05	2,057E+05
4-HO-E2	1,664E+04	4,878E+04	6,425E+04	8,010E+04	1,183E+04	4,800E+04
E1	6,237E+06	2,375E+07	4,041E+07	3,939E+07	3,994E+07	4,037E+07
1 µM + Hemmer						
E2	6,528E+08	1,245E+09	1,245E+09	1,144E+09	1,364E+09	1,242E+09
D-E2	6,760E+07	1,196E+08	1,189E+08	1,081E+08	1,428E+08	1,349E+08
4-MeO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-4-MeO-E2	2,489E+05	5,474E+05	5,484E+05	3,338E+05	5,938E+05	4,191E+05
3-OMe-2-HO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-3-OMe-2-HO-E2	1,355E+06	2,260E+06	2,260E+06	2,321E+06	1,549E+06	1,238E+06
2-MeO-E2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
D-2-MeO-E2	2,118E+06	4,120E+06	4,117E+06	3,345E+06	2,376E+06	1,926E+06
2-HO-E2	8,581E+04	1,504E+05	1,504E+05	2,667E+05	3,662E+05	3,849E+05
D-2-HO-E2	7,301E+04	2,892E+05	2,892E+05	2,673E+05	5,949E+05	2,113E+05
4-HO-E2	3,624E+04	1,196E+05	1,195E+05	5,871E+04	3,097E+05	2,561E+05
E1	7,613E+07	1,386E+08	1,386E+08	1,243E+08	1,509E+08	1,307E+08

Literaturverzeichnis

- DIN 32645:2008-11: Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung., *Beuth Verlag*, Berlin.
- Aizu-Yokota, E., Susaki, A. und Sato, Y. (1995). Natural estrogens induce modulation of microtubules in Chinese hamster V79 cells in culture. *Cancer Res*, **55**(9), 1863-1868.
- Attalla, H., Makela, T. P., Adlercreutz, H. und Andersson, L. C. (1996). 2-Methoxyestradiol arrests cells in mitosis without depolymerizing tubulin. *Biochem Biophys Res Commun*, **228**(2), 467-473.
- Backstrom, R., Honkanen, E., Pippuri, A., Kairisalo, P., Pystynen, J., Heinola, K., Nissinen, E., Linden, I. B., Mannisto, P. T. und Kaakkola, S. (1989). Synthesis of some novel potent and selective catechol O-methyltransferase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, **32**(4), 841-846.
- Badawi, A. F., Cavalieri, E. L. und Rogan, E. G. (2001). Role of human cytochrome P450 1A1, 1A2, 1B1, and 3A4 in the 2-, 4-, and 16alpha-hydroxylation of 17beta-estradiol. *Metabolism*, **50**(9), 1001-1003.
- Banduhn, N. und 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.
- Bekier, M. E., Fischbach, R., Lee, J. und Taylor, W. R. (2009). Length of mitotic arrest induced by microtubule-stabilizing drugs determines cell death after mitotic exit. *Mol Cancer Ther*, **8**(6), 1646-1654.
- Borges, N., Vieira-Coelho, M. A., Parada, A. und Soares-da-Silva, P. (1997). Studies on the tight-binding nature of tolcapone inhibition of soluble and membrane-bound rat brain catechol-O-methyltransferase. *J Pharmacol Exp Ther*, **282**(2), 812-817.
- Bradley, M. O., Bhuyan, B., Francis, M. C., Langenbach, R., Peterson, A. und Huberman, E. (1981). Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res*, **87**(2), 81-142.
- Brugger, E. M., Wagner, J., Schumacher, D. M., Koch, K., Podlech, J., Metzler, M. und Lehmann, L. (2006). Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Toxicol Lett*, **164**(3), 221-230.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J. P., Ravanat, J. L. und Sauvaigo, S. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res*, **424**(1-2), 9-21.
- Cao, K., Devanesan, P. D., Ramanathan, R., Gross, M. L., Rogan, E. G. und Cavalieri, E. L. (1998). Covalent binding of catechol estrogens to glutathione catalyzed by horseradish peroxidase, lactoperoxidase, or rat liver microsomes. *Chem Res Toxicol*, **11**(8), 917-924.
- Cavalieri, E. L. und Rogan, E. G. (2010). Depurinating estrogen-DNA adducts in the etiology and prevention of breast and other human cancers. *Future oncology (London, England)*, **6**(1), 75-91.

- Cavalieri, E. L. und Rogan, E. G. (2011). Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the etiology and prevention of human cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **125**(3-5), 169-180.
- Chakravarti, D., Mailander, P. C., Li, K. M., Higginbotham, S., Zhang, H. L., Gross, M. L., Meza, J. L., Cavalieri, E. L. und Rogan, E. G. (2001). Evidence that a burst of DNA depurination in SENCAR mouse skin induces error-prone repair and forms mutations in the H-ras gene. *Oncogene*, **20**(55), 7945-7953.
- Chu, E. H. und Malling, H. V. (1968). Mammalian cell genetics. II. Chemical induction of specific locus mutations in Chinese hamster cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **61**(4), 1306-1312.
- Clemens, J. (1995). Gene Mutation Assays in Mammalian Cells. *In Vitro Toxicity Testing Protocols (Methods in Molecular Biology)*, **43**, 277-286.
- D'Amato, R. J., Lin, C. M., Flynn, E., Folkman, J. und Hamel, E. (1994). 2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(9), 3964-3968.
- Davies, M. J., Phillips, B. J., Anderson, D. und Rumsby, P. C. (1993). Molecular analysis of mutation at the hprt locus of Chinese hamster V79 cells induced by ethyl methanesulphonate and mitomycin C. *Mutat Res*, **291**(2), 117-124.
- Dawling, S., Hachey, D. L., Roodi, N. und Parl, F. F. (2004). In vitro model of mammary estrogen metabolism: structural and kinetic differences between catechol estrogens 2- and 4-hydroxyestradiol. *Chem Res Toxicol*, **17**(9), 1258-1264.
- Dawling, S., Roodi, N., Mernaugh, R. L., Wang, X. und Parl, F. F. (2001). Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms. *Cancer Res*, **61**(18), 6716-6722.
- Dawling, S., Roodi, N. und Parl, F. F. (2003). Methoxyestrogens exert feedback inhibition on cytochrome P450 1A1 and 1B1. *Cancer research*, **63**(12), 3127-3132.
- Diaz, D., Scott, A., Carmichael, P., Shi, W. und Costales, C. (2007). Evaluation of an automated in vitro micronucleus assay in CHO-K1 cells. *Mutat Res*, **630**(1-2), 1-13.
- Doehmer, J. (1993). V79 Chinese hamster cells genetically engineered for cytochrome P450 and their use in mutagenicity and metabolism studies. *Toxicology*, **82**(1-3), 105-118.
- Drevon, C., Piccoli, C. und Montesano, R. (1981). Mutagenicity assays of estrogenic hormones in mammalian cells. *Mutat Res*, **89**(1), 83-90.
- Eckert, I. und Stopper, H. (1996). Genotoxic effects induced by beta-oestradiol in vitro. *Toxicol In Vitro*, **10**(5), 637-642.
- EFSA (2011). Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment *EFSA Journal*, **9**(9), 1-68.
- Epe, B., Hegler, J. und Metzler, M. (1987). Site-specific covalent binding of stilbene-type and steroidal estrogens to tubulin following metabolic activation in vitro. *Carcinogenesis*, **8**(9), 1271-1275.

- Freudenberger, J. (2009). Aktivitätsbestimmung cytosolischer Catechol-O-Methyltransferase aus V79-Zellen und enzymatische Präparation methylierter Catecholestrogene. Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Lebensmitteltoxikologie, Universität Karlsruhe (TH).
- Fussell, K. C., Udasin, R. G., Smith, P. J., Gallo, M. A. und Laskin, J. D. (2011). Catechol metabolites of endogenous estrogens induce redox cycling and generate reactive oxygen species in breast epithelial cells. *Carcinogenesis*, **32**(8), 1285-1293.
- Gerstner, S., Glasemann, D., Pfeiffer, E. und Metzler, M. (2008). The influence of metabolism on the genotoxicity of catecholestrogens in three cultured cell lines. *Mol. Nutr. Food Res.*, **52**(7), 823-829.
- Goodman, J. E., Jensen, L. T., He, P. und Yager, J. D. (2002). Characterization of human soluble high and low activity catechol-O-methyltransferase catalyzed catechol estrogen methylation. *Pharmacogenetics*, **12**(7), 517-528.
- Gorbsky, G. J. (1997). Cell cycle checkpoints: arresting progress in mitosis. *Bioessays*, **19**(3), 193-197.
- Gui, Y. und Zheng, X. L. (2006). 2-methoxyestradiol induces cell cycle arrest and mitotic cell apoptosis in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, **47**(2), 271-280.
- Haghdoost, S., Czene, S., Naslund, I., Skog, S. und Harms-Ringdahl, M. (2005). Extracellular 8-oxo-dG as a sensitive parameter for oxidative stress in vivo and in vitro. *Free Radic Res*, **39**(2), 153-162.
- Han, X. und Liehr, J. G. (1994a). 8-Hydroxylation of guanine bases in kidney and liver DNA of hamsters treated with estradiol: role of free radicals in estrogen-induced carcinogenesis. *Cancer Res*, **54**(21), 5515-5517.
- Han, X. und Liehr, J. G. (1994b). DNA single-strand breaks in kidneys of Syrian hamsters treated with steroidal estrogens: hormone-induced free radical damage preceding renal malignancy. *Carcinogenesis*, **15**(5), 997-1000.
- Han, X. und Liehr, J. G. (1995). Microsome-mediated 8-hydroxylation of guanine bases of DNA by steroid estrogens: correlation of DNA damage by free radicals with metabolic activation to quinones. *Carcinogenesis*, **16**(10), 2571-2574.
- Hayes, C. L., Spink, D. C., Spink, B. C., Cao, J. Q., Walker, N. J. und Sutter, T. R. (1996). 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(18), 9776-9781.
- Ho, S. M. und Roy, D. (1994). Sex hormone-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation in the dorsolateral prostates of Noble rats. *Cancer Lett*, **84**(2), 155-162.
- IARC (2010). Globocan 2008 v 2.0. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10, <http://globocan.iarc.fr>, Stand: 29.11.2013.
- IARC (2012). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: A review of human carcinogens. Part A: Pharmaceuticals. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum*, **100A**.
- Jordan, M. A., Thrower, D. und Wilson, L. (1992). Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *Journal of cell science*, **102 (Pt 3)**, 401-416.

- Kamath, K., Okouneva, T., Larson, G., Panda, D., Wilson, L. und Jordan, M. A. (2006). 2-Methoxyestradiol suppresses microtubule dynamics and arrests mitosis without depolymerizing microtubules. *Mol Cancer Ther*, **5**(9), 2225-2233.
- Kastan, M. B. und Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, **432**(7015), 316-323.
- Kaufmann, W. K. und Paules, R. S. (1996). DNA damage and cell cycle checkpoints. *FASEB J*, **10**(2), 238-247.
- Kisselev, P., Schunck, W. H., Roots, I. und Schwarz, D. (2005). Association of CYP1A1 polymorphisms with differential metabolic activation of 17beta-estradiol and estrone. *Cancer Res*, **65**(7), 2972-2978.
- Klicka, J. K., Li, S. A. und Li, J. J. (1983). Influence of estrogens on peroxidase activity in the Syrian hamster liver, kidney, and renal adenocarcinoma. *Biochem Pharmacol*, **32**(3), 497-501.
- Kong, L. Y., Szaniszló, P., Albrecht, T. und Liehr, J. G. (2000). Frequency and molecular analysis of hprt mutations induced by estradiol in Chinese hamster V79 cells. *Int J Oncol*, **17**(6), 1141-1149.
- Krenitsky, T. A., Papaioannou, R. und Elion, G. B. (1969). Human hypoxanthine phosphoribosyltransferase. I. Purification, properties, and specificity. *J Biol Chem*, **244**(5), 1263-1270.
- Lang, R. und Redmann, U. (1979). Non-mutagenicity of some sex hormones in the Ames salmonella/microsome mutagenicity test. *Mutat Res*, **67**(4), 361-365.
- Lautala, P., Ulmanen, I. und Taskinen, J. (2001). Molecular mechanisms controlling the rate and specificity of catechol O-methylation by human soluble catechol O-methyltransferase. *Mol Pharmacol*, **59**(2), 393-402.
- Lavigne, J. A., Goodman, J. E., Fonong, T., Odwin, S., He, P., Roberts, D. W. und Yager, J. D. (2001). The effects of catechol-O-methyltransferase inhibition on estrogen metabolite and oxidative DNA damage levels in estradiol-treated MCF-7 cells. *Cancer research*, **61**(20), 7488-7494.
- Lehmann, L., Jiang, L. und Wagner, J. (2008). Soy isoflavones decrease the catechol-O-methyltransferase-mediated inactivation of 4-hydroxyestradiol in cultured MCF-7 cells. *Carcinogenesis*, **29**(2), 363-370.
- Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F., Jr. und Yang, L. L. (1987). A guide for the performance of the Chinese hamster ovary cell/hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene mutation assay. *Mutation Research*, **189**(2), 135-141.
- Li, S. A., Purdy, R. H. und Li, J. J. (1989). Variations in catechol O-methyltransferase activity in rodent tissues: possible role in estrogen carcinogenicity. *Carcinogenesis*, **10**(1), 63-67.
- Li, Y., Trush, M. A. und Yager, J. D. (1994). DNA damage caused by reactive oxygen species originating from a copper-dependent oxidation of the 2-hydroxy catechol of estradiol. *Carcinogenesis*, **15**(7), 1421-1427.

- Liehr, J. G. (1990). Genotoxic effects of estrogens. *Mutat Res*, **238**(3), 269-276.
- Liehr, J. G. (2000). Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocrine reviews*, **21**(1), 40-54.
- Liehr, J. G. (2001). Genotoxicity of the steroidal oestrogens oestrone and oestradiol: possible mechanism of uterine and mammary cancer development. *Hum Reprod Update*, **7**(3), 273-281.
- Liu, R. H., Foster, G., Cone, E. J. und Kumar, S. D. (1995). Selecting an appropriate isotopic internal standard for gas chromatography/mass spectrometry analysis of drugs of abuse--pentobarbital example. *Journal of forensic sciences*, **40**(6), 983-989.
- Mailander, P. C., Meza, J. L., Higginbotham, S. und Chakravarti, D. (2006). Induction of A.T to G.C mutations by erroneous repair of depurinated DNA following estrogen treatment of the mammary gland of ACI rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **101**(4-5), 204-215.
- Mannisto, P. T. und Kaakkola, S. (1999). Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol Rev*, **51**(4), 593-628.
- Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*, **424**(1-2), 83-95.
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, **21**(3), 361-370.
- Marnett, L. J., Riggins, J. N. und West, J. D. (2003). Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. *J Clin Invest*, **111**(5), 583-593.
- McGregor, D. B., Edwards, I., Wolf, C. R., Forrester, L. M. und Caspary, W. J. (1991). Endogenous xenobiotic enzyme levels in mammalian cells. *Mutat Res*, **261**(1), 29-39.
- Melvin, T., Cunniffe, S. M., O'Neill, P., Parker, A. W. und Roldan-Arjona, T. (1998). Guanine is the target for direct ionisation damage in DNA, as detected using excision enzymes. *Nucleic Acids Res*, **26**(21), 4935-4942.
- Metzler, M. und Pfeiffer, E. (1995). Effects of estrogens on microtubule polymerization in vitro: correlation with estrogenicity. *Environ Health Perspect*, **103 Suppl 7**, 21-22.
- Moraes, M. C. S., Neto, J. B. C. und Menck, C. F. M. (2012). DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, **17**, 1362-1388.
- Newbold, R. R. und Liehr, J. G. (2000). Induction of uterine adenocarcinoma in CD-1 mice by catechol estrogens. *Cancer Res*, **60**(2), 235-237.
- O'Halloran, S. und Ilett, K. F. (2008). Evaluation of a deuterium-labeled internal standard for the measurement of sirolimus by high-throughput HPLC electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clinical chemistry*, **54**(8), 1386-1389.
- OECD (1997). Guideline for the testing of chemicals: *In vitro* mammalian cell gene mutation test. .

- OECD (2010). Guideline for the testing of chemicals: In vitro mammalian cell micronucleus test.
- Peltoketo, H., Luu-The, V., Simard, J. und Adamski, J. (1999). 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes. *J Mol Endocrinol*, **23**(1), 1-11.
- Rajapakse, N., Butterworth, M. und Kortenkamp, A. (2005). Detection of DNA strand breaks and oxidized DNA bases at the single-cell level resulting from exposure to estradiol and hydroxylated metabolites. *Environ Mol Mutagen*, **45**(4), 397-404.
- Rohnstock, L. (2006). Untersuchungen zum Einfluss von 17β-Estradiol und Isoflavonen auf oxidativen Stress in kultivierten Zellen. Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Lebensmitteltoxikologie, Universität Karlsruhe (TH).
- Roy, D. und Liehr, J. G. (1999). Estrogen, DNA damage and mutations. *Mutat Res*, **424**(1-2), 107-115.
- Roy, D., Weisz, J. und Liehr, J. G. (1990). The O-methylation of 4-hydroxyestradiol is inhibited by 2-hydroxyestradiol: implications for estrogen-induced carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **11**(3), 459-462.
- Schlechtweg, A. (2011). Etablierung einer RT-PCR basierten Methode zur Bestimmung des Mutationsspektrums des *hprt*-Gens. Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Schmalix, W. A., Maser, H., Kiefer, F., Reen, R., Wiebel, F. J., Gonzalez, F., Seidel, A., Glatt, H., Greim, H. und Doehmer, J. (1993). Stable expression of human cytochrome P450 1A1 cDNA in V79 Chinese hamster cells and metabolic activation of benzo[a]pyrene. *Eur J Pharmacol*, **248**(3), 251-261.
- Schumacher, D. M., Metzler, M. und Lehmann, L. (2005). Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. *Arch Toxicol*, **79**(2), 110-121.
- Spink, D. C., Eugster, H. P., Lincoln, D. W., 2nd, Schuetz, J. D., Schuetz, E. G., Johnson, J. A., Kaminsky, L. S. und Gierthy, J. F. (1992). 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1A1: a comparison of the activities induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in MCF-7 cells with those from heterologous expression of the cDNA. *Archives of biochemistry and biophysics*, **293**(2), 342-348.
- Spink, D. C., Spink, B. C., Cao, J. Q., DePasquale, J. A., Pentecost, B. T., Fasco, M. J., Li, Y. und Sutter, T. R. (1998). Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells. *Carcinogenesis*, **19**(2), 291-298.
- Stack, D. E., Li, G., Hill, A. und Hoffman, N. (2008). Mechanistic insights into the Michael addition of deoxyguanosine to catechol estrogen-3,4-quinones. *Chemical research in toxicology*, **21**(7), 1415-1425.
- Stokvis, E., Rosing, H. und Beijnen, J. H. (2005). Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? *Rapid Commun Mass Spectrom*, **19**(3), 401-407.

- Stopper, H., Eckert, I., Schiffmann, D., Spencer, D. L. und Caspary, W. J. (1994). Is micronucleus induction by aneugens an early event leading to mutagenesis? *Mutagenesis*, **9**(5), 411-416.
- Stopper, H. und Muller, S. O. (1997). Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, **11**(5), 661-667.
- Stout, J. T. und Caskey, C. T. (1985). HPRT: gene structure, expression, and mutation. *Annu Rev Genet*, **19**, 127-148.
- Tsutsui, T., Tamura, Y., Hagiwara, M., Miyachi, T., Hikiba, H., Kubo, C. und Barrett, J. C. (2000a). Induction of mammalian cell transformation and genotoxicity by 2-methoxyestradiol, an endogenous metabolite of estrogen. *Carcinogenesis*, **21**(4), 735-740.
- Tsutsui, T., Tamura, Y., Yagi, E. und Barrett, J. C. (2000b). Involvement of genotoxic effects in the initiation of estrogen-induced cellular transformation: studies using Syrian hamster embryo cells treated with 17beta-estradiol and eight of its metabolites. *Int J Cancer*, **86**(1), 8-14.
- Turan, V. K., Sanchez, R. I., Li, J. J., Li, S. A., Reuhl, K. R., Thomas, P. E., Conney, A. H., Gallo, M. A., Kauffman, F. C. und Mesia-Vela, S. (2004). The effects of steroidal estrogens in ACI rat mammary carcinogenesis: 17beta-estradiol, 2-hydroxyestradiol, 4-hydroxyestradiol, 16alpha-hydroxyestradiol, and 4-hydroxyestrone. *J Endocrinol*, **183**(1), 91-99.
- Walker, V. E., Jones, I. M., Crippen, T. L., Meng, Q., Walker, D. M., Bauer, M. J., Reilly, A. A., Tate, A. D., Nakamura, J., Upton, P. B. und Skopek, T. R. (1999). Relationships between exposure, cell loss and proliferation, and manifestation of Hprt mutant T cells following treatment of preweanling, weanling, and adult male mice with N-ethyl-N-nitrosourea. *Mutat Res*, **431**(2), 371-388.
- Wang, M., Dhingra, K., Hittelman, W. N., Liehr, J. G., de Andrade, M. und Li, D. (1996). Lipid peroxidation-induced putative malondialdehyde-DNA adducts in human breast tissues. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **5**(9), 705-710.
- Wang, M. Y. und Liehr, J. G. (1995). Induction by estrogens of lipid peroxidation and lipid peroxide-derived malonaldehyde-DNA adducts in male Syrian hamsters: role of lipid peroxidation in estrogen-induced kidney carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **16**(8), 1941-1945.
- Wang, S., Cyronak, M. und Yang, E. (2007). Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, **43**(2), 701-707.
- Wang, Z., Chandrasena, E. R., Yuan, Y., Peng, K. W., van Breemen, R. B., Thatcher, G. R. und Bolton, J. L. (2010). Redox cycling of catechol estrogens generating apurinic/aprimidinic sites and 8-oxo-deoxyguanosine via reactive oxygen species differentiates equine and human estrogens. *Chem Res Toxicol*, **23**(8), 1365-1373.
- Wheeler, W. J., Hsu, T. C., Tousson, A. und Brinkley, B. R. (1987). Mitotic inhibition and chromosome displacement induced by estradiol in Chinese hamster cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **7**(3), 235-247.

- Yager, J. D. und Liehr, J. G. (1996). Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **36**, 203-232.
- Zahid, M., Kohli, E., Saeed, M., Rogan, E. und Cavalieri, E. (2006). The greater reactivity of estradiol-3,4-quinone vs estradiol-2,3-quinone with DNA in the formation of depurinating adducts: implications for tumor-initiating activity. *Chem Res Toxicol*, **19**(1), 164-172.
- Zahid, M., Saeed, M., Lu, F., Gaikwad, N., Rogan, E. und Cavalieri, E. (2007). Inhibition of catechol-O-methyltransferase increases estrogen-DNA adduct formation. *Free Radic Biol Med*, **43**(11), 1534-1540.
- Zettner, M. A., Flor, S., Ludewig, G., Wagner, J., Robertson, L. W. und Lehmann, L. (2007). Quinoid metabolites of 4-monochlorobiphenyl induce gene mutations in cultured Chinese hamster v79 cells. *Toxicol Sci*, **100**(1), 88-98.
- Zhao, Z., Kosinska, W., Khmel'nitsky, M., Cavalieri, E. L., Rogan, E. G., Chakravarti, D., Sacks, P. G. und Guttenplan, J. B. (2006). Mutagenic activity of 4-hydroxyestradiol, but not 2-hydroxyestradiol, in BB rat2 embryonic cells, and the mutational spectrum of 4-hydroxyestradiol. *Chem Res Toxicol*, **19**(3), 475-479.
- Zhu, B. T. und Conney, A. H. (1998). Is 2-methoxyestradiol an endogenous estrogen metabolite that inhibits mammary carcinogenesis? *Cancer research*, **58**(11), 2269-2277.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniela Martínez Jaramillo
Geburtsdatum: 20.06.1982
Geburtsort: Quito-Ecuador
Staatsangehörigkeit: ecuadorianisch

Akademischer und beruflicher Werdegang

- 01/2009-12/2013 Promotion am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians Universität Würzburg
Arbeitskreis: Prof. Dr. L. Lehmann
Thema: „Einfluss einer definierten Enzymausstattung auf die Mutagenität von 17 β -Estradiol und dessen Metaboliten“
Promotionsstipendium vom Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD)
- 11/2007-11/2008 Ausbildung zur staatlich geprüften Lebensmittelchemikerin am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg
- 01/2007-09/2007 Diplomarbeit am Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie der Universität Fridericiana zu Karlsruhe
Arbeitskreis: Prof. Dr. Dr. M. Metzler
Thema: „Oxidativer Metabolismus von Sterolen *in vitro*“
- 10/2001-09/2007 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Fridericiana zu Karlsruhe
Studienstipendium vom DAAD

Schulausbildung

- 06/2001 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife an der Deutschen Schule Quito