

# **Untersuchungen zum Einfluss von 17 $\beta$ -Estradiol und Isoflavonen auf oxidativen Stress in kultivierten Zellen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

## **Doktors der Naturwissenschaften**

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der

Universität Karlsruhe (TH)

vorgelegte

## **DISSERTATION**

von Diplom-Lebensmittelchemiker

**Lars Rohnstock**

aus Pirna

Dekan: Prof. Dr. H. Puchta  
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Metzler  
Koreferent: Prof. Dr. D. Marko

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2006

# Danksagung

Ich danke ...

- Herrn Prof. Dr. Dr. Manfred Metzler für die Überlassung des interessanten Themas und seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung meiner Arbeit.
- Frau Dr. Leane Lehmann für die gute Betreuung, fürs Korrekturlesen und die wertvollen Anregungen und Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- dem Land Baden-Württemberg für das zweijährige Promotionsstipendium nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz (LGFG)
- Dr. Serge Boiteux (CEA-FAR, Fontenay aux Roses, Frankreich) und Prof. Dr. Bernd Epe (Institut für Pharmazie, Universität Mainz) für die freundliche Überlassung FPG-überexprimierender *E. colis*.
- meinen Kollegen Jörg Wagner, David Schumacher, Harald Esch (fürs Korrekturlesen), Stefan Kranz und Simone Höhle für Diskussion, Rat und Tat.
- Rosi Förster für die Arbeit in der Zellkultur.
- den Zellkulturdiplomanden Aneta Janecki, Aleka Vavelidou, Thorsten Jung, Eric Lerch, und Désirée Nickerl für die Unterstützung.
- allen nicht genannten Mitgliedern der Arbeitskreise Metzler, Hartwig und Marko, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- meinen Eltern, die mir den Weg bis zu dieser Arbeit ermöglicht haben.
- meiner Frau Aleka, die mich stets unterstützte und zu motivieren wusste.

# Inhaltsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Estrogene  | 1         |
| 1.2      | Isoflavone   | 6         |
| 1.3      | Reaktive Sauerstoffspezies   | 7         |
| 1.3.1    | Bildung reaktiver Sauerstoffspezies  | 8         |
| 1.3.2    | Biochemische Antioxidantien  | 11        |
| 1.3.3    | Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies   | 12        |
| 1.4      | Testsysteme  | 13        |
| 1.4.1    | Alkalische Filterelution   | 13        |
| 1.4.2    | Durchflußzytometrische Erfassung reaktiver Sauerstoffspezies mittels Dihydrocalcein Acetoxymethylester                         | 16        |
| 1.5      | Positivkontrollen für ROS-generierende Substanzen  | 18        |
| 1.5.1    | sichtbares Licht   | 18        |
| 1.5.2    | tert.-Butylhydroperoxid  | 19        |
| 1.5.3    | Menadion   | 19        |
| <b>2</b> | <b>PROBLEMSTELLUNG</b>   | <b>21</b> |
| <b>3</b> | <b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>   | <b>22</b> |
| 3.1      | Positivkontrollen  | 22        |
| 3.1.1    | Bestrahlung mit sichtbarem Licht   | 22        |
| 3.1.1.1  | Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht                  | 22        |
| 3.1.1.2  | Induktion oxidativer DNA-Schäden durch Bestrahlung von MCF-7 Zellen mit sichtbarem Licht                                       | 23        |
| 3.1.1.3  | Bestimmung durch sichtbares Licht induzierter, oxidativer DNA-Schäden in V79-Zellen mittels AFE                                | 25        |
| 3.1.1.4  | Bestimmung des DNA-strangbrechenden Potentials von sichtbarem Licht in V79-Zellen mittels <i>Comet Assay</i>                   | 27        |
| 3.1.2    | Untersuchung des genotoxischen Potentials von Kaliumsuperoxid  | 28        |
| 3.1.2.1  | Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit Kaliumsuperoxid         | 28        |
| 3.1.2.2  | Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 1-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit Kaliumsuperoxid                              | 31        |
| 3.1.3    | Untersuchung des genotoxischen Potentials von tert.-Butylhydroperoxid  | 34        |
| 3.1.3.1  | Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit tert.-Butylhydroperoxid | 34        |
| 3.1.3.2  | Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 1-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit tert.-Butylhydroperoxid                      | 36        |
| 3.1.3.3  | Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 24-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit tert.-Butylhydroperoxid                     | 38        |
| 3.1.4    | Untersuchung des genotoxischen Potentials von Menadion   | 40        |
| 3.1.4.1  | Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit Menadion                | 40        |
| 3.1.4.2  | Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 1-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit Menadion                                     | 43        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| <b>3.2</b> | <b>Untersuchung des genotoxischen Potentials von 17<math>\beta</math>-Estradiol.....</b>   | <b>47</b>  |
| 3.2.1      | Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit 17 $\beta$ -Estradiol.....                                | 47         |
| 3.2.2      | Einfluss von 17 $\beta$ -Estradiol auf t-BHP-induzierte ROS in MCF-7 Zellen .....  | 50         |
| 3.2.3      | Untersuchung der Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 1-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit 17 $\beta$ -Estradiol .....                                   | 51         |
| <b>3.3</b> | <b>Untersuchung des genotoxischen Potentials von Genistein .....</b>   | <b>53</b>  |
| 3.3.1      | Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit Genistein .....   | 53         |
| 3.3.2      | Einfluss von Genistein auf t-BHP-induzierte ROS in MCF-7 Zellen .....  | 55         |
| 3.3.3      | Bestimmung des DNA-strangbrechenden Potentials von Genistein in MCF-7 Zellen.....  | 57         |
| <b>3.4</b> | <b>Untersuchung des genotoxischen Potentials von Daidzein.....</b>   | <b>59</b>  |
| 3.4.1      | Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit Daidzein .....  | 59         |
| 3.4.2      | Einfluss von Daidzein auf t-BHP-induzierte ROS in MCF-7 Zellen.....  | 61         |
| 3.4.3      | Bestimmung des DNA-strangbrechenden Potentials von Daidzein in MCF-7 Zellen.....   | 63         |
| <b>3.5</b> | <b>Einfluss der Isoflavone auf die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit 17<math>\beta</math>-Estradiol.....</b> | <b>65</b>  |
| 3.5.1      | Einfluss von Genistein auf die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit 17 $\beta$ -Estradiol.....                  | 65         |
| 3.5.2      | Einfluss von Daidzein auf die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit 17 $\beta$ -Estradiol.....                   | 67         |
| <b>3.6</b> | <b>Untersuchung des genotoxischen Potentials von 4-Hydroxyestradiol.....</b>   | <b>68</b>  |
| 3.6.1      | Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit 4-Hydroxyestradiol .....                                  | 68         |
| 3.6.2      | Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 24-stündige Behandlung mit 4-Hydroxyestradiol .....                                 | 71         |
| 3.6.3      | Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 1-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit 4-Hydroxyestradiol .....   | 74         |
| 3.6.4      | Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 24-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit 4-Hydroxyestradiol .....  | 77         |
| 3.6.5      | Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 4-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit 4-Hydroxyestradiol .....   | 80         |
| 3.6.6      | Übersicht der Ergebnisse zur Bestimmung durch 4-Hydroxyestradiol induzierter ROS und oxidativer DNA-Schäden.....   | 82         |
| 3.6.7      | Mikrokerntest in V79-Zellen nach 6-stündiger Behandlung mit 4-Hydroxyestradiol .....   | 82         |
| 3.6.8      | Mikrokerntest in Ishikawa-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit 4-Hydroxyestradiol ..  | 86         |
| <b>3.7</b> | <b>Effekte von 17<math>\beta</math>-Estradiol auf die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen mit gesteigerter EROD-Aktivität .....</b>            | <b>87</b>  |
| 3.7.1      | Überprüfung der CYP-Induktion in MCF-7 Zellen mittels EROD-assay .....   | 89         |
| 3.7.2      | Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen mit gesteigerter EROD-Aktivität .....   | 90         |
| <b>4</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>95</b>  |
| <b>5</b>   | <b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>  | <b>97</b>  |
| <b>5.1</b> | <b>Geräte .....</b>  | <b>97</b>  |
| <b>5.2</b> | <b>Verbrauchsmaterialien.....</b>  | <b>99</b>  |
| <b>5.3</b> | <b>Methoden in der Zellkultur.....</b>   | <b>100</b> |
| 5.3.1      | Zellen und allgemeine Zellkulturarbeiten .....   | 100        |
| 5.3.2      | Mikrokerntest.....   | 102        |
| 5.3.3      | Immunologische Färbung.....  | 102        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 5.3.4      | Tod-Lebend-Färbung von Zellen .....                    | 104        |
| <b>5.4</b> | <b>Alkalische Filterelution .....</b>                  | <b>105</b> |
| <b>5.5</b> | <b>Durchflußzytometrische Bestimmung von ROS .....</b> | <b>108</b> |
| <b>5.6</b> | <b>Comet Assay.....</b>                                | <b>110</b> |
| <b>5.7</b> | <b>EROD-Assay .....</b>                                | <b>113</b> |
| <b>5.8</b> | <b>Statistik.....</b>                                  | <b>115</b> |
| <b>6</b>   | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>                      | <b>116</b> |
| <b>7</b>   | <b>ANHANG.....</b>                                     | <b>124</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| $^1\text{O}_2$                | Singulett-sauerstoff   |
| $^3\text{O}_2$                | Triplettsauerstoff   |
| 4-HO-E2                       | 4-Hydroxyestradiol   |
| AFE                           | Alkalische Filterelution   |
| ALS                           | Alkalilabile Stellen   |
| AP-Stellen                    | apurine und apyrimidine Stellen  |
| ATP                           | Adenosintriphosphat  |
| bp                            | Basenpaar(e)   |
| BSA                           | Bovine Serum Albumin   |
| BSO                           | Buthioninsulfoximin  |
| CD-FKS                        | Aktivkohle (charcoal)-dextran behandeltes fetales Kälberserum  |
| CMTC                          | <b>C</b> ytoplasmic <b>M</b> icro <b>T</b> ubule <b>C</b> omplex (Zytoplasmatischer Mikrotubuli-Komplex) |
| COMT                          | Catechol-O-Methyltransferase   |
| CYP                           | Cytochrom P450   |
| DAI                           | Daidzein   |
| DHC AM                        | Dihydrocalcein Acetoxymethylester  |
| DMEM                          | Dulbecco's Modified Eagles Medium  |
| DMSO                          | Dimethylsulfoxid   |
| DNA                           | Desoxyribonukleinsäure   |
| DPC                           | DNA-protein crosslinks   |
| DSB                           | Doppelstrangbrüche (engl.: double strand breaks)   |
| E2                            | 17 $\beta$ -Estradiol  |
| EDTA                          | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| ER                            | Estrogenrezeptor   |
| ESS                           | Endonuklease-sensitive Stellen   |
| FI                            | Fluoreszenzintensität  |
| FKS                           | Foetales Kälberserum   |
| Fpg                           | Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase   |
| GEN                           | Genistein  |
| GSH                           | Glutathion, reduzierte Form  |
| h                             | Stunde(n)  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid   |
| ISC                           | interstrand crosslinks   |
| KO <sub>2</sub>               | Kaliumsuperoxid  |
| MCF-7                         | Humane Brustkrebszelllinie   |
| min                           | Minute(n)  |

|                   |  |
|-------------------|--|
| MNT               | Mikrokerntest                                    |
| NaCl              | Natriumchlorid                                   |
| $O_2^{\bullet -}$ | Superoxidanionradikal                            |
| $OH^{\bullet}$    | Hydroxylradikal                                  |
| P/S               | Penizillin /Streptomycin                         |
| PBS               | Phosphate Buffered Saline                        |
| PBS-CMF           | PBS ohne $Ca^{2+}$ und $Mg^{2+}$                 |
| PI                | Propidiumiodid                                   |
| $RO^{\bullet}$    | Alkoxyradikal                                    |
| $ROO^{\bullet}$   | Peroxyradikal                                    |
| ROS               | Reaktive Sauerstoffspezies                       |
| SDS               | Natriumdodecylsulfat                             |
| SSB               | Einzelstrangbrüche (engl.: single strand breaks) |
| t-BHP             | Tert.-Butylhydroperoxid                          |
| TCDD              | 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo(p)dioxin              |
| TEAH              | Tetraethylammoniumhydroxid                       |
| Tris              | Tris(hydroxymethyl)aminomethan                   |
| UV                | Ultraviolett                                     |
| V79               | Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters     |

# 1 Einleitung

## 1.1 Estrogene

Endogene Estrogene wie beispielsweise  $17\beta$ -Estradiol beeinflussen das Wachstum, die Differenzierung und Funktion vieler Gewebe wie zum Beispiel Brustgewebe, Uterus, Ovarien, Testes oder Prostata. Estrogene scheinen eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von Brustkrebs bei Frauen zu spielen und scheinen auch an der Entwicklung von Prostatakrebs bei Männern beteiligt zu sein (Jefcoate et al., 2000). Für die Kanzerogenität der Estrogene werden hauptsächlich zwei Mechanismen verantwortlich gemacht:

- Durch Estrogene kann es zu einer Stimulierung des Zellwachstums kommen, welche auf die Estrogenrezeptor (ER)-vermittelte hormonelle Aktivität der Estrogene zurückzuführen ist (Abbildung 1.1). Die Proliferationssteigerung bietet die Möglichkeit zur Akkumulation erworbener Schädigungen des Genoms und stellt somit einen wichtigen Schritt im mehrstufigen Prozess der Kanzerogenese dar (Nandi et al., 1995). Die ER-vermittelte Aktivität der Estrogene induziert die Expression von Genen, die an der Zellzykluskontrolle und dem Wachstum des Brust-Epithels beteiligt sind. Entscheidende Parameter sind dabei die lokalen Konzentrationen aktiven Hormons und seiner Rezeptoren (Prall et al., 1998).
- Durch Cytochrom P450 (CYP) vermittelten oxidativen Metabolismus von  $17\beta$ -Estradiol kann es zur Bildung von Catecholestrogenen und in Folge dessen zur Generierung reaktiver, freier Radikale und metabolischer Intermediate kommen, die oxidativen Stress verursachen und indirekt (reaktive Sauerstoffspezies) oder direkt (Chinone) DNA-schädigend wirken können (Liehr et al., 1986).



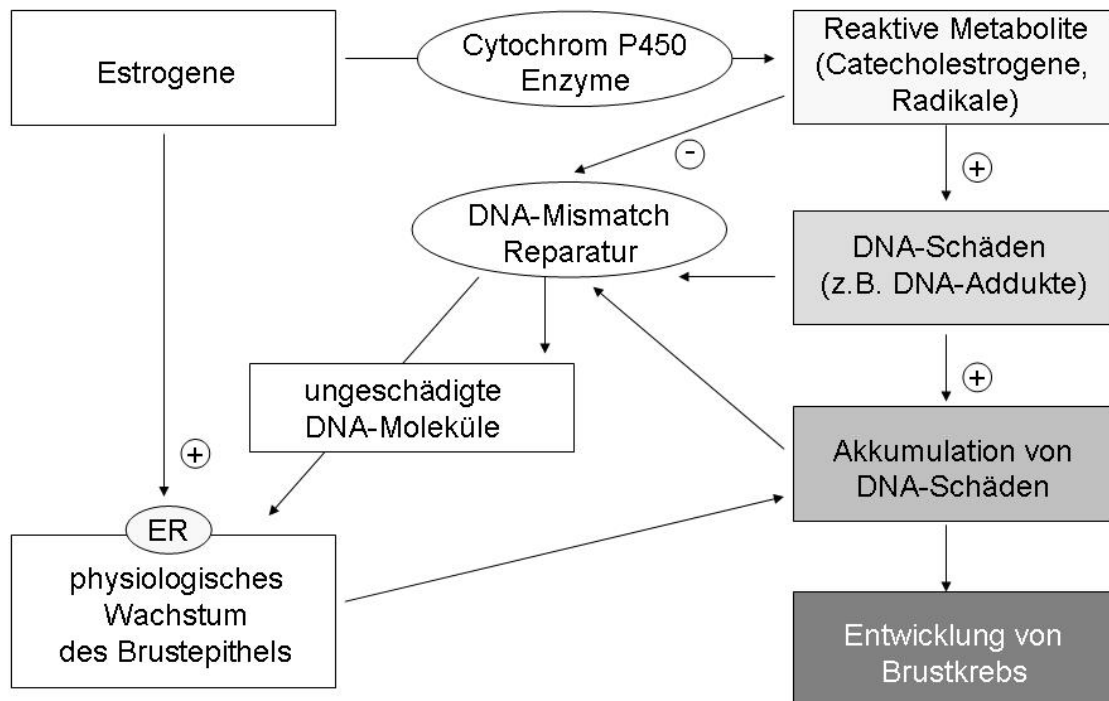


Abbildung 1.1: Schema potentieller Mechanismen Estrogen-induzierter Kanzerogenese in humanem Brustgewebe (nach Hu et al., 2002). ER: Estrogenrezeptor; + = Stimulierung, - = Hemmung

Die zwei bedeutendsten endogenen Estrogene sind die Steroidhormone  $17\beta$ -Estradiol (Abbildung 1.2) und Estron. Letzteres weist im Gegensatz zu  $17\beta$ -Estradiol (E2) an der Position C17 anstelle der Hydroxylgruppe eine Keto-Funktion auf. Beide Substanzen können durch  $17\beta$ -Estradiol-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (oder  $17\beta$ -Oxido-reduktase) ineinander umgewandelt werden. Sie werden durch Hydroxylierung unter anderem an der C16 $\alpha$  Position und den C2 oder C4 Positionen metabolisiert (Abbildung 1.2).

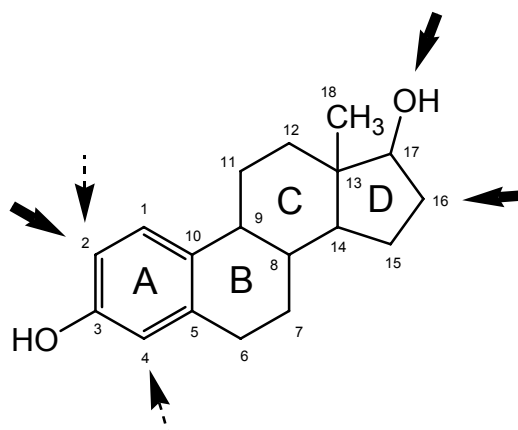


Abbildung 1.2: Strukturformel von 17β-Estradiol und die wichtigsten Angriffsstellen des Cytochrom P450 vermittelten oxidativen Metabolismus in der Leber (dicke Pfeile) und in extrahepatischen Geweben (gestrichelte Pfeile) (nach Zhu und Conney, 1998).

Neben dem NADPH-abhängigen oxidativen Metabolismus werden die Estrogene auch durch Glucuronidierung, Sulfatierung oder O-Methylierung konjugativ metabolisiert (zusammengefasst in Zhu und Conney, 1998). Obwohl der Großteil des oxidativen Metabolismus in der Leber stattfindet, werden bestimmte Estrogen-metabolisierende CYP-Isoformen selektiv in extrahepatischen Geweben exprimiert. So konnten Fishman und Norton (1975) die 2-Hydroxylierung von E2 im Rattenhirn demonstrieren (Fishman und Norton, 1975). Eine besonders hohe 4-Hydroxylase-aktivität konnte in Nieren männlicher, syrischer Hamster gefunden werden (Kirkman, 1959).

Eine wichtige Rolle beim oxidativen Metabolismus von E2 wird den CYP-Isoformen 1A1, 1A2 und 1B1 zugeschrieben. Sie hydroxylieren E2 unter anderem zu den Catecholestrogenen 2-Hydroxyestradiol (2-HO-E2) (Spink et al., 1992) und 4-Hydroxyestradiol (4-HO-E2) (Spink et al., 1994, Hayes et al., 1996). Während 2-HO-E2 im Hamsternieren-Tumormodell keine Tumoren induziert, gilt 4-HO-E2 als kanzerogen (Liehr et al., 1986, Liehr und Sirbasku, 1985).

Die in extrahepatischen Geweben vorherrschende Hydroxylierung von E2 an der C4 Position (Abbildung 1.3) konnte beim Menschen unter anderem in Mikrosomen benigner Uterus-Myome (Liehr et al., 1995) und sowohl in benignen als auch malignen Mamma-Tumoren (Liehr und Ricci, 1996) gezeigt werden. In Geweben, die gegenüber Estrogen-induzierten Tumoren resistent sind (Leber) dominiert dagegen die Bildung von 2-HO-E2 (Liehr und Ricci, 1996).

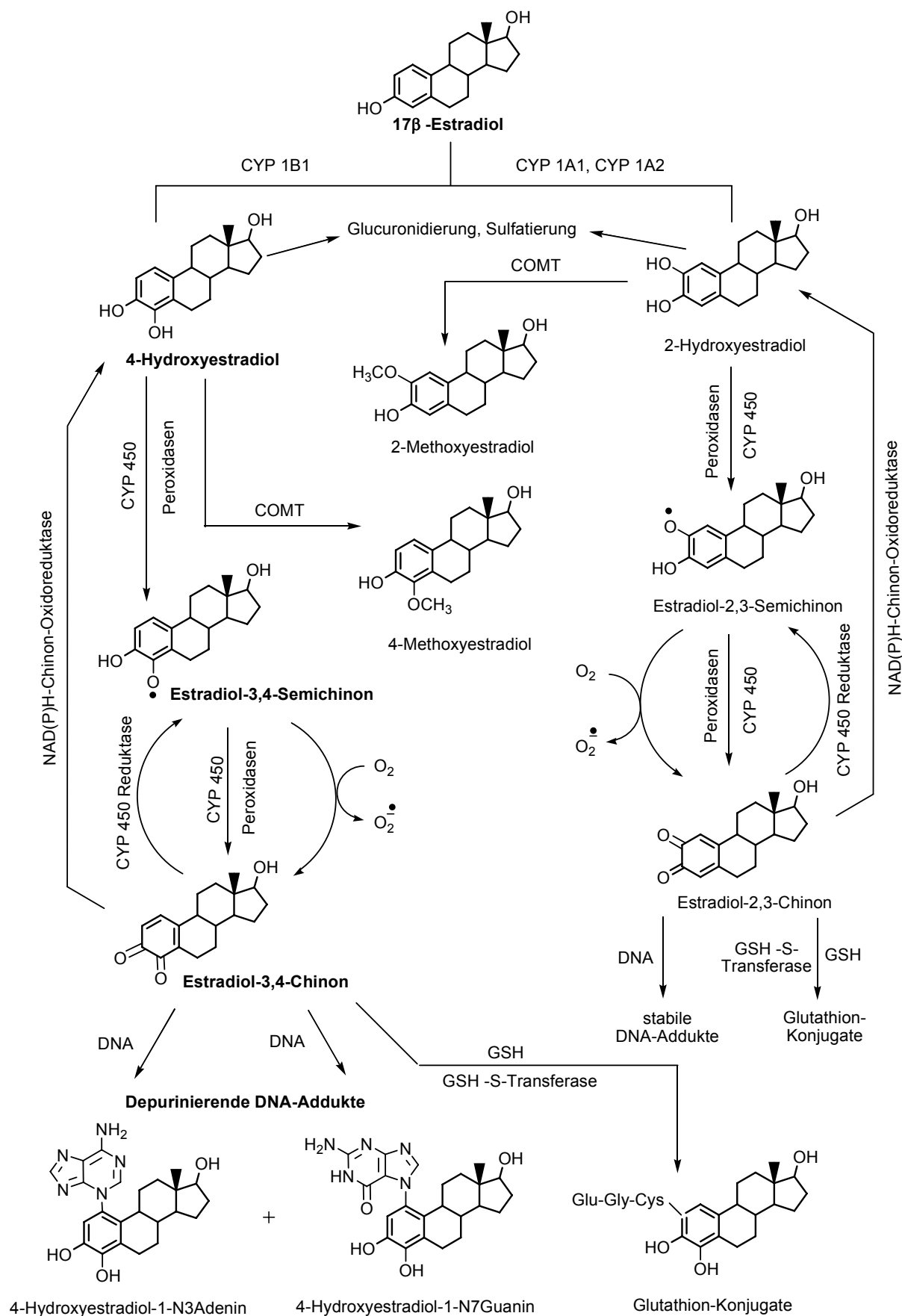


Abbildung 1.3: Schema des oxidativen Metabolismus von 17β-Estradiol (nach Cavalieri et al., 1997 und Devanesan et al., 2001).

Generell können die gebildeten Catecholestrogene durch Catechol-O-Methyltransferase (COMT) katalysierte O-Methylierung entgiftet werden (Abbildung 1.3). Dabei wird in Gegenwart von Magnesiumionen eine Methylgruppe von dem Coenzym S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) auf eine der beiden Hydroxylgruppen der Catecholestrogene übertragen (Gulberg und Marsden, 1975). Es sind zwei Isoformen der COMT mit gleicher Wirkung bekannt: eine lösliche (S-COMT) und eine membrangebundene (MB-COMT). (Salminen et al., 1990; Lundström et al., 1991). In den meisten menschlichen Geweben kommt die COMT zum Grossteil in löslicher Form vor, während der Anteil an MB-COMT im Gehirn bis zu 70% der gesamten COMT betragen kann (Zhu, 2002).

Die COMT-katalysierte Entgiftung von 4-HO-E2 zum inaktiven 4-Methoxyestradiol verläuft langsamer als die von 2-HO-E2, was auf eine Inhibierung der COMT durch entstandenes 2-Methoxyestradiol zurückzuführen ist (Weisz et al., 1998, zitiert in Cavalieri et al., 2000). Kommt es aufgrund zu hoher Catechol-Konzentrationen oder durch Anwesenheit xenobiotischer COMT-Inhibitoren zu einer reduzierten Kapazität der O-Methylierung, kann dies eine signifikante Verlängerung der Lebensdauer der Catecholestrogene (CE) zur Folge haben (Weisz et al., 2000). Die CE können nun durch Peroxidasen oder CYP zu Semichinonen und weiter zu Chinonen (Abbildung 1.3) oxidiert werden, welche katalysiert durch eine Steroid-spezifische Glutathion-S-Transferase mit Glutathion (GSH) konjugiert werden können (Creveling, 2002). Ist auch dieser inaktivierende Weg unzureichend oder ineffektiv, können die Chinone mit der DNA zu Addukten reagieren (Devanesan et al., 2001). Während das E-2,3-Chinon stabile DNA-Addukte (2-HO-E2-6-N2Guanin und 2-HO-E2-6-N6Adenin) bildet, welche den Mechanismen der DNA-Reparatur zugänglich sind, bildet das E-3,4-Chinon die depurinierenden Addukte 4-HO-E2-1-N7Guanin und 4-HO-E2-1-N3Adenin (Abbildung 1.3) (Cavalieri, 2000). Die Reaktion von E-3,4-Chinon mit der N7-Position des Guanins destabilisiert die glykosidische Bindung und führt zur Abspaltung vom Desoxyribose-Molekül. Kommt es zur Bildung dieses Adduktes, wird es durch spontane Depurinierung aus der DNA entfernt und hinterlässt eine apurine Stelle (Cavalieri, 2000).

Die aus den CE entstandenen Semichinone können in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff zu Chinonen reagieren (Abbildung 1.3). Dabei kommt es zur Bildung von Superoxidanionradikalen, welche spontan oder Superoxiddismutase-

vermittelt zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Sauerstoff ( $O_2$ ) dismutieren können. In Anwesenheit von Übergangsmetallionen können aus dem reaktionsträgen  $H_2O_2$  reaktive Hydroxylradikale gebildet werden, die mit allen Strukturen der Zelle reagieren können (Liehr, 1999). Durch die NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase können die Chinone zurück zu CE reduziert werden und somit den Kreisprozess des *Redoxcyclings* schließen (Cavalieri, 2000).

## 1.2 Isoflavone

Den vor allem in Sojabohnen vorkommenden Hauptisoflavonen Genistein (GEN) und Daidzein (DAI) werden estrogene Wirkungen zugeschrieben. (Ward und Thompson, 2001). Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu  $17\beta$ -Estradiol können GEN und DAI (Abbildung 1.4) an den ER binden und die physiologische Wirkung von E2 nachahmen oder blockieren (Tham et al., 1998, Bingham, et al., 1998). Die relative Bindungsaffinität der Isoflavone ist dabei mindestens 10-1000-fach niedriger als die von E2 (Kuiper et al., 1998).

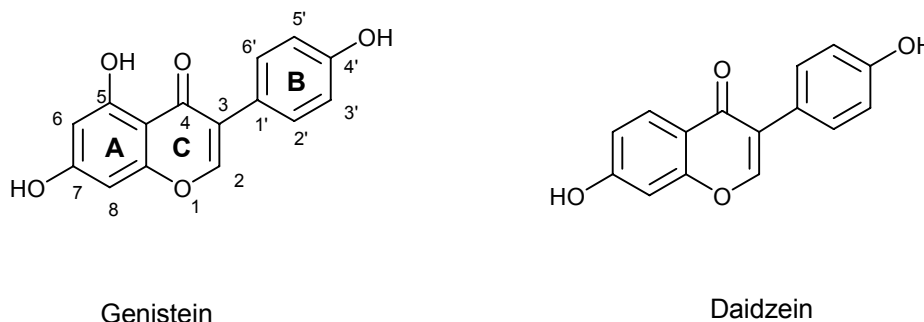


Abbildung 1.4: Strukturformeln der Isoflavone Genistein und Daidzein.

Genistein und Daidzein, wird eine protektive Rolle bei der hormonellen Kanzerogenese und der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen zugeschrieben (Axelson et al., 1984). Epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass ein erhöhter Verzehr Phytoestrogen-haltiger Lebensmittel das Erkrankungsrisiko senkt (Adlercreutz, 1990). Neben dem hormonellen Mechanismus könnten für die protektive Wirkung auch antioxidative Eigenschaften der Isoflavone, die sie als phenolische Verbindungen besitzen, von Bedeutung sein (Kohlmeier et al. 1995).

In Untersuchungen zur Genotoxizität der Isoflavone erwies sich GEN in V79-Zellen als starker Induktor fast ausschließlich Kinetochor-negativer Mikrokerne (Kulling und Metzler, 1997, Di Virgilio et al., 2004). Auch DAI zeigte in V79-Zellen eine Induktion von Mikrokernen, die im Vergleich zu GEN jedoch schwächer ausgeprägt war (Kulling und Metzler, 1997, Di Virgilio et al., 2004).

In kultivierten Lymphozyten konnte mittels Chromosomenabberationstest ein Anstieg an Chromosomenabberationen durch GEN jedoch nicht durch DAI gezeigt werden (Kulling et al., 1999).

### **1.3 Reaktive Sauerstoffspezies**

Als Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden Moleküle mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen (freie Radikale), sowie Verbindungen mit radikalähnlichen Eigenschaften bezeichnet (Halliwell und Gutteridge, 1990).

In nahezu allen aeroben Zellen werden ROS unter physiologischen Bedingungen generiert. So kommt es bei der Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) in den Mitochondrien zur Generierung von ROS. Weitere Quellen endogener ROS sind enzymatische Umsetzungen in Peroxisomen (Abbildung 1.5) oder im Zytosol wie durch das Xanthin/Xanthinoxidase-System, die Prostaglandinsynthese oder das Cytochrom P450-System im endoplasmatischen Retikulum (Halliwell, 1995; Moslen, 1994). Phagozytierende Zellen wie Leukozyten, Monozyten oder Makrophagen generieren in Phagosomen mittels NADPH-Oxidase Superoxidanionen, dessen Folge-ROS zum Abbau phagozytierter Bakterien und Partikel dienen (Babior, 1992).

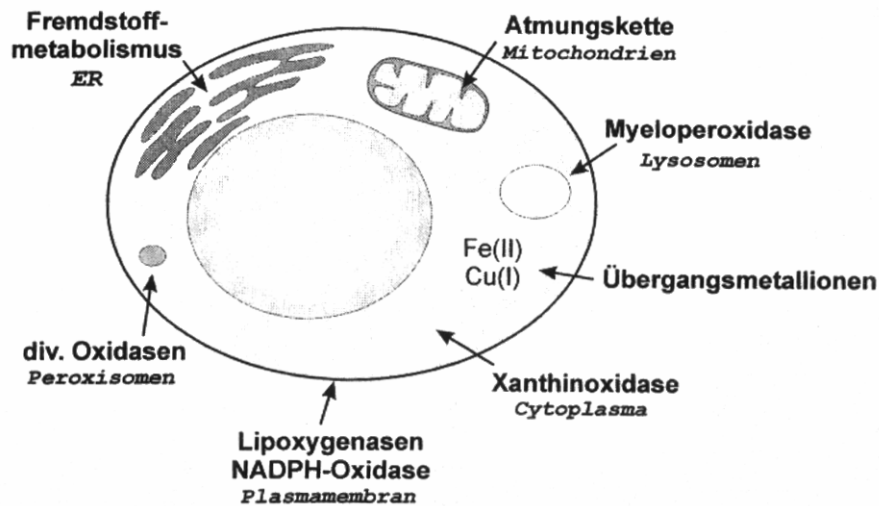


Abbildung 1.5: Beispiele für endogene ROS Quellen (Klotz, 2002).

In der Zelle liegt ein Gleichgewicht zwischen oxidativen und reduktiven Vorgängen vor. Verschiebt sich dieses Gleichgewicht zugunsten oxidativer Vorgänge und es kommt zu oxidativen Schädigungen durch ROS, wird dies als oxidativer Stress bezeichnet. Oxidativer Stress scheint eine bedeutende Rolle bei vielen biologischen Vorgängen wie Entzündungen, Kanzerogenese und Alterungsprozessen zu spielen (Sies, 1986; Davies, 1995).

### 1.3.1 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Molekularer Sauerstoff im Grundzustand ist ein Diradikal, dessen beide Sauerstoffatome in den äußeren Molekülorbitalen je ein ungepaartes Elektron mit parallelem Spin (Triplettzustand) besitzen (Abbildung 1.6). Triplett-Sauerstoff ( $^3\text{O}_2$ ) ist nicht reaktiv genug, um Elektronen von anderen Molekülen zu abstrahieren (zusammengefasst in Halliwell und Gutteridge, 1990).

Eine Möglichkeit die Reaktivität von  $^3\text{O}_2$  zu erhöhen besteht darin, eines der ungepaarten Elektronen durch Einwirkung von Energie in seinem Spin umzukehren oder in ein anderes Orbital zu bewegen.  $^3\text{O}_2$  wird dabei vom Grundzustand in den Singulettzustand ( $^1\text{O}_2$ ) überführt (Abbildung 1.6). Zu dieser Anregung kann es durch Bestrahlung in Anwesenheit von verschiedenen Pigmenten und  $^3\text{O}_2$  kommen. Dabei

geht das Pigmentmolekül aufgrund der Lichtabsorption in einen energetisch höheren Zustand über und überträgt die Energie auf  $^3\text{O}_2$  (Wefers und Sies, 1986).

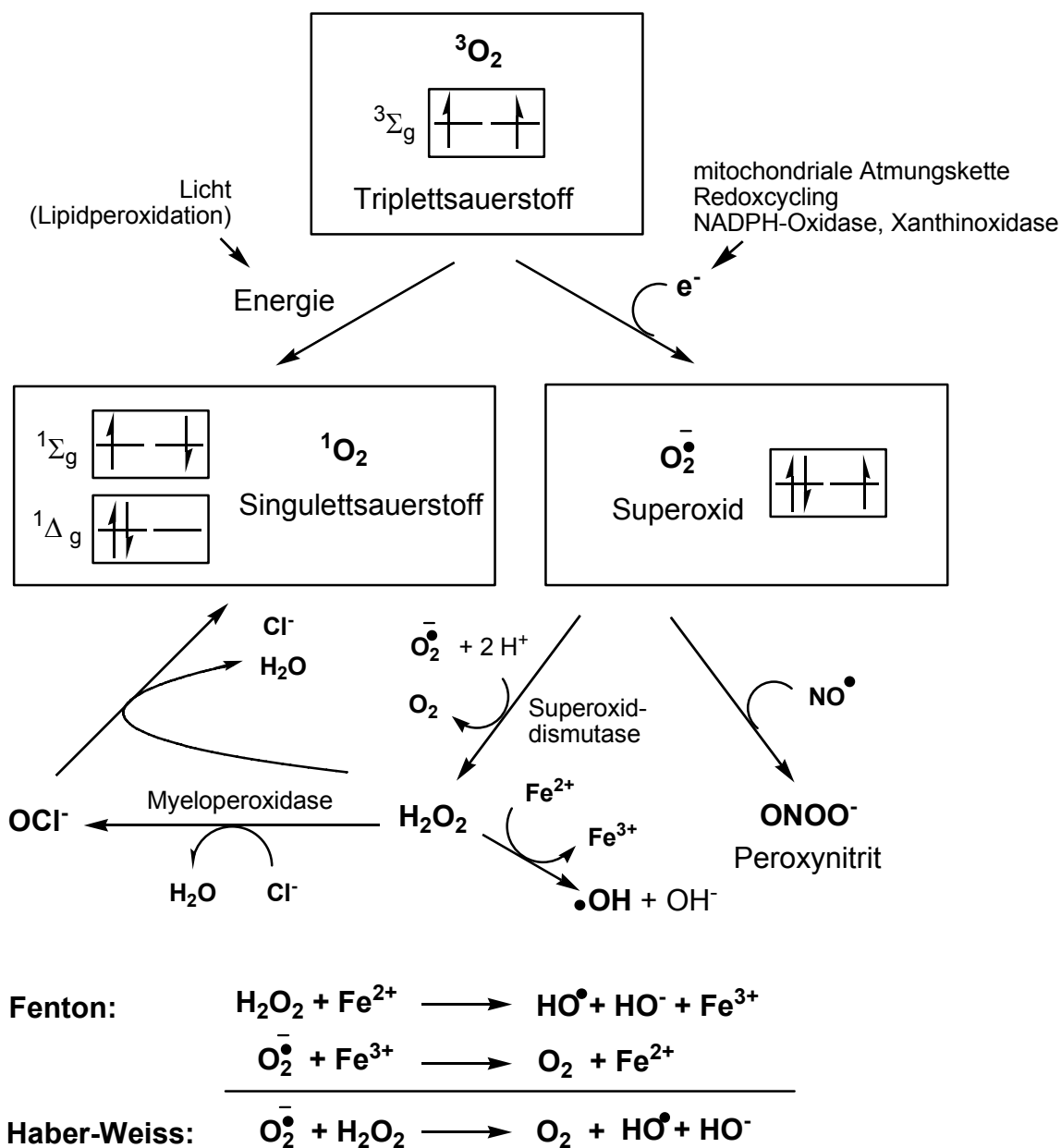


Abbildung 1.6: Biochemische Zusammenhänge der ROS (nach Halliwell und Gutteridge, 1990; Klotz, 2002).

$^3\text{O}_2$  kann auch beispielsweise in der mitochondrialen Atmungskette oder im *Redoxcycling* durch NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase zum Superoxidanionradikal ( $\text{O}_2^-$ ) reduziert werden.  $\text{O}_2^-$  besitzt eine geringe Reaktivität und in Folge dessen eine relativ hohe Lebensdauer (Tabelle 1.1).



Tabelle 1.1: Geschätzte Lebensdauer verschiedener ROS nach Sies (1993).

| ROS   | Halblebensdauer (s) |
|---|---------------------|
| $\text{HO}^\cdot$ , Hydroxylradikal           | $10^{-9}$           |
| $\text{RO}^\cdot$ , Alkoxyradikal             | $10^{-6}$           |
| $\text{ROO}^\cdot$ , Peroxylradikal           | 7                   |
| $\text{Q}^\cdot$ , Semichinonradikal          | Tage                |
| $\text{O}_2^{\cdot-}$ , Superoxidationradikal | enzymatischer Abbau |
| $\text{H}_2\text{O}_2$ , Wasserstoffperoxid   | enzymatischer Abbau |
| $^1\text{O}_2$ , Singulett-Sauerstoff         | $10^{-6}$           |
| $\text{NO}^\cdot$ , Stickstoffmonoxid         | 1-10                |
| $\text{ONOO}^-$ , Peroxynitrit                | 0,05-1              |

$\text{O}_2^{\cdot-}$  kann spontan oder enzymatisch durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Sauerstoff disproportionieren oder in Anwesenheit von Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}^\cdot$ ) zu Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) weiter reagieren (Abbildung 1.6). Durch CE können, wie in Kapitel 1.1 beschrieben, während des *Redoxcyclings* das Semichinonradikal und  $\text{O}_2^{\cdot-}$  entstehen. Beide Radikale haben unterschiedliche Lebenszeiten (Tabelle 1). Die Lebenszeit von Semichinonradikalen beträgt mehrere Tage im Gegensatz dazu wird  $\text{O}_2^{\cdot-}$  enzymatisch abgebaut, wobei weitere reaktivere Spezies entstehen können.

In Gegenwart von katalytischen Mengen  $\text{Fe}^{2+}$  wird aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Fenton-Reaktion das Hydroxylradikal ( $\text{HO}^\cdot$ ) gebildet, welches der reaktivste Vertreter der ROS ist.  $\text{HO}^\cdot$  ist so reaktiv, dass es direkt am Ort seiner Entstehung abreagiert (Davies, 1995). Eine weitere Möglichkeit zur Bildung von  $\text{HO}^\cdot$  ist die Haber-Weiss-Reaktion, in welcher in der Zelle vorkommendes  $\text{Fe}^{3+}$  durch  $\text{O}_2^{\cdot-}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert wird. Das gebildete  $\text{Fe}^{2+}$  katalysiert wiederum die Bildung von  $\text{HO}^\cdot$ , indem es selbst zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert wird.

$\text{H}_2\text{O}_2$  kann in Gegenwart von  $\text{Cl}^-$  durch die Myeloperoxidase unter Wasserabspaltung zum Hypochlorit ( $\text{OCl}^-$ ) reagieren (Abbildung 1.6). Durch Reaktion von  $\text{OCl}^-$  mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  werden  $\text{HO}^\cdot$  und  $^1\text{O}_2$  gebildet.  $^1\text{O}_2$  kann unter anderem auch bei der Lipidperoxidation durch Photosensibilisatoren entstehen. Somit kann die Entstehung einer einzelnen

ROS zur Bildung weiterer ROS führen (zusammengefasst in Halliwell und Gutteridge, 1990).

### 1.3.2 Biochemische Antioxidantien

Die Entgiftung von ROS ist eine wichtige Voraussetzung für das aerobe Leben. Zur Aufrechterhaltung des oxidativen Gleichgewichtes stehen der Zelle nicht-enzymatische und enzymatische Systeme zur Verfügung (Tabelle 1.2). Zu den bedeutendsten enzymatischen Abwehrsystemen zählen Superoxiddismutasen, Katalase und Glutathionperoxidasen. Glutathion, Ascorbinsäure,  $\alpha$ -Tocopherol und Ubichinon gehören zu den kleinmolekularen nicht enzymatischen Antioxidantien (Sies, 1986; Davies, 1995).

Tabelle 1.2: Endogene Antioxidantien (nach Sies, 1986; Davies, 1995).

| Antioxidans                      | Funktionen  |
|----------------------------------|---|
| <i>nicht enzymatisch</i>         |   |
| $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) | membranständiger Radikalfänger  |
| Ascorbinsäure (Vitamin C)        | Radikalfänger, Regeneration von $\alpha$ -Tocopherol                                |
| Ubichinon (coenzym Q)            | Radikalfänger der mitochondrialen Atmungskette                                      |
| Glutathion                       | Radikalfänger, Cofaktor der Glutathionperoxidasen                                   |
| $\beta$ -Carotin (Vitamin A)     | $^1\text{O}_2$ -Fänger  |
| Harnsäure                        | $^1\text{O}_2$ -Fänger  |
| <i>antioxidative Enzyme</i>      |   |
| Superoxiddismutasen (SOD)        | $2\text{O}_2^{\cdot -} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ |
| CuZnSOD                          | im Zytoplasma   |
| MnSOD                            | in Mitochondrien  |
| ECSOD                            | Sonderform im Extrazellulärraum   |

|  |  |
|--|--|
| Katalase                                       | $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ; in Peroxisomen  |
| Glutathionperoxidasen                          | $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$<br>$\text{ROOH} + 2\text{GSH} \rightarrow 2\text{ROH} + \text{GSSG}$<br>in Zytosol und mitochondrialer Matrix |
| <i>metallbindende Moleküle</i>                 |  |
| Transferrin                                    | bindet Fe  |
| Ferritin                                       | bindet Fe  |
| Lactoferrin                                    | bindet Fe  |
| Coeruloplasmin                                 | bindet Cu  |
| <i>radikalfangende Proteine</i>                |  |
| Albumin  | Radikalfänger  |
| Metallothionein                                | HO <sup>•</sup> -Fänger  |
| <i>Antioxidansenzyme im weiteren Sinne</i>     |  |
| NADPH-Chinon-Oxidoreduktase<br>(DT-Diaphorase) | Zwei-Elektronenreduktion von Chinonen,<br>verhindert Semichinonradikalbildung  |
| GSSG-Reduktase                                 | regeneriert GSH  |
| Reparaturenzyme                                | Reparatur von oxidiertem DNA und<br>oxidierten Proteinen   |

### 1.3.3 Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies

Aufgrund ihrer hohen Reaktivität können ROS praktisch mit allen molekularen Strukturen der Zellen reagieren. Je nach Reaktionspartner und Lebensdauer des Radikals kann es zu strukturellen und funktionellen Störungen kommen.

Durch HO<sup>•</sup> kann es beispielsweise zu DNA-Strangbrüchen, DNA-Protein-Quervernetzungen, Modifizierung der Purin- und Pyrimidinbasen und abasischen Stellen kommen. So ist beispielsweise bei der Entstehung von DNA-Strangbrüchen der Zuckerteil der DNA der Angriffspunkt des HO<sup>•</sup>. Basenoxidationen können ebenfalls durch <sup>1</sup>O<sub>2</sub> und ausgelöst werden. Dabei entstehen hauptsächlich 8-Oxoguanin, 5-Hydroxymethyluracil und Thyminglycol (Abbildung 1.7). Diese Basenoxidationen können zu Basenfehlpaarungen in der DNA führen. Werden diese Schäden nicht repariert, können Mutationen die Folge sein. (Sies, 1986, Cavalieri, 2000).

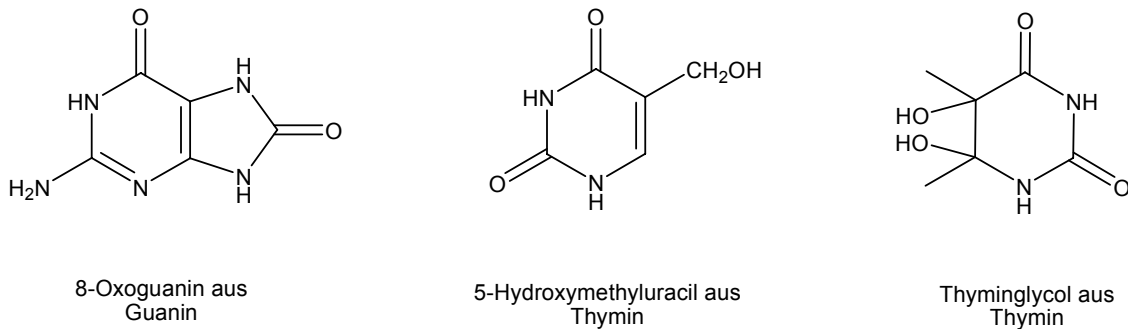


Abbildung 1.7: Beispiele für oxidierte DNA-Basen (nach Cavalieri, 2000).

Neben DNA-Schäden kann es durch ROS auch zur Schädigung von Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten kommen. Aminosäuren mit aromatischen und –SH-Gruppen können durch ROS oxidiert werden. Dabei kann es beispielsweise zu Ringöffnungen von Histidin und Tryptophan oder zu ROS-vermittelten Oxidationen von Methionin zum Sulfon kommen, was eine Funktionsstörung oder den Verlust der Funktion von Enzymen zur Folge haben kann (Sies, 1986).

Aufgrund vorhandener mehrfach ungesättigter Fettsäuren der Membranphospholipide sind biologische Membranen gegenüber ROS empfindlich. Die Fettsäuren können mit den Radikalen über Zwischenstufen der Lipidperoxidation das Peroxylradikal (ROO<sup>·</sup>) generieren (Barber und Bernheim, 1967).

## 1.4 Testsysteme

### 1.4.1 Alkalische Filterelution

DNA-Einzelstrangbrüche sind eine mögliche Ursache für Chromosomenmutationen, Zahlreiche Methoden in der Genotoxizitätsprüfung beruhen auf dem Nachweis der klastogenen Wirkung einer Substanz. Die alkalische Filterelution (AFE) gilt neben dem *Comet Assay*, dem *Alkaline Unwinding* und dem Mikrokerntest als äußerst empfindliche Methode zum Nachweis klastogener Substanzen.

Die Methode der AFE wurde von Kohn im Jahre 1973 entwickelt. Die Nachweisgrenze der AFE für DNA-Einzelstrangbrüche beträgt ca. eine Läsion pro  $10^7$  Basenpaare (bp). Mit ionisierender Strahlung kann die Methode auf „Rad-

Äquivalente“ oder „Strangbrüche pro Mio Basenpaare“ kalibriert werden (Kohn und Grimek-Ewig, 1973).

Das Prinzip der AFE beruht auf dem unterschiedlichen Elutionsverhalten von geschädigter und ungeschädigter DNA unter denaturierenden alkalischen Bedingungen. Die Zellen werden als Suspension auf Polycarbonatfilter aufgebracht und lysiert. Die DNA bleibt in Doppelstrangform auf dem Filter zurück. Zusätzlich erfolgt meist eine Behandlung mit Proteinase K, um gebundene Proteine abzubauen. Die doppelhelikale DNA wird durch Behandlung mit einem stark alkalischen Puffer in Einzelstränge getrennt. Je nach Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche sind die Einzelstränge unterschiedlich lang und werden somit im sich anschließenden Elutionsschritt auch unterschiedlich schnell durch die Poren des Membranfilters gewaschen. Lange, nichtgeschädigte Einzelstränge verweilen dabei länger auf dem Filter als kurze Bruchstücke (Kohn, 1991; Stout und Becker, 1982).

Je nach Wahl der Versuchsbedingungen lassen sich mit Hilfe der AFE die folgenden DNA-Läsionen in Säugerzellen nachweisen (Kohn, 1991).

- DNA-Einzelstrangbrüche (SSB = single-strand breaks)  
SSB können als direkte Folge eines Angriffs auf das Zucker-Phosphat-Rückgrat (zum Beispiel durch reaktive Sauerstoffspezies) oder während der Basen- und Nukleotidexcisionsreparatur entstehen. Des Weiteren führen zytotoxische Effekte zur Freisetzung von DNAsen aus Lysosomen und damit zu einer Fragmentierung der DNA.
- DNA-Doppelstrangbrüche (DSB = single-strand breaks)  
DSB können zum Beispiel durch Topoisomerase-II-Hemmstoffe wie Etoposid verursacht werden (Minford et al., 1986).
- DNA-Protein-Quervernetzungen (DPC = DNA-protein crosslinks)  
Beispielsweise unter Einwirkung von Formaldehyd kann es zu DPC kommen.
- DNA-DNA-Quervernetzungen (ISC = interstrand crosslinks)

ISC werden unter anderem durch Psoralen unter Einwirkung von UV-Licht (UV-A, 320-400 nm) induziert. Dabei kommt es unter Bildung von Mono- und Bisaddukten zur Bindung von Psoralen an die DNA-Basen. Dies führt zur Quervernetzung der DNA-Stränge.

- Alkalilabile Stellen (ALS)

Apurine beziehungsweise apyrimidine (AP) Stellen, die eine lokale Abspaltung einer der Purin- oder Pyrimidinbasen vom Zucker-Phosphat-Rückgrat des DNA-Moleküls darstellen. Durch alkalische Behandlung werden ALS in SSB überführt. ALS können durch die folgenden Mechanismen entstehen:

- ionisierende Strahlung
- Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlänge z.B. UV-A
- Alkylierungen der Purine (N<sup>7</sup>-Position)
- Entfernung beschädigter Basen aus der DNA durch N-Glycosidasen
- Spontaner Purinverlust mit einer Rate von schätzungsweise 10000/Zelle/Tag
- Einbau von Nucleotid-Analoga wie z.B. 2'-Desoxyazacytidin (Lindahl, 1982; Kohn, 1991, Malvy et al., 2000).

Die Modifizierung der Methode mit Hilfe Schadens-spezifischer Endonukleasen (Abbildung 1.8) ermöglicht die Erfassung oxidativer DNA-Schäden (Epe et al., 1993). Durch das bakterielle DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (Fpg) können 8-Oxoguanin und Formamidopyrimidine nachgewiesen werden (zusammengefasst in Epe, 1995). Methylierte und ethylierte Basen werden ebenfalls detektiert (Speit et al., 2004). Das Fpg-Protein erkennt oxidativ modifizierte DNA-Basen und schneidet diese unter Bildung einer AP-Stelle heraus (Müller, 1990). Unter alkalischen Bedingungen werden die entstandenen AP-Stellen in SSB überführt und als Summenparameter aus ALS und endonukleasesensitiven Stellen (ESS) erfasst. Die zusätzlichen Strangbrüche, die durch Behandlung mit Fpg erzeugt werden, sind direkt proportional zur Anzahl oxidativer Schäden in der DNA. Die Anzahl der Einschnitte durch das Fpg-Protein ergibt sich aus der Differenz des oben beschriebenen Parameters ALS+ESS und der Anzahl der Strangbrüche ohne Fpg-Behandlung.

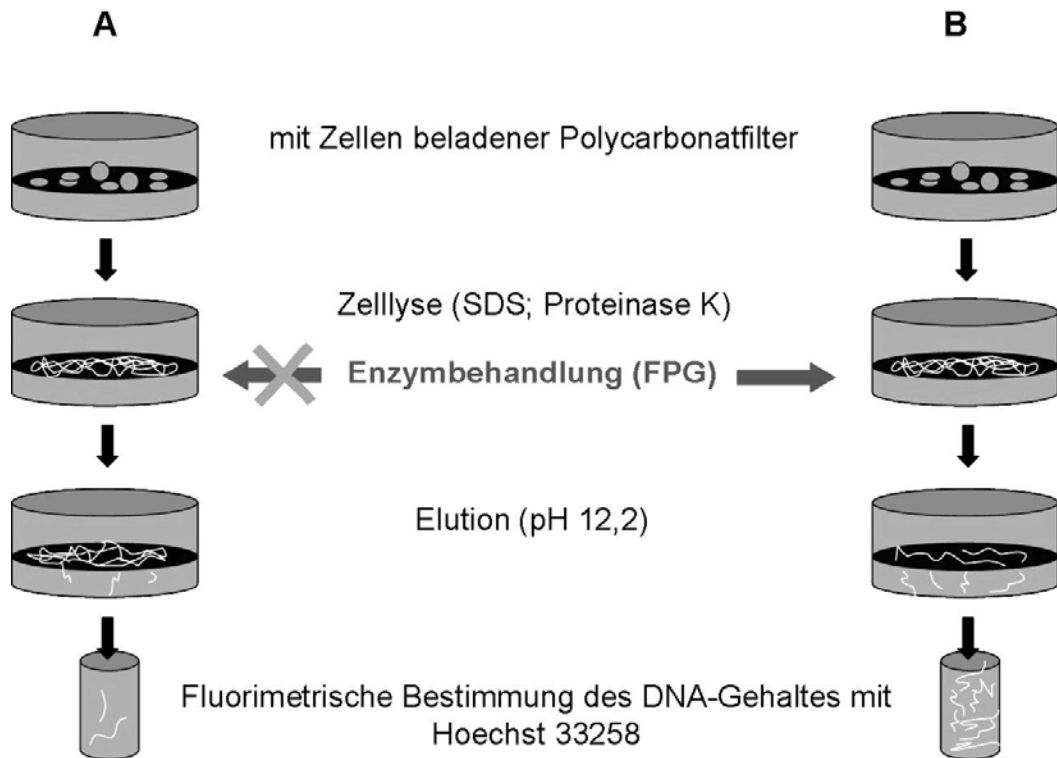


Abbildung 1.8: Schema der AFE zur Detektion von ALS (A) und ALS+ESS (B)

#### 1.4.2 Durchflußzytometrische Erfassung reaktiver Sauerstoffspezies mittels Dihydrocalcein Acetoxymethylester

Zur durchflußzytometrischen Bestimmung von ROS werden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die nach Eintritt in die Zelle erst durch ROS oxidiert werden müssen, um zu fluoreszieren. Dabei werden die gefärbten Zellen, die sich in Suspension befinden, durch einen Flüssigkeitsstrom in einer Kapillare fokussiert und erreichen so nacheinander die Messzelle. Hier werden sie von einem gebündelten Lichtstrahl beleuchtet, wobei es zu Fluoreszenzemissionen kommt. Durch ein optisches Detektionssystem werden die Emissionen jeder einzelnen Zelle quantifiziert (Raffael et al., 1994).

Dihydrocalcein Acetoxymethylester (DHC AM) ist ein nicht fluoreszierendes Molekül mit einem Molekulargewicht von 1068,95 g/mol und folgender Struktur (Abbildung 1.9).

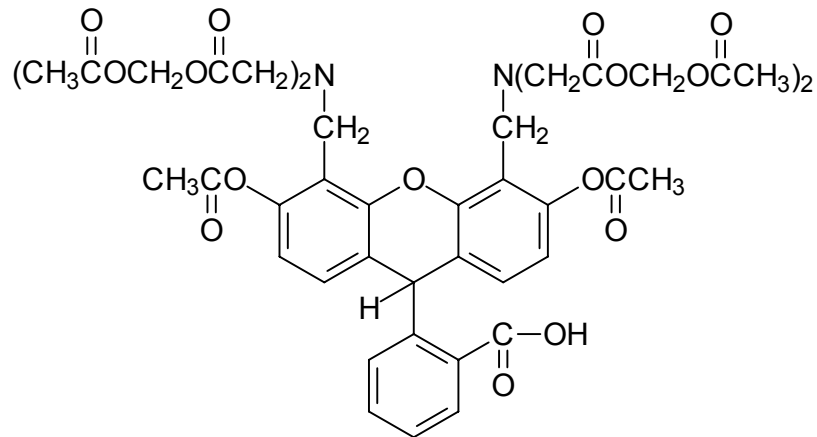


Abbildung 1.9: Strukturformel von DHC AM.

Die Messung der ROS mittels DHC AM beruht auf folgendem Prinzip:

Membrangängiges DHC AM diffundiert als ganzes Molekül durch die Zellmembran in die Zelle (Abbildung 1.10 A). Intrazelluläre Esterasen hydrolysieren die Estergruppen und es entsteht Dihydrocalcein (DHC), welches nicht fluoresziert und aufgrund seiner im Vergleich zu DHC AM polarerer Eigenschaft nicht mehr aus der Zelle diffundieren kann (Abbildung 1.10 B). Durch Reaktion mit ROS wird DHC zum fluoreszierenden Calcein oxidiert (Abbildung 1.10 C), welches durchflußzytometrisch erfasst werden kann. Die Fluoreszenz wird durch Anregung bei  $488 \pm 10$  nm und Emission bei  $525 \pm 10$  nm gemessen. Die Esterase-Aktivität sollte durch eine Substanzbehandlung nicht beeinträchtigt werden. Daher wird sie in Parallelansätzen mittels Calcein AM, welches nach intrazellulärer Hydrolyse fluoreszierendes Calcein freisetzt, überprüft.



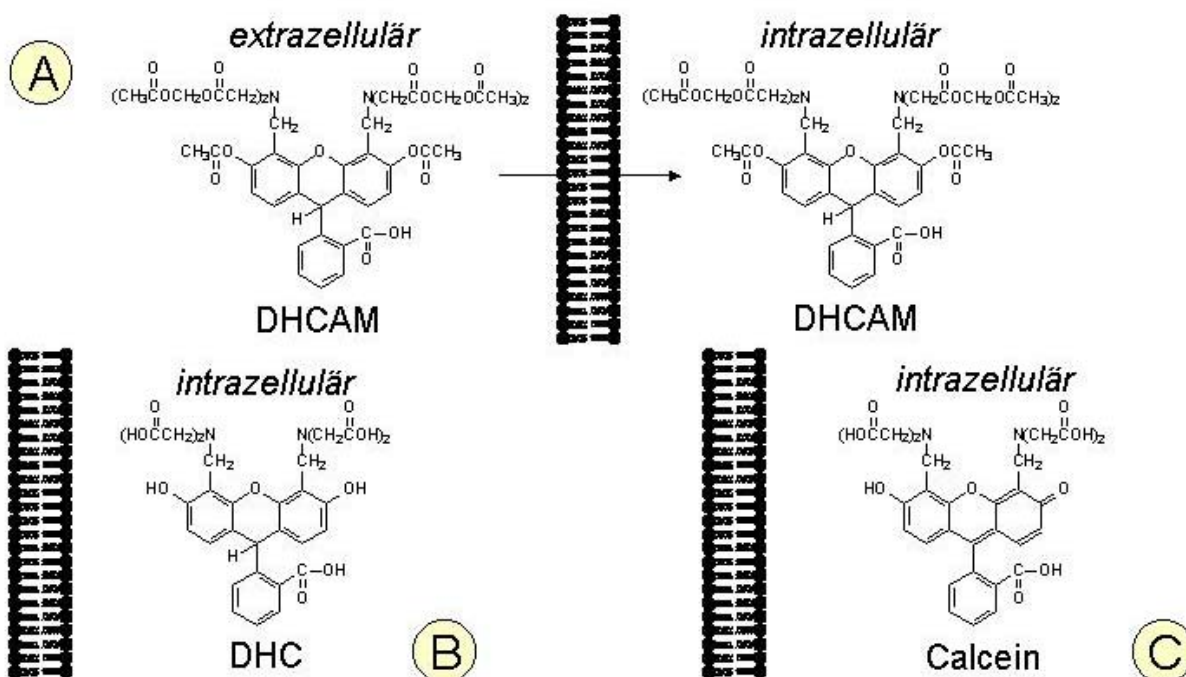


Abbildung 1.10: Schema der intrazellulären Bildung des Fluoreszenzfarbstoffes Calcein. DHCAM diffundiert durch die Zellmembran in die Zelle. Die Esterbindungen werden dort hydrolysiert. Das entstandene Dihydrocalcein (DHC) kann nun durch intrazelluläre ROS zu Calcein oxidiert werden, welches grün fluoresziert.

## 1.5 Positivkontrollen für ROS-generierende Substanzen

Ausgangspunkt für die Entstehung von ROS können die verschiedensten physikalischen, physiologischen und chemischen Reaktionen sein. Die physiologische Generierung von ROS wurde bereits in Kapitel 1.3.1 betrachtet. Im Folgenden soll ein Beispiel für die physikalische (sichtbares Licht) und zwei Beispiele für die chemische (Menadion und tert.-Butylhydroperoxid) Induktion von ROS erläutert werden.

### 1.5.1 sichtbares Licht

Riboflavin oder Porphyrine können durch Anregung mit sichtbarem Licht als Photosensibilisatoren fungieren. Photosensibilisatoren können durch Licht angeregt werden (angeregter Singulettzustand), über intersystem crossing in den angeregten Triplettzustand übergehen und beim Übergang in ihren Singulettzustand  $^1\text{O}_2$  aus  $^3\text{O}_2$

generieren. In ihrem angeregten Triplettzustand können Photosensibilisatoren anderen Substanzen ein Elektron entziehen (Wefers und Sies, 1986). Das so gebildete Photosensibilisatorradikal kann nun durch Reaktion mit molekularem  $O_2$  unter Bildung von  $O_2^{\cdot-}$  in seinen Ausgangszustand zurückkehren (Mahns et al., 2003). Da die Lebensdauer von  $^1O_2$  nur  $10^{-6}$  sec beträgt, ist bei der Versuchsplanung auf eine gleichzeitige Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff und dem ROS-generierenden System zu achten, um auch kurzlebige ROS erfassen zu können.  $O_2^{\cdot-}$  hingegen wird enzymatisch abgebaut (Tabelle 1.1).

### 1.5.2 tert.-Butylhydroperoxid

Tert.-Butylhydroperoxid (t-BHP) vermag Peroxylradikale ( $ROO^{\cdot}$ ) zu bilden.  $ROO^{\cdot}$  haben eine Lebenszeit von 7 s (Tabelle 1.1) und sind somit deutlich weniger reaktiv als  $^1O_2$ , aber reaktiver als Semichinonradikale (Sies, 1993). Im Hinblick auf die Versuchsplanung mit t-BHP sollte der Fluoreszenzfarbstoff aufgrund der geringen Lebenszeit von  $ROO^{\cdot}$  gleichzeitig mit t-BHP inkubiert werden.

### 1.5.3 Menadion

Menadion ist ein Naphthachinonderivat und wird aufgrund seiner Struktur für die Bildung von ROS verantwortlich gemacht. Es wird vermutet, dass Menadion mit seiner chinoiden Struktur in *Redoxcycling* eintreten kann und zum Semichinon beziehungsweise Hydrochinon reagieren kann (Abbildung 1.11).

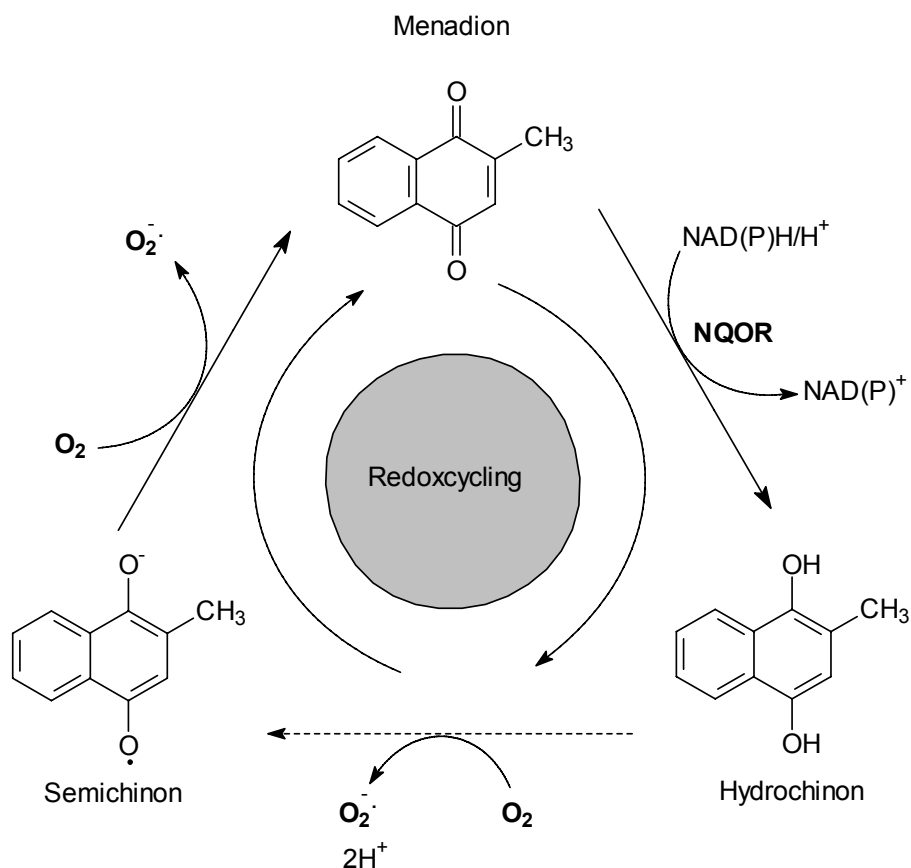


Abbildung 1.11: *Redoxcycling* von Menadion. NQOR= NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase (Klotz, 2002).

Menadion kann in der Zelle durch NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase durch Oxidation von NAD(P)H/H<sup>+</sup> zum Hydrochinon reduziert werden. Das Hydrochinon kann weiter, unter Generierung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> aus molekularem Sauerstoff, zum Semichinon reagieren. O<sub>2</sub><sup>-</sup> selbst ist nicht besonders reaktiv, es wird durch die Superoxiddismutase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgewandelt, welches Hydroxylradikale bilden kann (Epe, 1995). Das gebildete langlebige Semichinon kann durch Reduktion mit molekularem Sauerstoff zu O<sub>2</sub><sup>-</sup> wieder zu Menadion oxidiert werden und erneut in den Prozess des *Redoxcyclings* eintreten (zusammengefasst in Bolton et al., 2000).

Im Gegensatz zu den Positivkontrollen sichtbares Licht und t-BHP können die Redoxcycler mehrmals ROS generieren, da sie wieder zur Ausgangssubstanz regeneriert werden können.

Wie Menadion auch, können CE in *Redoxcycling* eintreten (Kapitel 1.1) und während ihrer Oxidation zum Semichinon O<sub>2</sub><sup>-</sup> generieren. Der Bildung der Semichinonradikale geht also eine Generierung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> voraus.

## 2 Problemstellung

Dem endogenen Hormon  $17\beta$ -Estradiol wird bei der Entstehung hormonabhängiger Tumoren wie Brustkrebs eine wichtige Rolle zugesprochen. Eine DNA-Schädigung durch den oxidativen Metaboliten 4-Hydroxyestradiol scheint hierbei von Bedeutung zu sein. Aufgrund seiner Catecholstruktur kann 4-Hydroxyestradiol in *Redoxcycling* eintreten. Während dieses Prozesses können ein direkt DNA-schädigendes Chinon sowie reaktive Sauerstoffspezies entstehen, die aufgrund ihrer hohen Reaktivität mit molekularen Strukturen der Zelle wie zum Beispiel DNA, Proteine oder Lipide reagieren, und somit zu strukturellen und funktionellen Störungen führen können.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Induktion von DNA-Schäden und intrazellulärem oxidativen Stress in kultivierten Zellen durch  $17\beta$ -Estradiol und 4-Hydroxyestradiol an den Endpunkten intrazellulärer Spiegel reaktiver Sauerstoffspezies (Durchflußzytometrie), Chromosomenmutation (Mikrokerntest), DNA-Strangbrüche und apurine Stellen (alkalische Filterelution und alkalischer Comet Assay) sowie oxidative DNA Basenmodifikationen (Formamidopyrimidinglycosylase-Modifikation der alkalischen Filterelution und des Comet Assays) untersucht werden. Des Weiteren soll der Einfluss der Stimulation des intrazellulären Metabolismus von  $17\beta$ -Estradiol durch 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo[p]dioxin auf die Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies untersucht werden.

Als Positivkontrollen für reaktive Sauerstoffspezies sollen Singulett-Sauerstoff (sichtbares Licht), Peroxylradikale (tert.-Butylhydroperoxid), Superoxidanionradikale (Kaliumsuperoxid), und intrazellulär durch *Redoxcycling* generierte Superoxidanionradikale (Menadion) dienen.

Den Isoflavonen Genistein und Daidzein, wird eine protektive Rolle bei der hormonellen Kanzerogenese zugeschrieben. Daher soll der Einfluss von Genistein und Daidzein sowohl auf basalen als auch induzierten genotoxischen und oxidativen Stress untersucht werden.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Positivkontrollen

Um für die durchflußzytometrische Bestimmung von ROS und die Erfassung oxidativer DNA-Schäden mittels AFE geeignete Positivkontrollen zu finden, wurden MCF-7 Zellen mit Kaliumsuperoxid ( $\text{KO}_2$ ), tert.-Butylhydroperoxid (t-BHP) und Menadion behandelt beziehungsweise mit sichtbarem Licht bestrahlt und auf die Induktion von ROS und oxidativer DNA-Schäden hin untersucht.

#### 3.1.1 Bestrahlung mit sichtbarem Licht

##### 3.1.1.1 Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht

MCF-7 Zellen wurden, in PBS-G auf einem Eisblock gelagert und mit sichtbarem Licht hoher Intensität (1,5 kJ) für 0, 10, 20 und 30 Minuten bestrahlt. Sichtbares Licht vermag  $^1\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^{\cdot-}$  zu induzieren, aus denen in der Zelle weitere reaktive Sauerstoffspezies wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{OH}^{\cdot}$  entstehen können (Epe et al., 1993). Anschließend wurde ein Teil der Zellen direkt durchflußzytometrisch gemessen und der andere Teil der AFE (Kapitel 3.1.1.2) zugeführt.

Nach 10-minütiger Bestrahlung stieg die induzierte Fluoreszenzintensität (FI) der mit Dihydrocalcein AM behandelten Zellen um etwa 2 Fluoreszenzeinheiten an und stieg nach 30-minütiger Bestrahlung um 13 Fluoreszenzeinheiten an (Abbildung 3.1).

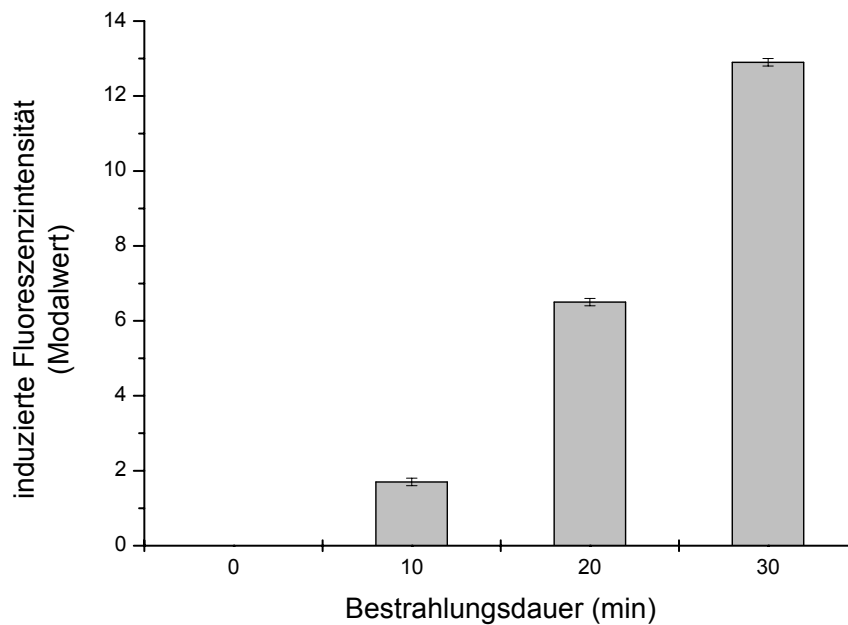


Abbildung 3.1: Induzierte Fluoreszenzintensität nach 0, 10, 20 und 30 min Bestrahlung von suspendierten MCF-7 Zellen mit sichtbarem Licht. Die Fehlerbalken stellen die Range/2 der Doppelbestimmung eines Versuches dar.

Aufgrund der Doppelbestimmung eines Versuches konnte ein Zeit- und somit Dosis-abhängiger Anstieg der induzierten FI in MCF-7 Zellen beobachtet werden, was für eine verstärkte ROS-Bildung durch sichtbares Licht spricht.

### 3.1.1.2 Induktion oxidativer DNA-Schäden durch Bestrahlung von MCF-7 Zellen mit sichtbarem Licht

Die bestrahlten Zellen werden in Suspension auf Polycarbonatfilter überführt, dort lysiert und anschließend mit alkalischem Puffer behandelt. Die Methode der AFE basiert auf den unterschiedlichen Geschwindigkeiten, mit denen ungeschädigte DNA und geschädigte DNA mit alkalischem Puffer vom Filter herunter gewaschen werden (Kohn et al. 1976). Je höher der Schädigungsgrad der DNA ist, desto schneller eluieren die DNA-Bruchstücke vom Filter. Der Schädigungsgrad der DNA drückt sich im Elutionsprofil (Kapitel 5.4) in einer Steigungszunahme gegenüber der Lösungsmittelkontrolle aus. Mittels AFE können DNA-Einzelstrangbrüche, DNA-Doppelstrangbrüche und Alkali-labile Stellen (ALS) als Summenparameter nachgewiesen werden (Kohn et al. 1976). Zur Vereinfachung wird bei der Betrachtung dieser Schadensarten im Folgenden von ALS gesprochen. Zum Nachweis oxidativer DNA-Schäden wird das bakterielle DNA-Reparaturenzym

Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (Fpg) verwendet, welches die DNA an Stellen mit oxidativen DNA-Schäden wie 8-Oxoguanin und Formamidopyrimidin spezifisch einschneidet (Epe et al., 1993; Epe, 1995). Die Fpg vermag des Weiteren an methylierten und ethylierten Basen einzuschneiden (Speit et al., 2004). Durch die Wirkung der Fpg werden zusätzliche Strangbrüche erzeugt, welche direkt proportional zur Anzahl oxidativer DNA-Schäden sind. Die Berechnung der ALS und ESS ist in Kapitel 5.4 beschrieben.

Um sicherzustellen, dass die AFE zur Detektion von ALS und ESS geeignet ist, wurden MCF-7 Zellen mit sichtbarem Licht bestrahlt und der AFE zugeführt (Pflaum et al., 1998). Die Zahl der ALS stieg nach 20-minütiger Bestrahlung leicht um  $0,47 \pm 0,21$  ALS/Mio bp an (Abbildung 3.2).

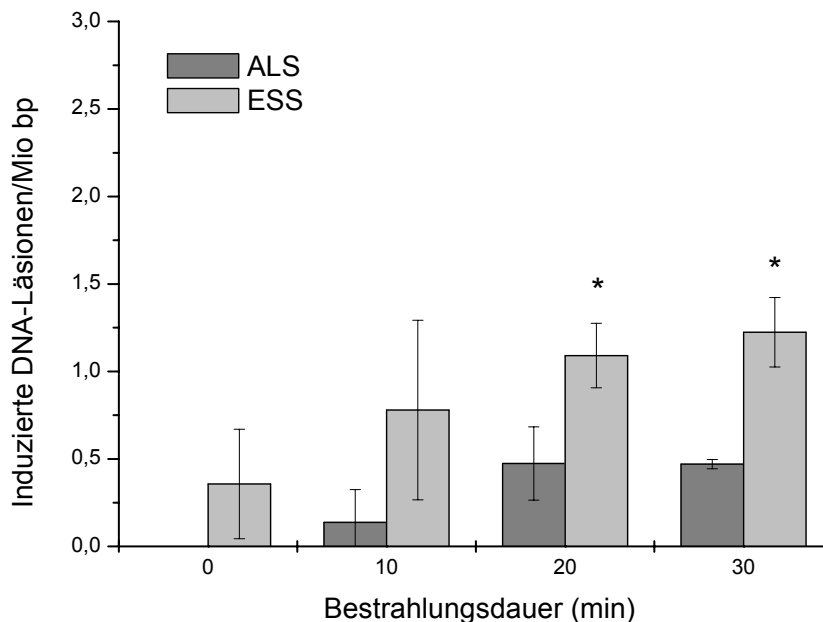


Abbildung 3.2: Induzierte DNA-Schäden/ $10^6$  Basenpaare nach Bestrahlung von MCF-7 Zellen mit sichtbarem Licht. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen. \*:  $p < 0,05$  (t-Test gegenüber der unbestrahlten Kontrolle).

Mit zunehmender Dauer der Bestrahlung stieg ebenfalls die Zahl der ESS an. So kam es zu einem signifikanten Anstieg bereits nach 20-minütiger Bestrahlung. Der maximale Effekt wurde durch 30-minütige Bestrahlung erzielt, nach welcher die Zahl der ESS von  $0,36 \pm 0,31$  ESS/Mio bp in unbestrahlten Zellen auf  $1,22 \pm 0,19$  ESS/Mio bp anstieg. Pflaum et al. (1998a) bestimmten mittels AFE die Grundlevel an Fpg-sensitiven DNA-Basenmodifikationen in verschiedenen, unbehandelten Säugerzellen und konnten etwa  $0,3$  ESS/Mio bp nachweisen (Pflaum et al., 1998a).

Eine Untersuchung verschiedener Säugerzellen mittels AFE zeigte Grundschäden von etwa 0,25-0,4 ESS/Mio bp (Will et al., 1998). Diese Werte entsprechen auch dem für MCF-7 Zellen detektierten Wert der Lösungsmittelkontrolle. Das System AFE erwies sich somit unter oben beschriebenen Bedingungen als geeignete Methode zur Detektion von durch Licht induzierten DNA-Schäden.

Pflaum et al. (1998b) konnten zeigen, dass die Anzahl Fpg-sensitiver Stellen neben der Bestrahlungsdauer auch vom Porphyrin-Gehalt der Zellen abhängt. Mit steigendem Gehalt an Porphyrin, stieg auch die Anzahl oxidativer Schäden (Pflaum et al., 1998b). Porphyrine scheinen als intrazelluläre Photosensibilisatoren zu wirken, die ROS erzeugen. Durch Einwirkung von Licht kann es zur Generierung von Singulett-Sauerstoff kommen. Des Weiteren können durch Licht angeregte Photosensibilisatoren auch direkt mit der DNA reagieren (Epe, 1995). Das Produkt der C-8 Hydroxylierung von Guanin, 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyGuanosin (8-oxodG), ist ein wichtiger Marker für oxidative DNA-Schäden. Das Verhältnis von 8-oxodG zu deoxyGuanosin (dG) gilt als direktes Maß für durch ROS induzierte DNA-Basenmodifikationen (Fischer-Nielsen et al., 1994). In Untersuchungen isolierter Rattenhepatozyten, die mit sichtbarem Licht bestrahlt wurden, konnten mittels HPLC oxidative DNA-Schäden in Form von 8-oxodG festgestellt werden. Durch Bestrahlung der Hepatozyten kam es zu einer Verfünffachung der 8-oxodG-Kontrollwerte (Fischer-Nielsen et al., 1994).

### 3.1.1.3 Bestimmung durch sichtbares Licht induzierter, oxidativer DNA-Schäden in V79-Zellen mittels AFE

Zur Induktion oxidativer DNA-Schäden wurden in PBS-G suspendierte V79-Zellen mit sichtbarem Licht auf Eis bestrahlt (Pflaum et al., 1998; Kielbassa et al., 1997). Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe der AFE untersucht. Es wurde ein Zeit- und somit Dosis-abhängiger Anstieg der ALS-Rate und der Anzahl an ESS beobachtet (Abbildung 3.3).



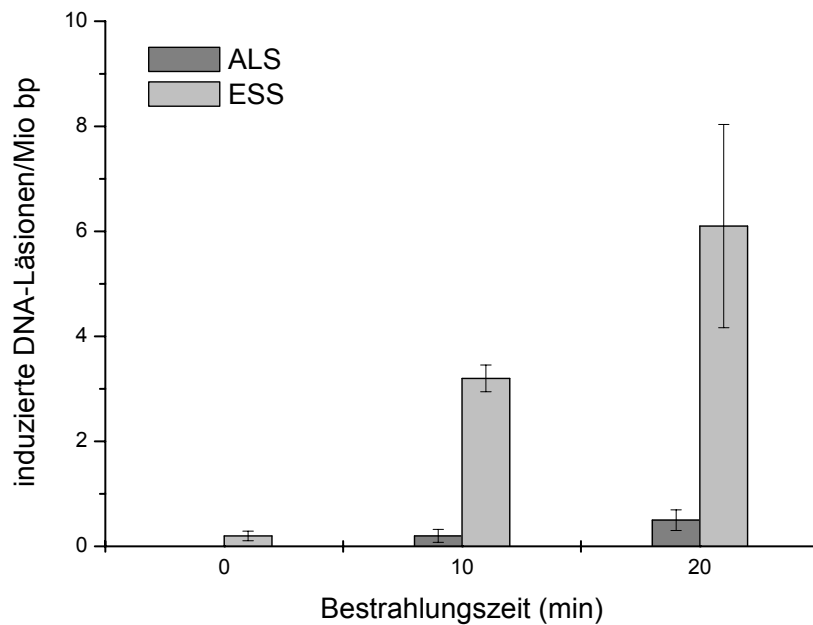


Abbildung 3.3: Induzierte DNA-Schäden/ $10^6$  Basenpaare nach Bestrahlung auf Eis von in PBS-G suspendierten V79-Zellen mit sichtbarem Licht. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen.

Der Grundschaden der V79-Zellen betrug etwa 0,2 ESS pro Mio bp. Durch 10-minütige Bestrahlung mit sichtbarem Licht wurde die Anzahl der ALS um etwa 0,2 pro Mio bp und die Anzahl der ESS um etwa 3,2 pro Mio bp erhöht. Nach einer Bestrahlung der Zellen von 20 min kam es etwa zu  $6,1 \pm 1,9$  ESS pro Mio bp. Die Grundschäden unbehandelter beziehungsweise unbestrahlter Zellen lagen sowohl bei MCF-7 Zellen mit 0,36 ESS/Mio bp (Kapitel 3.1.1.2) als auch V79-Zellen (0,2 ESS/Mio bp) im Bereich der Literaturwerte für Säugerzellen (etwa 0,25-0,4 ESS/Mio bp) (Will et. al, 1998). Während eine 20-minütige Bestrahlung von suspendierten V79-Zellen in etwa 6 ESS/Mio bp resultierte (Abbildung 3.3), kam es durch die gleiche Bestrahlungsdauer bei MCF-7 Zellen nur zu etwa 1,2 ESS/Mio bp (Abbildung 3.2). Während der Bestrahlung befanden sich die MCF-7 Zellen, anders als die V79-Zellen, nicht in Suspension, sondern wurden in angewachsenem Zustand in Zellkulturflaschen bestrahlt. Wahrscheinlich ist die niedrigere Rate an ESS bei MCF-7 Zellen darauf zurückzuführen.

### 3.1.1.4 Bestimmung des DNA-strangbrechenden Potentials von sichtbarem Licht in V79-Zellen mittels Comet Assay

Ein Teil der zur Induktion oxidativer DNA-Schäden mit sichtbarem Licht bestrahlten Zellen wurde mit Hilfe des Comet Assays analysiert. Mit zunehmender Bestrahlungsdauer der Zellen kam es auch zu steigenden Schadenskennzahlen der Zellpopulationen (Abbildung 3.4).

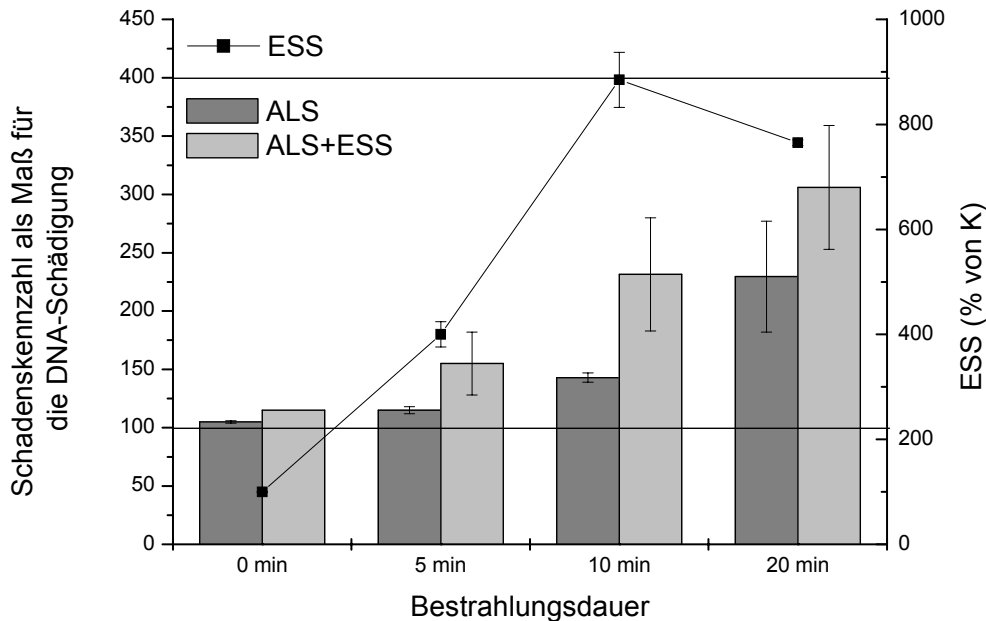


Abbildung 3.4: DNA-Schäden in V79-Zellen nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht. Die Analyse erfolgte mittels Comet Assay durch Einteilung der Zellen nach Schädigungsgrad der DNA in verschiedene Schadenskategorien. 100 analysierte Zellen, minimaler Effekt 100 (alle Zellen ungeschädigt), maximaler Effekt 400 (alle untersuchten Zellen stark geschädigt). Die Differenzen beider Werte sind als ESS (Linie in Verbindung mit rechter Y-Achse) dargestellt. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Die Schadenskennzahlen sind ein Maß für die Schädigung der DNA und können sowohl für ALS als auch ESS bestimmt werden (Kapitel 5.6). Es wurden die ALS und der Summenparameter ALS und ESS bestimmt. Die Differenz beider Werte liefert die ESS, die in Abbildung 3.4 als % der Kontrolle (rechte Y-Achse) gegen die Bestrahlungsdauer aufgetragen sind. Bereits nach 5-minütiger Bestrahlung der Zellen kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer Vervierfachung der Anzahl an ESS. Nach der Bestrahlung für 10 min kam es gegenüber der Kontrolle fast zur 9-fachen Anzahl der ESS. Mit zunehmender Bestrahlungsdauer nahm sowohl die Schadenskennzahl für ALS als auch für ALS und ESS gemeinsam weiter zu. Die Differenz beider Werte, die für oxidative DNA-Schäden (ESS) steht, erreichte

maximal etwa den 8-fachen Wert der Kontrolle. Mittels *Comet Assay* konnten somit durch sichtbares Licht induzierte ALS und ESS erfolgreich detektiert werden. Während es durch 10-minütige Bestrahlung von V79-Zellen in dem mittels AFE analysierten Aliquot der Zellsuspension gegenüber der Kontrolle etwa zum 16-fachen Wert an ESS kam (Kapitel 3.1.1.3), stieg die Anzahl an ESS, die mittels *Comet Assay* detektiert wurde, auf etwa den 9-fachen Wert der Kontrolle an. Somit wurden sowohl mit AFE als auch *Comet Assay* mit zunehmender Bestrahlungsdauer eine dosisabhängige Zunahme an ESS beobachtet.

### **3.1.2 Untersuchung des genotoxischen Potentials von Kaliumsuperoxid**

#### **3.1.2.1 Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit Kaliumsuperoxid**

Die Funktionsfähigkeit intrazellulärer Esterasen spielt bei der Erfassung von ROS eine grundlegende Rolle (Kapitel 1.4.2). Nichtfluoreszierendes DHC AM muß in der Zelle von Esterasen zu DHC hydrolysiert werden, bevor es durch ROS zum fluoreszierenden Calcein oxidiert werden kann. Als adäquater Farbstoff zur Überprüfung der Esteraseaktivität erwies sich Calcein AM. Analog zu DHC AM wird Calcein AM durch Esterasen zu Calcein umgesetzt, welches jedoch direkt fluoresziert, ohne noch oxidiert werden zu müssen. Zur Überprüfung des Einflusses von  $\text{KO}_2$  auf die Esteraseaktivität, wurden MCF-7 Zellen für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  in Suspension mit  $\text{KO}_2$  inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und der intrazelluläre Calcein-Gehalt durchflußzytometrisch bestimmt.

Die Anzahl Calcein-positiver Zellen mit grüner Fluoreszenz blieb über den gesamten Konzentrationsbereich von 1-100  $\mu\text{M}$   $\text{KO}_2$  konstant (Abbildung 3.5).

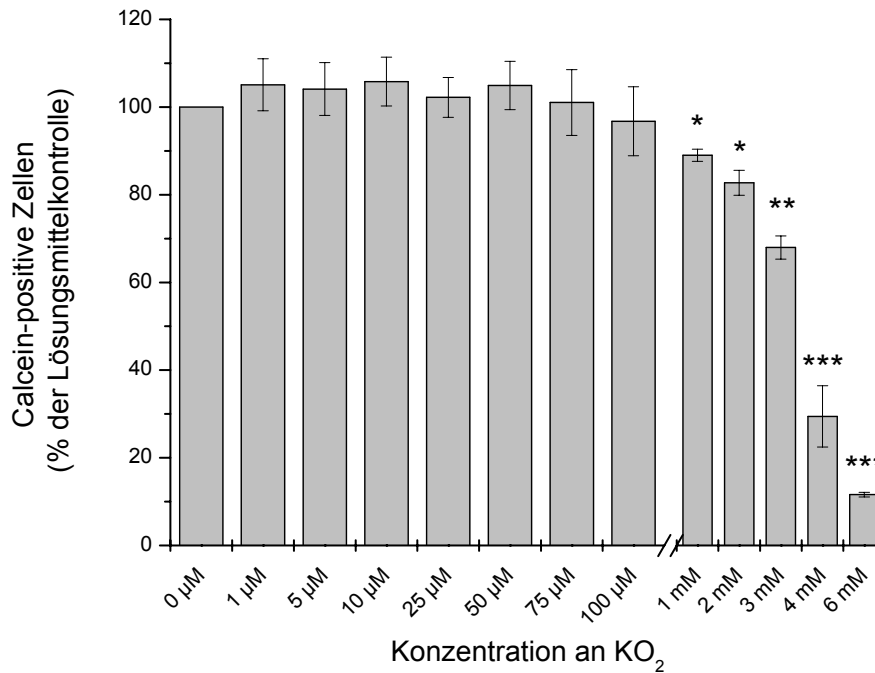


Abbildung 3.5: Prozentualer Anteil Calcein-positiver Zellen nach 1 h Behandlung suspendierter MCF-7 Zellen mit  $\text{KO}_2$ . Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar.

Etwa  $100 \pm 5\%$  sowohl der Kontrollzellen als auch der mit  $\text{KO}_2$  behandelten Zellen konnten Calcein AM zu grün fluoreszierendem Calcein umsetzen.  $\text{KO}_2$  beeinflusste somit die Esteraseaktivität der Zellen in diesem Konzentrationsbereich nicht. Erst ab Konzentrationen von 1 mM  $\text{KO}_2$  und mehr kam es zu einer signifikanten Abnahme Calcein-positiver Zellen und somit zu Effekten, welche die Esteraseaktivität beeinträchtigten. Das Ergebnis der Bestimmung der Esteraseaktivität lässt eine Messung des ROS-generierenden Potentials im Konzentrationsbereich bis 100  $\mu\text{M}$   $\text{KO}_2$  zu.

MCF-7 Zellen wurden in Suspension für 1 h gleichzeitig mit DHC AM und  $\text{KO}_2$  bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Dieser Zeitraum hat sich in Vorversuchen für die Aufnahme von DHC AM, die Abspaltung dessen Estergruppen und anschließende Oxidation durch ROS bewährt. Nach Behandlung von MCF-7 Zellen mit bis zu 100  $\mu\text{M}$   $\text{KO}_2$  zeigte die induzierte FI keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrolle (Abbildung 3.6).

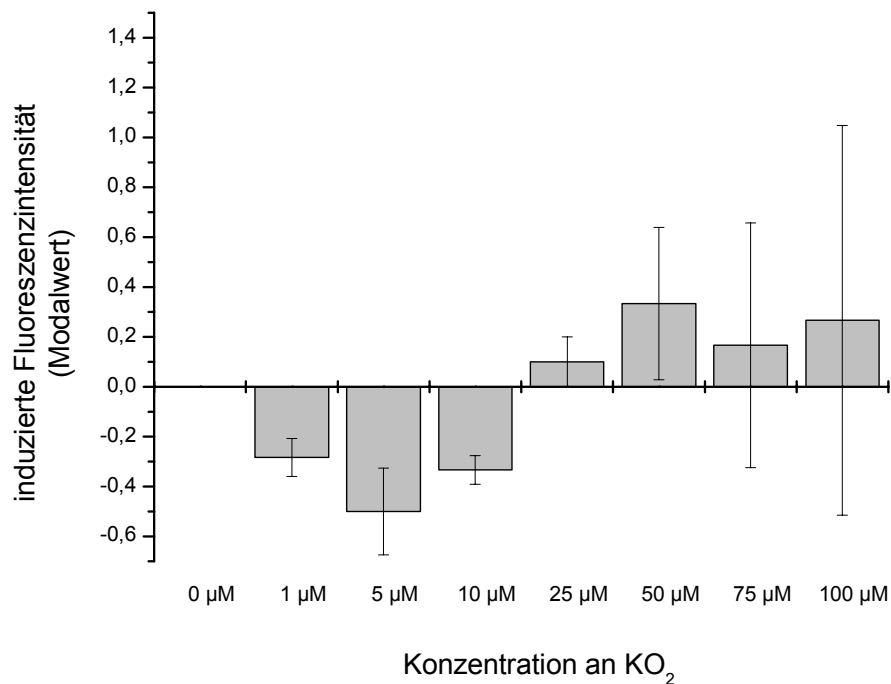


Abbildung 3.6: Induzierte Fluoreszenzintensität nach 1 h Behandlung von suspendierten MCF-7 Zellen mit  $\text{KO}_2$ . Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar.

Nach 1-stündiger Behandlung von MCF-7 Zellen mit  $\text{KO}_2$  konnte kein Einfluss auf den intrazellulären ROS-Spiegel beobachtet werden. Mit Hilfe der durchflußzytometrischen Methode zur Bestimmung von ROS konnten mit dem verwendeten Farbstoff DHC AM somit keine durch  $\text{KO}_2$  induzierten ROS detektiert werden. Aufgrund seiner Reaktivität kann es bereits vor Eintritt in die Zelle zu einem Abreagieren von  $\text{KO}_2$  gekommen sein. Es ist weiterhin möglich, dass  $\text{O}_2^{\cdot-}$  nicht mit DHC AM erfasst wird.

Rothe und Valet (1990) untersuchten die  $\text{KO}_2$ -vermittelte Induktion von ROS mittels Durchflußzytometrie und 2',7'-Dichlorfluorescein-Diacetat (DCFH-DA) sowohl in Leukozyten als auch im zellfreien System. Analog zum Aufnahmemechanismus von DHC AM wird nicht fluoreszierendes DCFH-DA in die Zelle aufgenommen, und nach enzymatischer Abspaltung der Acetatgruppen (DCFH) durch intrazelluläre ROS zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert. Weder die Behandlung der Zellen mit 48,8 mM  $\text{KO}_2$ , noch Oxidationsversuche mit  $\text{KO}_2$  im zellfreien Küvetten-Assay zeigten gegenüber unbehandelten Kontrollen erhöhte Fluoreszenzen. Somit schien  $\text{O}_2^{\cdot-}$  auch mittels DCFH-DA nicht erfasst zu werden (Rothe und Valet, 1990).

### 3.1.2.2 Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 1-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit Kaliumsuperoxid

Für die Erfassung von DNA-Schäden ist es von großer Bedeutung eine tatsächlich substanzinduzierte Zunahme der Schädigung von DNA-Schäden, die auf zytotoxische Effekte zurückzuführen sind, abzugrenzen. So kann es beispielsweise durch defekte Zellmembranen, hervorgerufen durch zytotoxische Effekte, zur Freisetzung endogener Nukleasen kommen, die eine Schädigung der DNA verursachen können (Eastman und Barry, 1992; Elia et al., 1993; Saelens und Festjens, 2004). Unter diesen Umständen käme es zu einer DNA-Schädigung, die jedoch nicht auf einem DNA-Schädigungspotential der Substanz beruht.

Daher wurden, zur Überprüfung der Membranintegrität, MCF-7 Zellen für 1 h bei 37°C in Suspension mit  $\text{KO}_2$  inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und unmittelbar vor der Messung Propidiumiodid (PI) hinzugefügt. Da der DNA-Farbstoff PI nicht membrangängig ist und nur Zellkerne mit defekter Membran rot zu färben vermag, können nach durchflußzytometrischer Messung der Anzahl rot fluoreszierender Zellkerne Aussagen über die Membranintegrität getroffen werden.

Über den gesamten Konzentrationsbereich von 1-100  $\mu\text{M}$   $\text{KO}_2$  kam es zu keiner signifikanten Veränderung des Anteils der Zellen mit geschädigter Zellmembran (Abbildung 3.7).

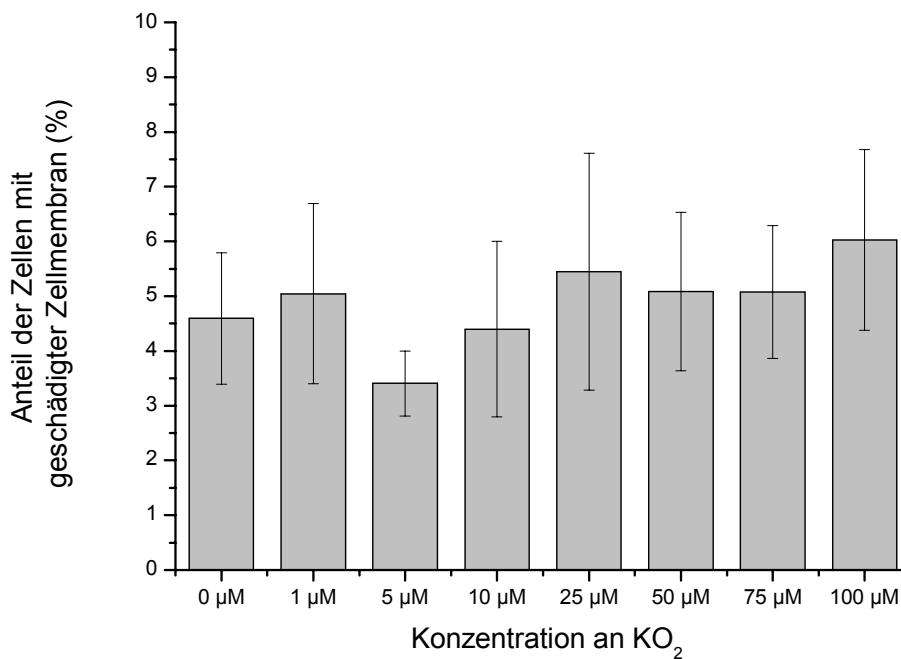


Abbildung 3.7: Prozentualer Anteil der Zellpopulation mit geschädigter Zellmembran nach 1 h Behandlung von MCF-7 Zellen mit  $\text{KO}_2$ . Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar.

Alle Werte lagen im Schwankungsbereich des Anteils der Kontrollzellen mit geschädigter Zellmembran bei  $4,6 \pm 1,2\%$ . Eine membranschädigende Wirkung von  $\text{KO}_2$  unter obigen Bedingungen konnte somit nicht festgestellt werden.

MCF-7 Zellen wurden in Suspension bei  $37^\circ\text{C}$  für 1 h mit  $\text{KO}_2$  inkubiert. Zur Erfassung der ALS und ESS wurden sie anschließend mittels AFE analysiert. Ein Teil der Zellen wurde zur Erfassung oxidativer DNA-Basenmodifikationen mit Fpg-Protein behandelt, der andere nur mit Enzypuffer ohne Fpg. Die Differenz beider Werte steht für ESS. Die Anzahl an ALS und ESS wiesen ab  $20 \mu\text{M}$   $\text{KO}_2$  (ESS) beziehungsweise  $25 \mu\text{M}$   $\text{KO}_2$  (ALS) signifikante Unterschiede auf. Sowohl die Anzahl der ALS als auch der ESS nahm mit steigender  $\text{KO}_2$ -Konzentration zu (Abbildung 3.8).

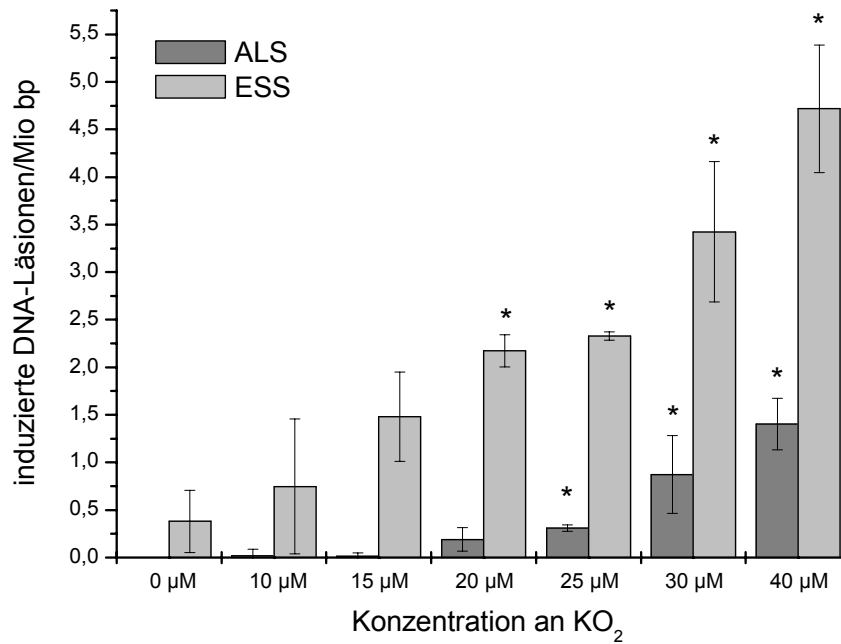


Abbildung 3.8: Induzierte Strangbrüche/ $10^6$  Basenpaare (bp) nach 1-stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit  $\text{KO}_2$ . Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar. \*:  $p < 0,05$  (t-Test)

Durch Behandlung mit  $40 \mu\text{M}$   $\text{KO}_2$  kam es mit  $4,7 \pm 0,67$  ESS/Mio bp zu einer etwa 12-fach höheren Anzahl an oxidativen DNA-Schäden, als in den Kontrollzellen ( $0,38 \pm 0,32$  ESS/Mio bp). Die Anzahl an ALS stieg nach Behandlung mit  $40 \mu\text{M}$   $\text{KO}_2$  auf  $1,4 \pm 0,27$  ALS/Mio bp an.  $\text{KO}_2$  induzierte unter den genannten Bedingungen leicht ALS und verstärkt ESS. Die Methode AFE war somit zur Detektion oxidativer DNA-Läsionen geeignet. Während mit der durchflußzytometrischen Methode auch nach Behandlung mit  $\text{KO}_2$ -Konzentrationen bis  $100 \mu\text{M}$  keine ROS detektiert werden konnten (Kapitel 3.1.2.1), wurde mittels AFE bereits ab  $20 \mu\text{M}$   $\text{KO}_2$  eine signifikante Erhöhung der Anzahl oxidativer DNA-Schäden beobachtet. Dies kann als weiterer Hinweis dahingehend gewertet werden, dass in der durchflußzytometrischen Methode mittels DHC AM offensichtlich keine  $\text{O}_2^-$  erfasst werden können.

Mittels *Comet Assay* konnten Speit et al. (1999) in V79-Zellen nach 1-stündiger Behandlung mit  $\text{KO}_2$  im Konzentrationsbereich von  $50$ - $150 \mu\text{M}$  eine konzentrationsabhängige, signifikante Zunahme des Anteils der DNA im Schweif der sich nach der Elektrophorese als Kometen darstellenden Zellen (*tail moment*) feststellen. Anders als in der vorliegenden Arbeit wurde dieser Effekt durch eine Behandlung mit Fpg nicht zusätzlich verstärkt. Die Analyse von 8-oxodG mittels HPLC zeigte ebenfalls



nur eine leichte, nicht signifikante Zunahme der 8-oxodG-Level nach Behandlung mit  $\text{KO}_2$  (Speit et al., 1999).

### 3.1.3 Untersuchung des genotoxischen Potentials von tert.-Butylhydroperoxid

#### 3.1.3.1 Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit tert.-Butylhydroperoxid

Um den Einfluss von t-BHP auf die Esteraseaktivität der Zellen zu überprüfen, wurden MCF-7 Zellen für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  in Suspension mit t-BHP inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und der intrazelluläre Calcein-Gehalt durchflußzytometrisch bestimmt.

Über den gesamten Konzentrationsbereich von 100 nM - 700  $\mu\text{M}$  t-BHP blieb die Anzahl Calcein-positiver Zellen mit grüner Fluoreszenz konstant (Abbildung 3.9).

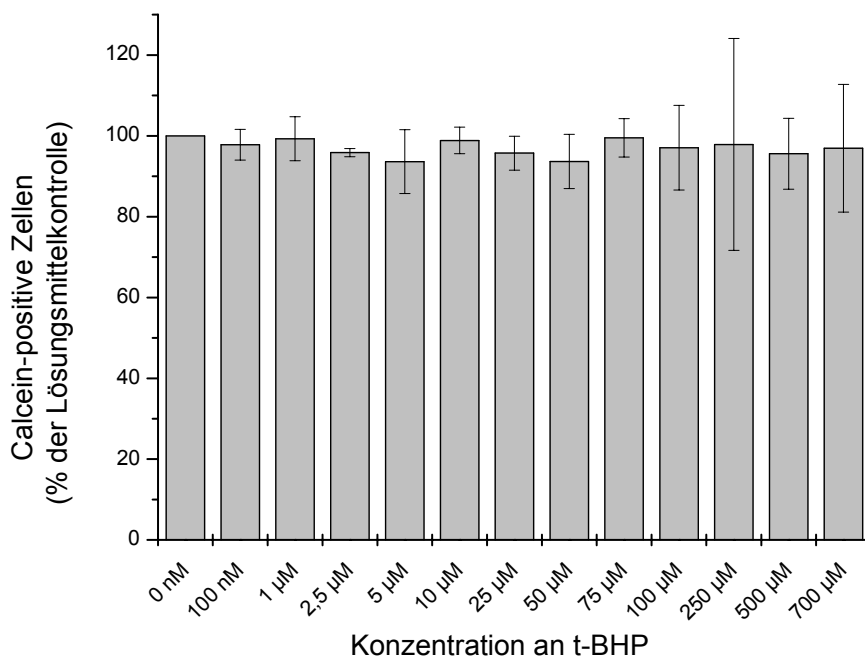


Abbildung 3.9: Prozentualer Anteil Calcein-positiver Zellen nach 1 h Behandlung suspendierter MCF-7 Zellen mit t-BHP. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar.

Somit wirkte t-BHP bezüglich der Esteraseaktivität in obigem Konzentrationsbereich nicht zytotoxisch, wodurch eine Messung des ROS-generierenden Potentials im gesamten Konzentrationsbereich bis 700  $\mu\text{M}$  durchgeführt werden konnte.

Suspendierte MCF-7 Zellen wurden für 1 h gleichzeitig mit DHC AM und t-BHP bei 37°C inkubiert. Bereits die Behandlung mit 5 µM t-BHP hatte eine Erhöhung der induzierten FI gegenüber der Kontrolle um 1 Fluoreszenzeinheit zur Folge (Abbildung 3.10)

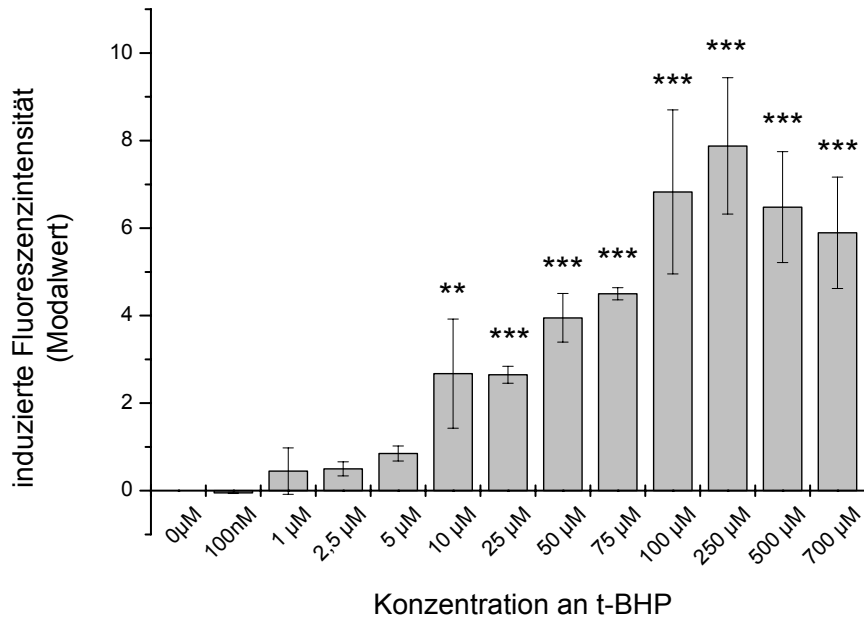


Abbildung 3.10: Induzierte Fluoreszenzintensität nach 1 h Behandlung von suspendierten MCF-7 Zellen mit t-BHP. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar. \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  (t-Test gegenüber Lösungsmittelkontrolle)

Nach Behandlung von MCF-7 Zellen mit 10 µM t-BHP kam es zu einer signifikanten Erhöhung der induzierten FI gegenüber der Kontrolle, die mit steigender t-BHP Konzentration weiter zunahm (Abbildung 3.10). So kam es zu einer Verachtfachung des Kontrollwertes der induzierten FI nach Inkubation der Zellen mit 250 µM t-BHP. Zur Detektion von ROS durch t-BHP unter oben beschriebenen Bedingungen ist die durchflußzytometrische Methode mit DHC AM geeignet. Yen et al. (2001) konnten mittels des Fluoreszenzfarbstoffes DCFH DA zeigen, dass t-BHP die Bildung von ROS in humanen Endothelzellen dosisabhängig stimuliert. 50 µM t-BHP und mehr verursachten einen signifikanten Anstieg intrazellulärer ROS (Yen et al., 2001). Nieminnen et al. (1996) konnten in isolierten Ratten-Hepatozyten neben der starken, durch t-BHP verursachten, Oxidation von mitochondrialem NADPH, mittels konfokaler Mikroskopie und DCFH DA eine starke Zunahme der Generierung von ROS zeigen. Bereits nach 10-minütiger Behandlung mit 100 µM t-BHP stieg die Fluoreszenz von Dichlorfluorescein um das 15-fache an (Nieminnen et al., 1996). Die

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen somit im Einklang mit denen anderer Arbeitsgruppen.

### 3.1.3.2 Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 1-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit tert.-Butylhydroperoxid

Zur Beurteilung der Membranintegrität der Zellen wurden MCF-7 Zellen für 1 h bei 37°C in Suspension mit t-BHP inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und unmittelbar vor der Messung PI hinzugefügt. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen mit Membranschäden durchfluß-zytometrisch bestimmt. Der Anteil an membrangeschädigten MCF-7 Zellen betrug in Lösungsmittel-behandelten Zellen  $4,07 \pm 1,9\%$  und  $5,5 \pm 2,7\%$  nach Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  t-BHP (Abbildung 3.11).

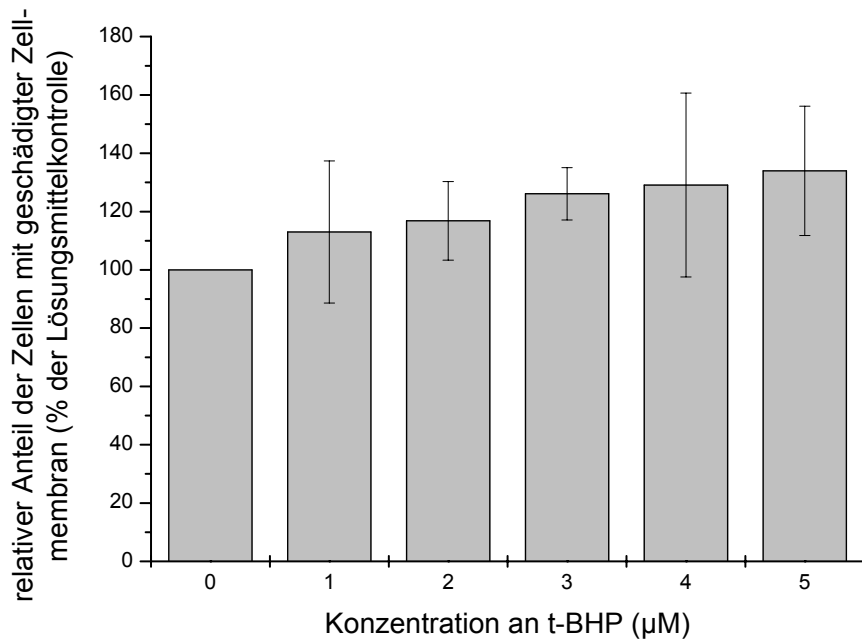


Abbildung 3.11: Prozentualer Anteil der Zellpopulation mit geschädigter Zellmembran nach 1 h Behandlung von MCF-7 Zellen mit t-BHP. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen.

Über den gesamten Konzentrationsbereich von 1-5  $\mu\text{M}$  t-BHP kam es zu einem leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg des Anteils der Zellen mit geschädigter Zellmembran. Es konnte somit durch die Behandlung mit t-BHP unter obigen Versuchsbedingungen keine Beeinträchtigung der Membranpermeabilität nachgewiesen werden.

MCF-7 Zellen wurden in Suspension bei 37°C für 1 h mit t-BHP inkubiert und anschließend zur Erfassung der ALS und ESS mittels AFE analysiert. Ein Teil der Zellen wurde zur Erfassung oxidativer DNA-Basenmodifikationen mit Fpg-Protein behandelt, der andere nur mit Enzympuffer ohne Fpg. Die Anzahl an ALS und ESS wiesen bereits ab 1 µM t-BHP (ESS) beziehungsweise 2 µM t-BHP (ALS) signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle auf. Die Anzahl der ALS nahm mit steigender t-BHP-Konzentration stetig zu, so dass es nach Behandlung mit 5 µM t-BHP zu  $7,6 \pm 2,4$  ALS/Mio bp kam (Abbildung 3.12).

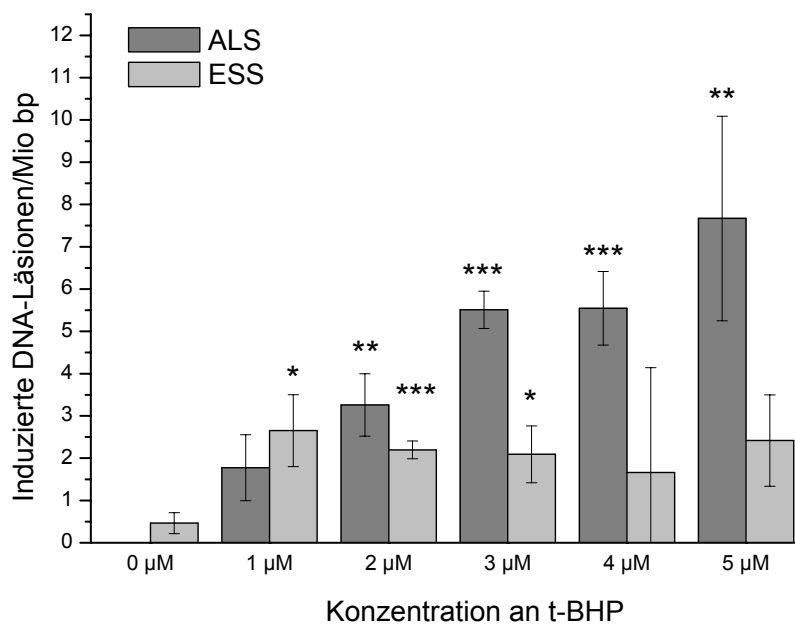


Abbildung 3.12: Induzierte DNA-Läsionen pro  $10^6$  Basenpaare nach 1-stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit t-BHP. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  (t-Test).

Die Anzahl an ESS erreichte bereits nach Behandlung mit 1 µM t-BHP mit  $2,65 \pm 0,21$  ESS/Mio bp den höchsten Wert (Kontrolle:  $0,46 \pm 0,24$  ESS/Mio bp), und gleichzeitig ein Plateau, welches auch mit zunehmender Konzentration nicht weiter erhöht wurde. Da im Zytotoxizitätstest (Kapitel 3.1.3.2) mit zunehmender Konzentration an t-BHP keine Zunahme des Anteils der Zellen mit geschädigter Zellmembran zu beobachten war, sind die DNA-Läsionen auf eine spezifische Wirkung von t-BHP zurückzuführen. Während mit t-BHP behandelte Zellen erst ab 10 µM t-BHP signifikant erhöhte Werte an ROS aufwiesen (Kapitel 3.1.3.1), zeigte die

Behandlung von MCF-7 Zellen mit 1 beziehungsweise 2  $\mu\text{M}$  t-BHP bereits signifikant erhöhte Werte an ESS beziehungsweise ALS (Abbildung 3.12).

Lapshina et al (2005) konnten in B14 (Chinesischen Hamster-) Zellen nach 1-stündiger Behandlung mit t-BHP mittels *Comet Assay* ebenfalls eine signifikante Zunahme an ALS feststellen. Mit 100  $\mu\text{M}$  t-BHP behandelte Zellen wiesen (mit einem *tail moment* von  $3,1 \pm 0,6$ ) etwa 8-fach höhere Werte auf als unbehandelte Zellen deren *tail moment*  $0,4 \pm 0,1$  betrug (Lapshina et al, 2005). In den von Lazeé et al. (2003) durchgeführten Versuchen konnten mittels *Comet Assay* sowohl in t-BHP-behandelten Ratten-Hepatomzellen (MH1C1) als auch in SMC-Zellen (smooth muscle cells) von Ratten signifikant erhöhte Werte an ALS und ESS detektiert werden. Nach Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  (500  $\mu\text{M}$ ) t-BHP kam es zum 6-fachen (14-fachen) Wert an ALS in MH1C1 (beziehungsweise SMC) Zellen. Eine Zunahme der Anzahl an ESS konnte nur nach Behandlung mit niedrigeren Dosen t-BHP gezeigt werden. So kam es in MH1C1 (beziehungsweise SMC) Zellen bereits nach Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  (100  $\mu\text{M}$ ) zu einer signifikanten Steigerung der ESS-Rate (Lazeé et al., 2003). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Altman et al. (1994), die mittels GC/MS t-BHP-behandelte SP2/0 (Maus Hybridom-) Zellen auf geschädigte DNA-Basen hin untersuchten. In einem Konzentrationsbereich von 1-100  $\mu\text{M}$  t-BHP kam es zu signifikant höheren Gehalten modifizierter DNA-Basen als in unbehandelten Kontrollzellen. Es wird davon ausgegangen, dass die Schädigung der DNA-Basen auf t-BHP-induzierten oxidativen Stress zurückzuführen ist, bei dem in direkter Nähe zur DNA Hydroxylradikale entstehen (Altman et al., 1994).

Diese Konzentrationsabhängigkeit bei der Entstehung t-BHP induzierter DNA-Läsionen scheint sich auch in der vorliegenden Arbeit abzuzeichnen. Während die Anzahl an ALS kontinuierlich mit steigender t-BHP-Konzentration zunimmt, erreicht die Induktion von ESS bereits bei Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  t-BHP ein Plateau.

### 3.1.3.3 Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 24-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit tert.-Butylhydroperoxid

Die Behandlung mit E2 und den Phytoestrogenen sollte auch längere Behandlungszeiträume mit einschließen. Daher wurde die Eignung des Systems AFE zur Detektion von ALS und ESS nach 24-stündiger Behandlung von MCF-7 Zellen mit t-BHP als Positivkontrolle überprüft.

Zur Kontrolle der Membranintegrität wurden MCF-7 Zellen für 24 h bei 37°C mit t-BHP inkubiert. Nach dem Abtrypsinieren wurde die Suspension unmittelbar vor der Messung mit PI versetzt. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen mit Membranschäden durchflußzytometrisch bestimmt. Der Anteil an membran-geschädigten MCF-7 Zellen verdoppelte sich signifikant nach Behandlung mit 5 µM t-BHP von  $2,5 \pm 1,1\%$  in Lösungsmittel-behandelten Zellen auf  $5,3 \pm 0,6\%$  (Abbildung 3.13).

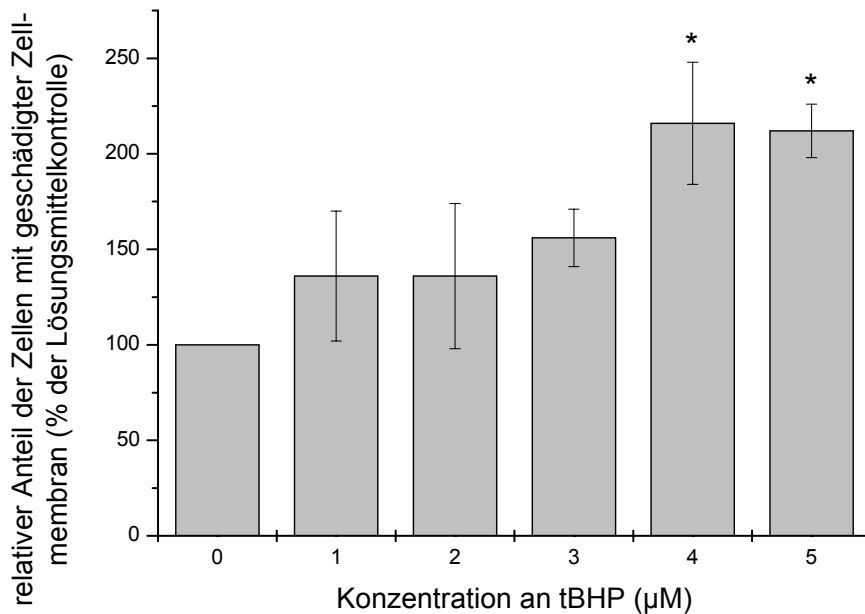


Abbildung 3.13: Prozentualer Anteil der Zellpopulation mit geschädigter Zellmembran nach 24 h Behandlung von MCF-7 Zellen mit t-BHP. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen. \*:  $p < 0,05$  (t-Test).

Dieser signifikante, konzentrationsabhängige Anstieg des Anteils der Zellpopulation mit geschädigter Zellmembran spricht für beginnende zytotoxische Effekte von 4 µM t-BHP und mehr bei 24-stündiger Behandlung.

MCF-7 Zellen wurden bei 37°C für 24 h mit t-BHP inkubiert und anschließend zur Erfassung der ALS und ESS mittels AFE analysiert. Durch Behandlung mit 5 µM t-BHP kam es zu einer schwachen, nicht signifikanten Erhöhung der induzierten ALS um  $0,17 \pm 0,05$  ALS/ $10^6$  bp und der ESS von  $0,5 \pm 0,18$  ESS/ $10^6$  bp in unbehandelten Zellen auf  $0,8 \pm 0,5$  ESS/ $10^6$  bp (Abbildung 3.14).

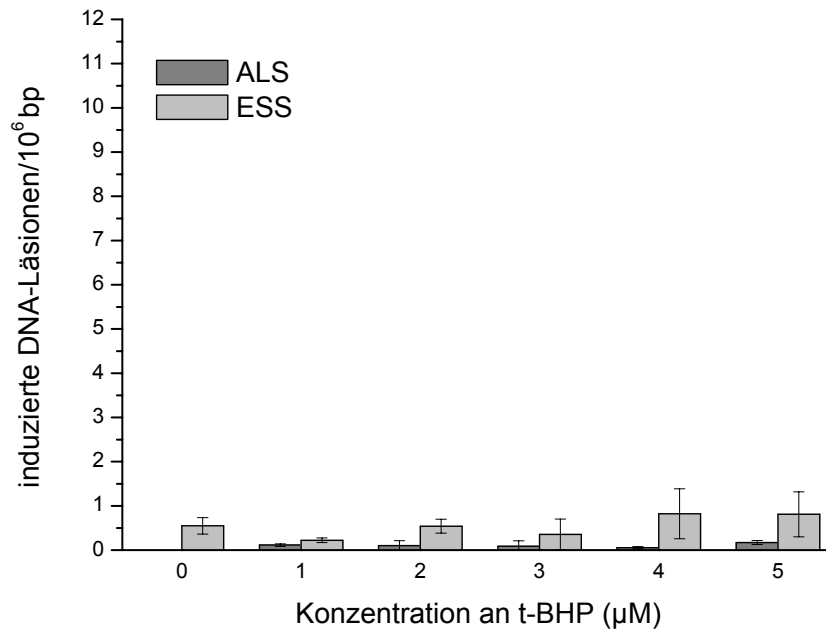


Abbildung 3.14: Induzierte DNA-Läsionen pro 10<sup>6</sup> Basenpaare nach 24-stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit t-BHP. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen.

Nach 24-stündiger Behandlung mit 5 μM t-BHP wurde nur noch etwa 1/8 der ALS/10<sup>6</sup> bp, die bei 1-stündiger Substanzexposition gemessen wurden beobachtet. Die Anzahl der ESS nahm ebenfalls leicht um 0,3 ESS/10<sup>6</sup> Basenpaare von 0,5 ± 0,18 auf 0,8 ± 0,5 ESS/10<sup>6</sup> Basenpaare zu. Möglicherweise sind die t-BHP-induzierten DNA-Schäden (die bei 1-stündiger Behandlung beobachtet wurden) innerhalb der 24-stündigen Inkubation repariert worden. Da die Halbwertszeit von Peroxylradikalen nur wenige Sekunden beträgt (Sies, 1996), kann nicht davon ausgegangen werden, dass t-BHP nach mehrstündiger Inkubationsdauer noch auf die Zellen einwirken kann.

### 3.1.4 Untersuchung des genotoxischen Potentials von Menadion

#### 3.1.4.1 Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit Menadion

Da in den geplanten Versuchen auch der E2-Metabolit 4-HO-E2 untersucht werden sollte, dessen Toxizität auf dem ROS-generierenden Prozess des *Redoxcyclings*

beruhen soll, wurde aufgrund struktureller Ähnlichkeiten Menadion als Positivkontrolle gewählt, welches ebenfalls in *Redoxcycling* eintreten kann.

Während 4-HO-E2 als Catechol ins *Redoxcycling* eintritt und über die Stufe des Semichinons unter Generierung von Superoxidanionradikalen weiter zum Chinon oxidiert wird, kann Menadion als Chinon in den ROS-generierenden Prozess eintreten, wenn es von der NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase weiter zum Hydrochinon reduziert wird. Das Hydrochinon kann unter Generierung von Superoxidanionradikalen weiter zum Semichinon reagieren, welches (unter Reduktion molekularen Sauerstoffs zu Superoxidanionradikalen) wieder zu Menadion oxidiert werden kann (Bolton et al., 1998).

In Form der Chinone können sowohl Menadion als auch das aus 4-HO-E2 entstandene E2-3,4-chinon direkt an verschiedenen Positionen von Guanin und Adenin reagieren und somit die DNA schädigen (Cavalieri, 1997). Trotz unterschiedlicher Eintrittsformen beider Substanzen ins *Redoxcycling* scheint Menadion eine geeignete Positivkontrolle für den Mechanismus inteazellulärer ROS-Bildung und der Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 4-HO-E2 darzustellen, da es seine Eigenschaft als Redoxcykler mit 4-HO-E2 teilt.

Um den Einfluss von Menadion auf die Esteraseaktivität der Zellen zu überprüfen, wurden MCF-7 Zellen für 1 h bei 37°C in Suspension mit Menadion inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und der intrazelluläre Calcein-Gehalt durchflußzytometrisch bestimmt.

Ab einer Konzentration von 7,5 µM Menadion und mehr kam es zu einer signifikanten Abnahme der durch Calcein grün fluoreszierenden Zellpopulation (Abbildung 3.15).



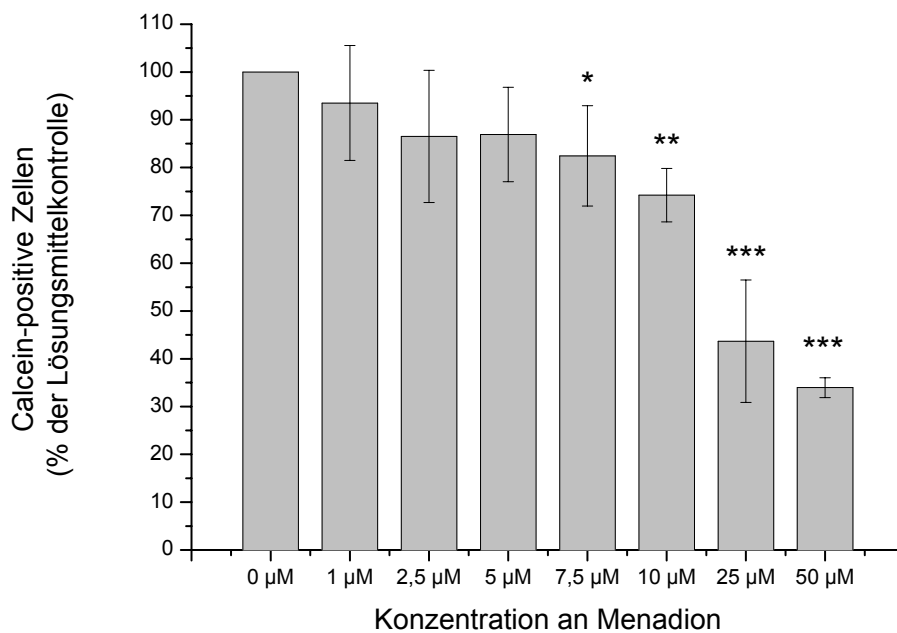


Abbildung 3.15: Prozentualer Anteil Calcein-positiver Zellen nach 1-stündiger Behandlung suspendierter MCF-7 Zellen mit Menadion. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  (t-Test)

Die Anzahl Calcein-positiver Zellen nahm im gesamten Konzentrationsbereich von 1  $\mu\text{M}$  bis 50  $\mu\text{M}$  Menadion mit steigender Konzentration ab. Bereits eine Behandlung der Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  Menadion hatte einen sichtbaren, nicht signifikanten Rückgang des Anteils Calcein-positiver Zellen um  $7 \pm 12\%$  zur Folge. Aufgrund der relativ großen Schwankung kann dieser Effekt nicht eindeutig der zytotoxischen Wirkung von Menadion auf intrazelluläre Esterasen zugeordnet werden. Somit beeinflusst Menadion ab etwa 2,5  $\mu\text{M}$  und mehr die Aktivität intrazellulärer Esterasen.

Zur Bestimmung von durch Menadion induzierten ROS wurden suspendierte MCF-7 Zellen bei 37°C für 1 h gleichzeitig mit DHC AM und Menadion inkubiert. Durch 1-stündige Behandlung mit Menadion kam es zu einer konzentrationsabhängigen Absenkung der induzierten FI (Abbildung 3.16).

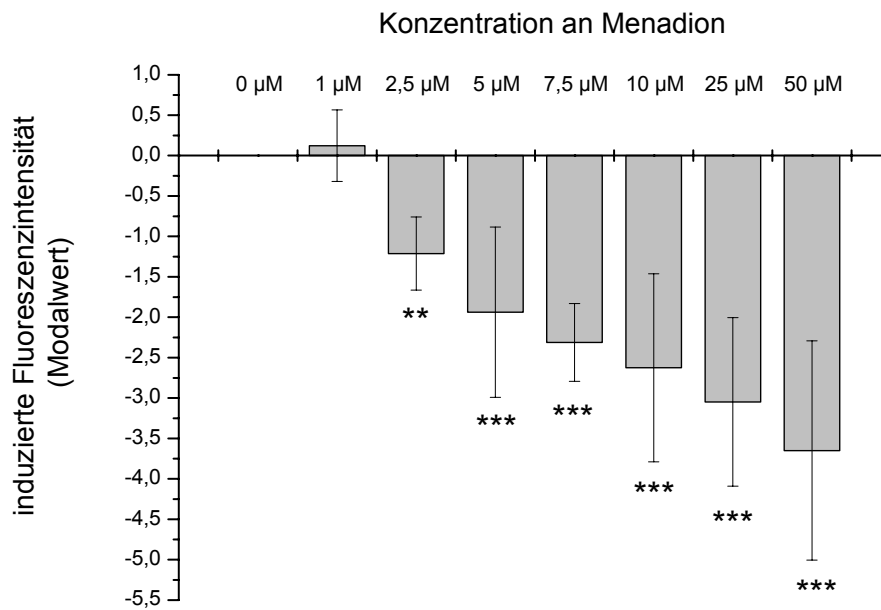


Abbildung 3.16: Induzierte Fluoreszenzintensität nach 1 h Behandlung von suspendierten MCF-7 Zellen mit Menadion. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar. \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  (t-Test)

Bereits nach Behandlung mit 2,5 µM Menadion sank die induzierte FI gegenüber der Lösungsmittelkontrolle um 1,2 Fluoreszenzeinheiten ab. Isoliert betrachtet spräche dieses Ergebnis für eine antioxidative Wirkung von Menadion. Unter Berücksichtigung der Daten zur Esteraseaktivität (Abbildung 3.15) ist dieser Effekt jedoch unter den beschriebenen Bedingungen auf die durch Menadion verringerte Esteraseaktivität zurückzuführen. Da in den Zellen nur DHC-Moleküle mit abgespaltenen Estergruppen durch ROS zu fluoreszierendem Calcein oxidiert werden können, kommt es aufgrund der durch Menadion reduzierten Esteraseaktivität zu einer verringerten intrazellulären Konzentration an Calcein und somit zu einer Verringerung der induzierten FI. Unter den verwendeten Bedingungen konnten mit DHC AM keine durch Menadion induzierten ROS detektiert werden.

#### 3.1.4.2 Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 1-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit Menadion

Zur Beurteilung der Membranintegrität wurden suspendierte MCF-7 Zellen für 1 h bei 37°C mit Menadion inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und unmittelbar vor der Messung PI hinzugefügt. Anschließend

wurde die Anzahl der Zellen mit Membranschäden durchflußzytometrisch bestimmt. Der Anteil membrangeschädigter MCF-7 Zellen blieb bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Menadion mit etwa  $2 \pm 0,6\%$  konstant auf dem Niveau Lösungsmittel-behandelter Zellen (Abbildung 3.17).

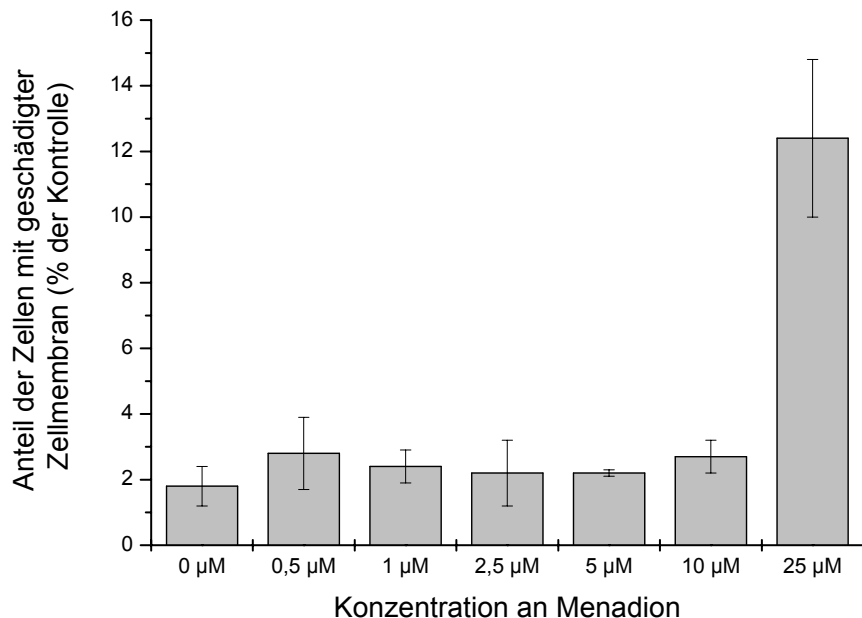


Abbildung 3.17: Prozentualer Anteil der Zellpopulation mit geschädigter Zellmembran nach 1-stündiger Behandlung von MCF-7 Zellen mit Menadion. Dargestellt sind die Mittelwerte und Range/2 aus zwei Messungen eines Versuches.

Nach 1-stündiger Behandlung mit 25  $\mu\text{M}$  Menadion kam es etwa zu einer Versechsfachung des Anteils der Zellen mit defekter Zellmembran. Menadion schädigt somit ab einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  die Zellmembranen von MCF-7 Zellen. Dieses Ergebnis sollte auch zur Beurteilung des ROS-generierenden Potentials von Menadion mit in Betracht gezogen werden. Bereits ab einer Behandlung mit 2,5  $\mu\text{M}$  Menadion kam es zu einer Reduktion der induzierten FI (Kapitel 3.1.4.1). Da die Zellmembranen der Zellen, die mit bis zu 10  $\mu\text{M}$  Menadion behandelt wurden noch intakt sind, kann kein durch intrazelluläre ROS oxidiertes, fluoreszierendes Calcein aus den Zellen ausgetreten sein und somit für eine Verringerung der induzierten FI verantwortlich gemacht werden. Die Reduktion der induzierten FI ist somit allein auf die verringerte Esteraseaktivität zurückzuführen.

Suspendierte MCF-7 Zellen wurden für 1 h bei 37°C mit Menadion inkubiert und anschließend zur Erfassung der ALS und ESS mittels AFE analysiert. Die Induktion

an ALS betrug nach Behandlung der Zellen mit 5  $\mu\text{M}$  Menadion etwa 18 ALS/Mio bp (Abbildung 3.18).

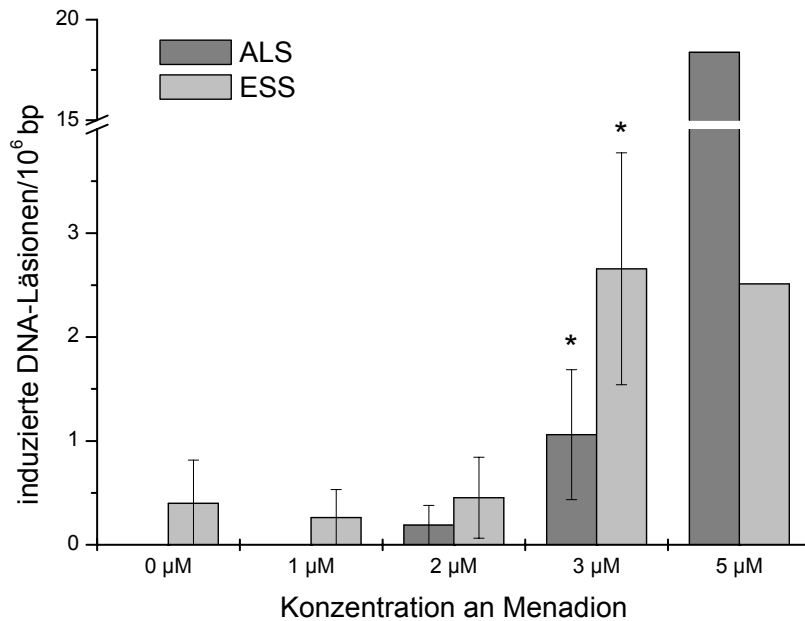


Abbildung 3.18: Induzierte DNA-Läsionen pro  $10^6$  Basenpaare nach 1-stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit Menadion. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichung aus bis zu 3 unabhängigen Versuchen.

Bereits nach Behandlung mit 3  $\mu\text{M}$  Menadion kam es zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl detektierter ALS auf  $1,0 \pm 0,6$  ALS/Mio bp. Die Behandlung von MCF-7 Zellen mit 3  $\mu\text{M}$  Menadion hatte ebenfalls eine signifikante Steigerung der Anzahl an ESS von  $0,39 \pm 0,42$  auf  $2,6 \pm 1,1$  ESS/Mio bp zur Folge (Abbildung 3.18). Die Anzahl an ESS konnte aufgrund der extremen Steigerungen der ALS im Elutionsprofil auch durch höhere Konzentrationen an Menadion nicht weiter gesteigert werden und erreichte somit durch die Behandlung mit 3  $\mu\text{M}$  Menadion ihr Maximum und blieb auch nach Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  Menadion auf dem gleichen Niveau. Menadion induziert somit unter den verwendeten Bedingungen konzentrationsabhängig ALS und ESS (bis 3  $\mu\text{M}$ ).

Burdette et al. (2002) untersuchten mittels *Comet Assay* das DNA-schädigende Potential von Menadion in S30 Zellen. Hierbei handelt es sich um eine stabile, transfizierte Zelllinie der menschlichen Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB-231, die den Estrogen-Rezeptor alpha ( $\text{ER}\alpha$ ) enthält. Die 30-minütige Behandlung mit 1-10  $\mu\text{M}$  Menadion führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme von ALS mit dem Maximum bei 10  $\mu\text{M}$ . Durch die Behandlung mit Fpg wurden auch ESS bestimmt. Es

konnte eine dosisabhängige Zunahme oxidativer DNA-Schäden durch Behandlung von S30 Zellen mit Menadion (1-3  $\mu\text{M}$ ) gezeigt werden. Ab Konzentrationen von 3  $\mu\text{M}$  Menadion und mehr konnte keine weitere Steigerung der Anzahl an ESS gezeigt werden, da der größte detektierbare Unterschied zwischen Menadion-behandelten Zellen mit Fpg-Behandlung und ohne Fpg-Behandlung bereits bei einer Behandlung mit 3  $\mu\text{M}$  Menadion erzielt wurde. Die Induktion von Einzelstrangbrüchen dominierte so stark, dass die Detektion zusätzlicher Strangbrüche, die auf enzymatisches Ausschneiden oxidierter DNA-Basen zurückzuführen waren, maskiert wurde (Burdette et al., 2002). Diese Beobachtung korreliert sehr gut mit den in Abbildung 3.18 dargestellten Ergebnissen, da auch in der vorliegenden Arbeit die nach Behandlung mit 3  $\mu\text{M}$  Menadion detektierten ESS ein Plateau erreichten, welches aufgrund der starken Überlagerung durch ALS auch durch höhere Menadion-Konzentrationen nicht weiter gesteigert werden konnte.

Ollikainen et al. (1997) konnten mittels *Comet Assay* in mit Menadion behandelten MeT-5A (menschliche Pleural Mesothel-) Zellen und BEAS 2B (menschliche Bronchial Epithel-) Zellen ebenfalls das klastogene Potential von Menadion zeigen. In beiden Zelllinien kam es durch 30-minütige Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Menadion gegenüber unbehandelter Kontrollzellen zu einer signifikanten Zunahme des *tail moments* (Ollikainen et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wirkten Menadion-Konzentrationen von 25  $\mu\text{M}$  und mehr schädigend auf MCF-7 Zellen indem es sowohl zu einer starken Hemmung intrazellulärer Esterasen (Abbildung 3.15) als auch zur Schädigung der Zellmembranen (Abbildung 3.17) kam. Somit besteht die Möglichkeit, dass die Zunahme des *tail moments* nach Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  Menadion in den von Ollikainen et al. (1997) durchgeführten Versuchen auch auf die zytotoxische Wirkung von Menadion zurückzuführen sein könnte.

Ngo et al. (1991) konnten durch 1-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit 5, 10, 15, 20 und 25  $\mu\text{M}$  Menadion mittels AFE eine konzentrationsabhängige Zunahme von DNA-Einzelstrangbrüchen und mittels Neutraler Elution eine Steigerung der Anzahl von Doppelstrangbrüchen zeigen. Untersuchungen mittels Elektronen Spin Resonanzspektroskopie (ESR) ergaben, dass die DNA-Schäden auf Hydroxylradikale zurückzuführen waren (Ngo et al., 1991). Die im *Redoxcycling* generierten Superoxidanionradikale können zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) disproportionieren. Letzteres kann in der Fenton-Reaktion Hydroxylradikale bilden (Kapitel 1.3.1).

### 3.2 Untersuchung des genotoxischen Potentials von 17 $\beta$ -Estradiol

Nachdem die Positivkontrollen sichtbares Licht, KO<sub>2</sub> und t-BHP nach Kurzzeitinkubation in suspendierten MCF-7 Zellen ROS (Licht, t-BHP), ALS (Licht, KO<sub>2</sub>, t-BHP) und ESS (Licht, KO<sub>2</sub>) induzierten, sollte im Folgenden der Einfluss von 17 $\beta$ -Estradiol (E2) auf die Induktion von ROS, ALS und ESS unter gleichen Inkubationsbedingungen untersucht werden.

Die bei der Metabolisierung von E2 entstehenden Catecholestrogene können nach Oxidation durch Peroxidasen und Cytochrom P450 in Form ihrer *o*-Chinone mit dem Semichinonradikal in *Redoxcycling* eintreten und somit eine Induktion von ROS bewirken (Liehr et al., 1995). In mit E2 behandelten Syrischen Hamstern werden dementsprechend depurinierende DNA-Addukte als Folge der im E2-Metabolismus gebildeter E2-3,4-chinone (Cavalieri et al., 1997; Devanesan et al., 2001), Lipidperoxidation (Wang und Liehr, 1994) und die Bildung von 8-Hydroxy-2'-desoxyguanosin (8-OxodG), welches als Biomarker für oxidative DNA-Schäden gilt (Han und Liehr, 1994; Liu et al., 2002), beobachtet.

#### 3.2.1 Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit 17 $\beta$ -Estradiol

Zur Überprüfung des Einflusses von E2 auf die Esteraseaktivität, wurden MCF-7 Zellen für 1 h bei 37°C in Suspension mit E2 inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und der intrazelluläre Calcein-Gehalt durchflußzytometrisch bestimmt.

Die Anzahl Calcein-positiver Zellen mit grüner Fluoreszenz blieb über den gesamten Konzentrationsbereich von 1 nM bis 100  $\mu$ M E2 konstant (Abbildung 3.19).

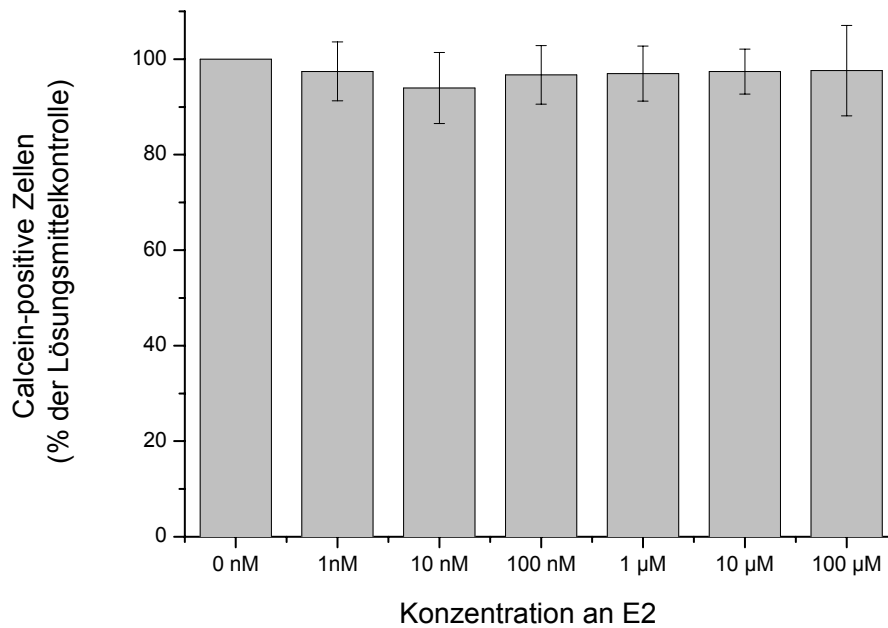


Abbildung 3.19: Prozentualer Anteil Calcein-positiver Zellen nach 1 h Behandlung suspendierter MCF-7 Zellen mit E2. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar.

E2 verursachte somit unter den verwendeten Versuchsbedingungen keine Reduktion der Esteraseaktivität und konnte in den vorgesehenen Konzentrationen zur Bestimmung der ROS eingesetzt werden.

Suspendierte MCF-7 Zellen wurden für 1 h gleichzeitig mit DHC AM und E2 bei 37°C inkubiert. Bereits nach der Behandlung mit 100 pM E2 kam es zu einer Absenkung der induzierten FI der Zellpopulation gegenüber der Kontrolle, die ab 10 µM signifikant war (Abbildung 3.20).

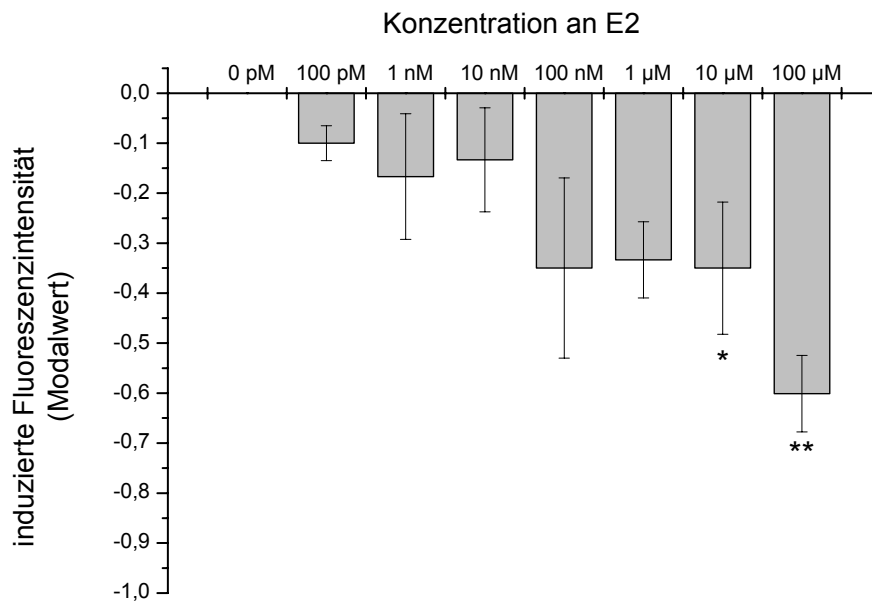


Abbildung 3.20: Induzierte Fluoreszenzintensität nach 1 h Behandlung von suspendierten MCF-7 Zellen mit E2. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , (t-Test gegenüber Lösungsmittelkontrolle)

Mit zunehmender E2-Konzentration nahm die induzierte FI weiter ab. Durch Behandlung mit 100 µM E2 wurde die induzierte FI im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle um 0,6 Fluoreszenzeinheiten abgesenkt. Somit induziert E2 keine ROS sondern scheint in den eingesetzten Konzentrationen eine antioxidative Wirkung zu haben. Dieser Effekt konnte auch von Niki und Nakano (1990) gezeigt werden, da E2 die Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren unter UV-Bestrahlung unterdrückte und die Oxidation von Phospholipiden in Rattenlebermikrosomen hemmte (Niki und Nakano, 1990).

Mittels spektrophotometrischer Erfassung konjugierter Diene aus ungesättigten Fettsäuren untersuchten Ayres et al. (1998) den Einfluss von E2 auf die Lipidperoxidation von LDL. Die Behandlung mit 54 µM E2 vermochte die Lipidperoxidation im Vergleich zur Kontrolle um 70,5% zu inhibieren (Ayres et al., 1998). Des Weiteren wurde der Einfluss von E2 auf die Menadion-induzierte Generierung von  $H_2O_2$  in Rinderherzen-Epithelzellen (BHMEC) untersucht. Eine 2-stündige Behandlung von BHMEC-Zellen mit 10 beziehungsweise 100 µM E2 konnte die Menadion-induzierte Bildung von  $H_2O_2$  inhibieren (Ayres et al., 1998).

Die beobachtete antioxidative Wirkung von E2 (Abbildung 3.20) steht somit im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen.



### 3.2.2 Einfluss von 17 $\beta$ -Estradiol auf t-BHP-induzierte ROS in MCF-7 Zellen

MCF-7 Zellen wurden in Suspension für 1 h bei 37°C gleichzeitig mit DHC AM, 50  $\mu$ M t-BHP und E2 inkubiert und im Anschluss durchflußzytometrisch gemessen. In Versuchen zur Bestimmung des ROS-generierenden Potentials von t-BHP kam es nach Behandlung mit 50  $\mu$ M t-BHP gegenüber der Zellpopulation der Lösungsmittelkontrolle zu einer signifikanten Erhöhung der induzierten FI (Kapitel 3.1.3.1). Die für die Co-Inkubationen verwendete Konzentration von 50  $\mu$ M t-BHP wurde aufgrund dieses Ergebnisses gewählt. Bereits die Behandlung mit 1 nM E2 vermochte die t-BHP-induzierte FI um 2 Fluoreszenzeinheiten ( $48,1 \pm 26,6\%$ ) zu senken. (Abbildung 3.21).

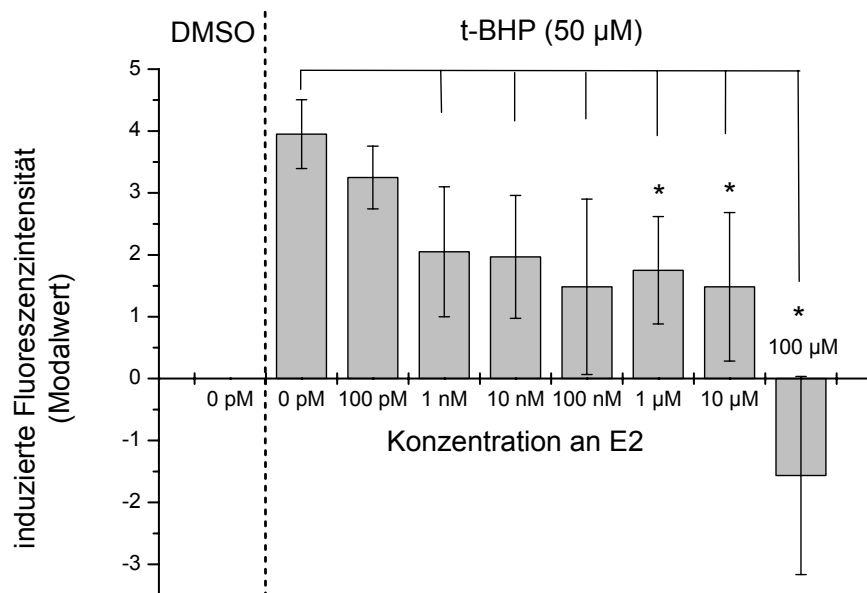


Abbildung 3.21: Induzierte Fluoreszenzintensität nach gleichzeitiger, 1-stündiger Behandlung von suspendierten MCF-7 Zellen mit E2 und 50  $\mu$ M t-BHP. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar. \*:  $p < 0,05$  (t-Test)

Die maximale Absenkung der FI um etwa 5,5 Fluoreszenzeinheiten ( $140 \pm 40\%$ ) wurde nach Behandlung mit 100  $\mu$ M E2 beobachtet. 100  $\mu$ M E2 schützten die Zellen vollständig vor einer mit 50  $\mu$ M t-BHP induzierten ROS-Generierung. E2 zeigt in Co-Inkubationsversuchen mit t-BHP antioxidative Wirkung. Durch gleichzeitige Behandlung mit E2 wurde die t-BHP-induzierte FI konzentrations-abhängig gesenkt. Yen et al. (2001) konnten mittels des Fluoreszenzfarbstoffes DCFH DA in humanen Endothelzellen zeigen, dass sowohl eine 18-stündige Vorbehandlung mit 54  $\mu$ M E2

als auch eine direkte 30-minütige Coinkubation von E2 und 100  $\mu\text{M}$  t-BHP die durch t-BHP induzierte ROS-Bildung in humanen Endothelzellen signifikant unterdrückte (Yen et al., 2001). Dieser Befund steht im Einklang mit den in Abbildung 3.21 dargestellten Ergebnissen.

### 3.2.3 Untersuchung der Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 1-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit $17\beta$ -Estradiol

Zur Beurteilung der Membranintegrität der Zellen wurden MCF-7 Zellen für 1 h bei 37°C in Suspension mit E2 inkubiert. Nach Inkubationsende wurde die Suspension mit PI versetzt. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen mit Membranschäden durchflußzytometrisch bestimmt. Der Anteil an membrangeschädigten MCF-7 Zellen betrug in Lösungsmittel-behandelten Zellen  $3,2 \pm 0,29\%$  und  $2,9 \pm 0,33\%$  nach Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  E2 (Abbildung 3.22).

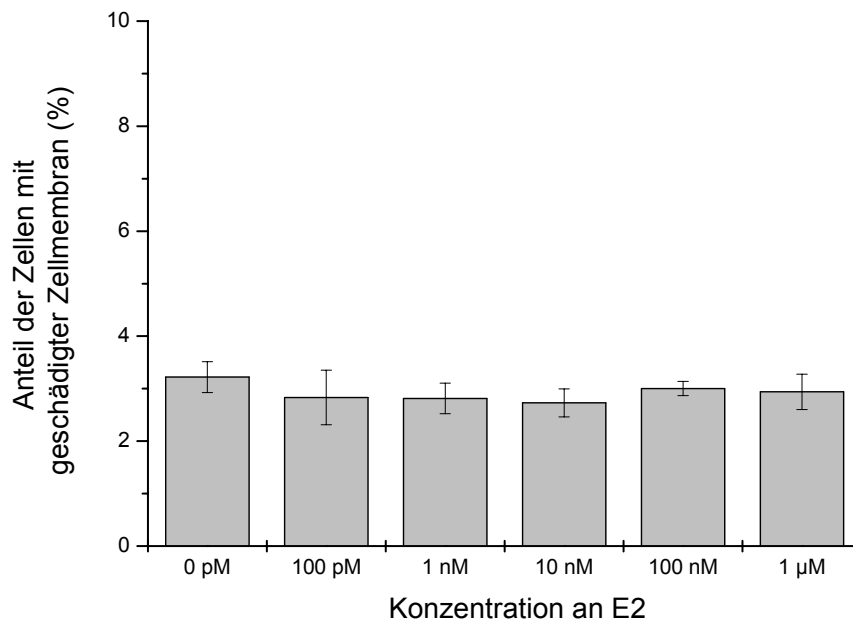


Abbildung 3.22: Prozentualer Anteil der Zellpopulation mit geschädigter Zellmembran nach 1 h Behandlung von MCF-7 Zellen mit E2. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken stellen die Range/2 dar.

Über den gesamten verwendeten Konzentrationsbereich blieb der Anteil der Zellpopulation mit defekter Zellmembran konstant. Somit war E2 unter den verwendeten Bedingungen nicht membranschädigend.

Suspendierte MCF-7 Zellen wurden bei 37°C für 1 h mit E2 inkubiert und anschließend zur Erfassung der ALS und ESS mittels AFE analysiert. Die Anzahl induzierter DNA-Läsionen wies im eingesetzten Konzentrationsbereich keinen Unterschied zu der unbehandelten Zellen auf (Abbildung 3.23).

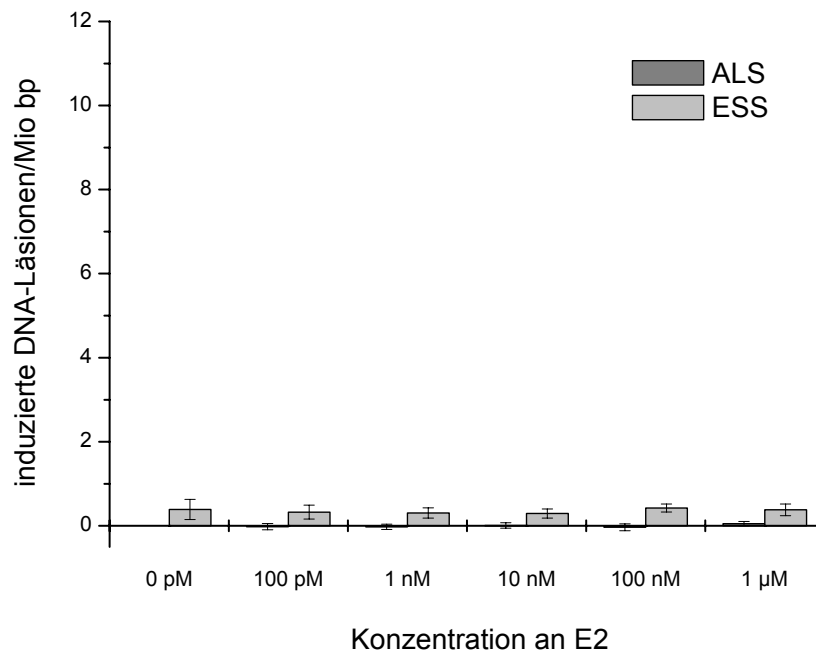


Abbildung 3.23: Induzierte Strangbrüche/ $10^6$  Basenpaare (bp) nach 1-stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit E2. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Durch 1-stündige Inkubation von MCF-7 Zellen mit E2 in den eingesetzten Konzentrationen konnte mittels AFE keine Veränderung in der Anzahl an ALS und ESS festgestellt werden. Die Anzahl der ESS lag im gesamten Konzentrationsbereich von 100 pM bis 1 µM E2 im Bereich der Lösungsmittelkontrolle ( $0,39 \pm 0,24$  ESS/Mio bp). Die ESS-Rate unbehaltener Säugerzellen liegt im Bereich von etwa 0,25-0,4 ESS/Mio bp (Will et. al, 1998).

Lavignie et al. (2001) konnten nach 9-stündiger Behandlung von MCF-7 Zellen mit 10 µM E2 mittels HPLC gegenüber Zellen der Lösungsmittelkontrolle keine Zunahme an 8-Oxoguanin feststellen (Lavignie et al., 2001).

In MCF-7 Zellen, deren Glutathionspiegel durch Vorinkubation mit Buthioninsulfoximin erniedrigt wurde, konnten Mobley und Brueggemeier (2002) mittels HPLC signifikant erhöhte Level an 8-oxodG nach 18-stündiger Behandlung mit 0,1 und 1 µM E2 zeigen (Mobley und Brueggemeier, 2002).

In superspiralierter DNA des Plasmids OX-174 RFI senkte eine 30-minütige Behandlung mit 36  $\mu\text{M}$  E2 die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Schädigung der DNA auf 54% des Kontrollwertes (Ayres et al., 1998). Diese Befunde anderer Arbeitsgruppen unterstützen das Ergebnis, dass E2 unter den verwendeten Bedingungen weder ALS noch ESS induzierte.

Der Einfluss von E2 auf die Mikrokerninduktion wurde von Stopper et al. (2003) in Estrogenrezeptor-positiven (BG-1) und -negativen (UCI) menschlichen Ovarienkrebs-Zelllinien untersucht. Dabei kam es nach 140-stündiger Behandlung von BG-1 Zellen mit bereits 10 pM E2 zu einer signifikanten Erhöhung der Mikrokernrate. Im Gegensatz dazu wurde durch die E2-Behandlung in UCI-Zellen weder eine Proliferationssteigerung noch eine Steigerung der Mikrokernrate beobachtet. Die gesteigerte genomische Instabilität in BG-1 Zellen wurde mit der gesteigerten Proliferationsrate aufgrund hormoneller Stimulierung begründet (Stopper et al., 2003).

Ähnliche Effekte konnten in Estrogenrezeptor-positiven (MCF-7) und -negativen (MDA) menschlichen Brustkrebs-Zelllinien gezeigt werden (Fischer et al., 2001). Nach 140-stündiger Behandlung von MCF-7 Zellen mit 1 nM E2 kam es zu einer Verdopplung der Mikrokernrate gegenüber der Kontrolle. Die gleiche Behandlung führte dagegen in MDA-Zellen zu keiner Veränderung der Mikrokernrate gegenüber Zellen der Lösungsmittelkontrolle. Auch hier schien die gesteigerte Mikrokernrate nach Langzeitversuchen in MCF-7 Zellen in der hormonell gesteigerten Proliferation der Zellen begründet zu sein (Fischer et al., 2001).

### **3.3 Untersuchung des genotoxischen Potentials von Genistein**

#### **3.3.1 Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit Genistein**

Zur Überprüfung der Esteraseaktivität wurden MCF-7 Zellen in Suspension für 1 h bei 37°C mit Genistein (GEN) inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und der intrazelluläre Calcein-Gehalt durchflußzytometrisch bestimmt.

Über den gesamten Konzentrationsbereich von 1 nM - 100  $\mu$ M GEN blieb die Anzahl Calcein-positiver Zellen mit grüner Fluoreszenz konstant (Abbildung 3.24).

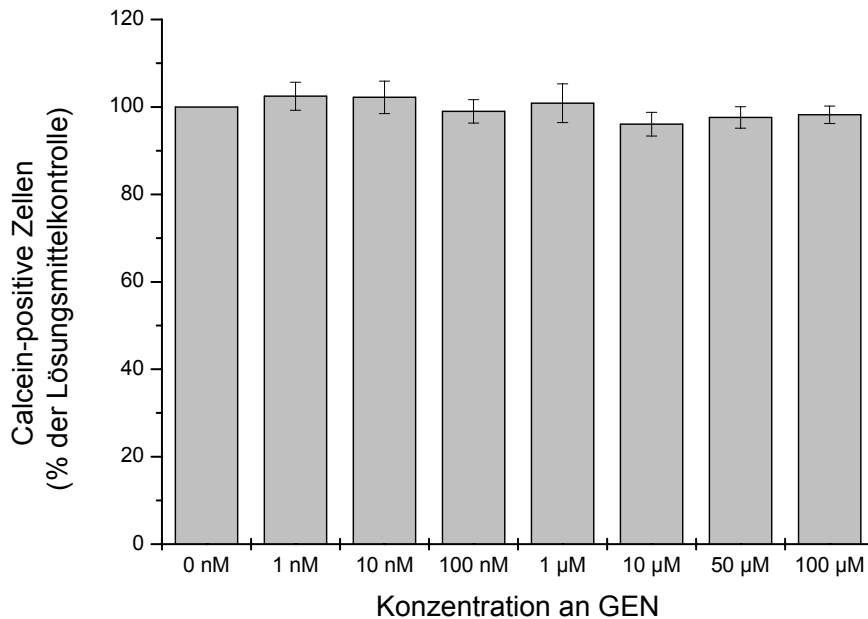


Abbildung 3.24: Prozentualer Anteil Calcein-positiver Zellen nach 1 h Behandlung suspendierter MCF-7 Zellen mit GEN. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 4 unabhängigen Versuchen dar.

GEN wirkte bezüglich der Esteraseaktivität in obigem Konzentrationsbereich nicht zytotoxisch. Eine Messung des ROS-generierenden Potentials im gesamten Konzentrationsbereich bis 100  $\mu$ M GEN konnte somit durchgeführt werden.

Suspendierte MCF-7 Zellen wurden für 1 h bei 37°C gleichzeitig mit DHC AM und GEN inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch gemessen. Die Behandlung mit 50  $\mu$ M GEN hatte eine Erniedrigung der induzierten FI von 0,92 Fluoreszenzeinheiten gegenüber der Kontrolle zur Folge (Abbildung 3.25). Dieser Wert entspricht einer Abnahme der relativen FI von  $15,4 \pm 1,9\%$ .

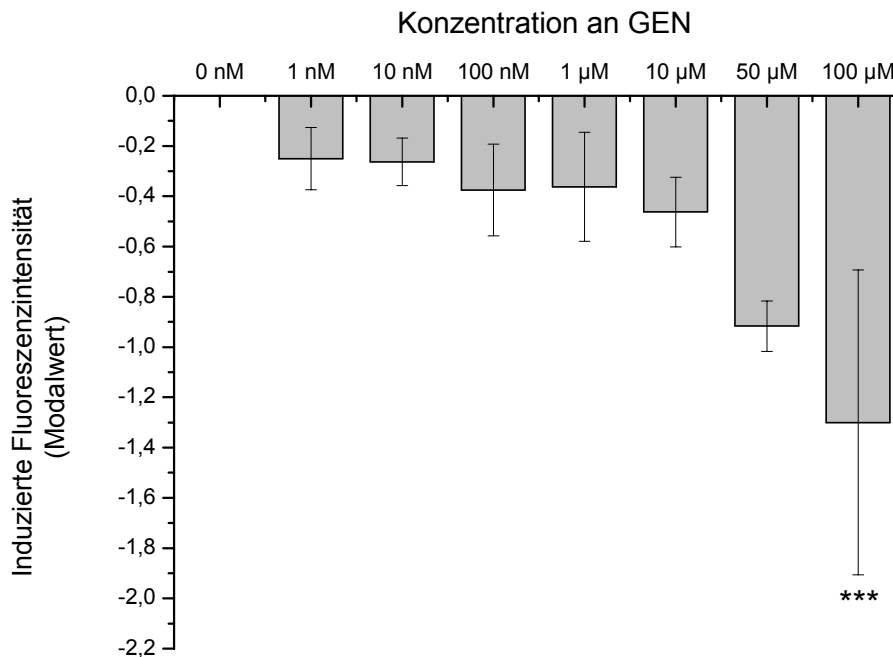


Abbildung 3.25: Induzierte Fluoreszenzintensität nach 1 h Behandlung von suspendierten MCF-7 Zellen mit GEN. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 4 unabhängigen Versuchen dar. \*\*\*:  $p < 0,001$  (t-Test gegenüber Lösungsmittelkontrolle)

100  $\mu\text{M}$  GEN senkten die induzierte FI unbehandelter Kontrollzellen signifikant um 1,3 Fluoreszenzeinheiten ab (Abnahme der relativen FI um  $28 \pm 10,8\%$ ). Nach 1-stündiger Behandlung der Zellen mit GEN kam es somit zu einer konzentrationsabhängigen Absenkung der induzierten FI. Unter den verwendeten Inkubationsbedingungen deutet die Senkung der FI auf einen antioxidativen Effekt von GEN hin.

### 3.3.2 Einfluss von Genistein auf t-BHP-induzierte ROS in MCF-7 Zellen

Suspendierte MCF-7 Zellen wurden bei  $37^\circ\text{C}$  für 1 h gleichzeitig mit DHC AM, 50  $\mu\text{M}$  t-BHP und GEN inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch gemessen. Nach Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  t-BHP kam es, wie in Kapitel 3.1.3.1 beschrieben, gegenüber der Zellpopulation der Lösungsmittelkontrolle zu einer signifikanten Erhöhung der induzierten FI. Durch 1-stündige Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  GEN wurde die t-BHP-induzierte FI signifikant von 3,95 auf 2,8 Fluoreszenzeinheiten (um  $28,5 \pm 6,5\%$ ) gesenkt (Abbildung 3.26).

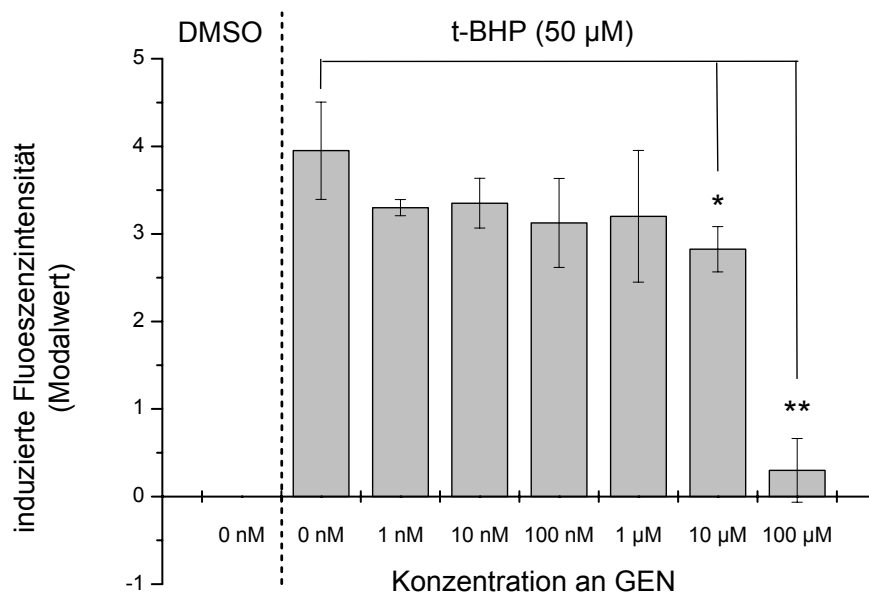


Abbildung 3.26: Induzierte Fluoreszenzintensität nach gleichzeitiger, 1-stündiger Behandlung von suspendierten MCF-7 Zellen mit GEN und 50 µM t-BHP. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  (t-Test)

Nach Behandlung mit 100 µM GEN kam es zu einer maximalen Absenkung der FI um 3,6 Fluoreszenzeinheiten (92,5 ± 9,2%). 100 µM GEN konnten die Zellen vor einer mit 50 µM t-BHP induzierten ROS-Generierung schützen. Somit zeigt GEN in Co-Inkubationsversuchen mit t-BHP eine antioxidative Wirkung. Während es durch 10 µM GEN zu einer signifikanten Absenkung der t-BHP induzierten FI kam, senkte bereits die Behandlung mit 1 µM E2 die t-BHP induzierte FI signifikant (Kapitel 3.2.2). Eine Behandlung der Zellen mit 100 µM E2 führte zu einer Absenkung der FI um 140 ± 40%. In den Versuchen zeigte 100 µM E2 somit einen noch stärkeren antioxidativen Effekt auf t-BHP-induzierte ROS als 100 µM GEN. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, dass sowohl E2 als auch GEN ein antioxidatives Potential aufweisen. Durch gleichzeitige Behandlung mit GEN wurde die durch t-BHP induzierte FI konzentrationsabhängig gesenkt.

Das antioxidative Potential von GEN konnte von Arora et al. (1998) auch im zellfreien, liposomalen System zur Erfassung von Lipidperoxidation mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes 3-(p-(6-Phenyl)-1,3,5-Hexatrienyl)-Phenylpropionsäure (DPH-PA) gezeigt werden: Die Verringerung der FI von DPH-PA gilt dabei als direktes Maß für Fe(II)-induzierte Lipidperoxidation und wurde kontinuierlich spektrofluorimetrisch

überwacht. GEN zeigte in diesem System eine hohe antioxidative Wirkung indem 10  $\mu\text{M}$  GEN die Lipidperoxidation fast vollständig verhinderte (Arora et al., 1998).

### 3.3.3 Bestimmung des DNA-strangbrechenden Potentials von Genistein in MCF-7 Zellen

Suspendierte MCF-7 Zellen wurden für 1 h bei 37°C mit GEN inkubiert. Anschließend wurden sie zur Erfassung der ALS und ESS mittels AFE analysiert. Zur Erfassung oxidativer DNA-Schäden wurde ein Teil der Zellen mit Fpg-Protein behandelt, der andere nur mit Enzympuffer ohne Fpg. Die Anzahl an ALS und ESS wiesen im gesamten Konzentrationsbereich leichte (ESS) aber auch signifikante (ALS) Unterschiede zu denen un behandelter Zellen auf (Abbildung 3.27).

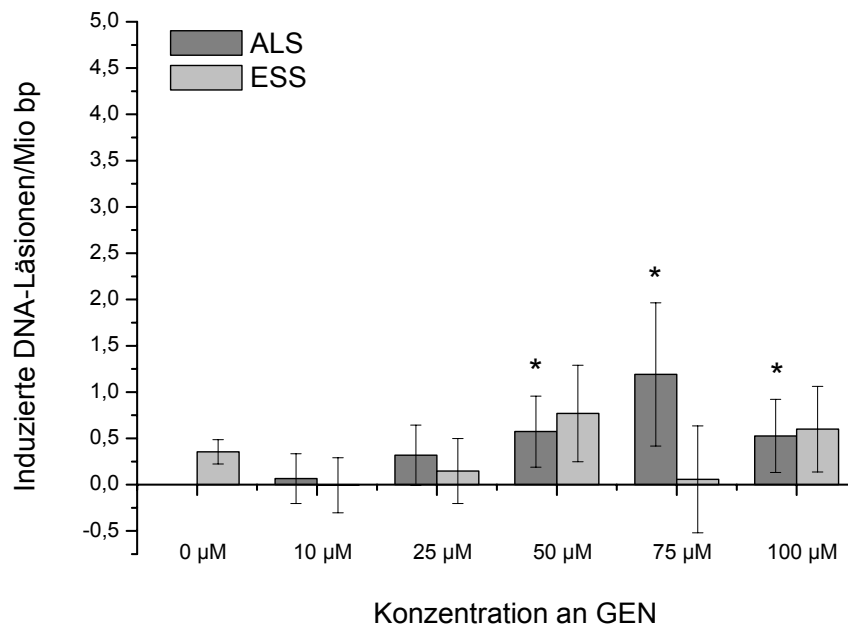


Abbildung 3.27: Induzierte Strangbrüche/ $10^6$  Basenpaare nach 1-stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit GEN. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Die Anzahl der induzierten ALS nahm bis 75  $\mu\text{M}$  GEN auf  $1,19 \pm 0,77$  ALS/Mio bp signifikant zu und betrug nach Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  GEN nur noch  $0,52 \pm 0,39$  ALS/Mio bp. Ab 50  $\mu\text{M}$  GEN und mehr kann von einem signifikanten, strangbrechenden Effekt ausgegangen werden, der mit einer relativ großen Schwankung der Werte verbunden war. Durch Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  GEN kam es zu einer leichten, nicht signifikanten Zunahme der ESS-Anzahl von  $0,35 \pm 0,13$



ESS/Mio bp (Lösungsmittelkontrolle) auf  $0,77 \pm 0,52$  ESS/Mio bp, die sich jedoch nach Behandlung mit 75 und 100  $\mu\text{M}$  GEN auf Kontrollniveau einpendelte. Die von Will et al. (1998) mittels AFE detektierten Mittelwerte Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen/Mio bp unbehandelter Säugerzellen (Lösungsmittelkontrolle) befanden sich im Bereich von etwa 0,25-0,4 ESS/Mio bp (Will et al., 1998). Auch die Bestimmung der ESS unterlag relativ großen Schwankungen, sodass aufgrund der Ergebnisse nicht von einer Induktion oxidativer DNA-Schäden durch GEN ausgegangen werden kann.

Murata et al. (2004) konnten nach jeweils 1-stündiger Behandlung von MCF-10A (Brustepithel-) Zellen und MCF-7 Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  GEN mittels HPLC-ECD ebenfalls keine Induktion oxidativer Schäden in Form von 8-Oxoguanin feststellen.

Foti et al. (2005) zeigten mittels comet assay, dass eine 24-stündige Vorbehandlung von Jurkatt-T-Zellen (menschliche Leukämie T-Zelllinie) mit 2,5-20  $\mu\text{M}$  GEN beziehungsweise von Lymphozyten mit 10 nM - 2,5  $\mu\text{M}$  GEN, die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierte Rate an ALS und ESS signifikant absenkte (Foti et al., 2005). Dieser Befund unterstützt die Beobachtung, dass durch Behandlung bis 25  $\mu\text{M}$  GEN weder ALS noch ESS induziert wurden (Abbildung 3.27). Des Weiteren wurde die Bildung von Malondialdehyd, als Maß für Lipidperoxidation, mittels HPLC bestimmt. Die Lipidperoxidation wurde durch Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  (als  $\text{FeSO}_4$ ) induziert. Die Vorbehandlung von Lymphozyten mit 2,5  $\mu\text{M}$  GEN senkte die Bildung von Malondialdehyd signifikant um 43% gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (Foti et al., 2005). Antioxidative Eigenschaften von GEN konnten Sierens et al. (2002) mittels *Comet Assay* in Spermienzellen zeigen. Eine 1-stündige Vorbehandlung mit 1 nM - 10  $\mu\text{M}$  GEN verringerte das *tail moment* in mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  geschädigten Zellen signifikant. Bei diesen Untersuchungen stellte sich GEN noch vor dem DAI-Metaboliten Equol, Ascorbinsäure und  $\alpha$ -Tocopherol im verwendeten Testsystem als die Substanz mit der stärksten antioxidativen Wirkung heraus. Eine Co-Inkubation von 1  $\mu\text{M}$  GEN und 1  $\mu\text{M}$  Equol wirkte noch stärker antioxidativ als es die beiden Substanzen bereits in Einzelinkubationen mit Konzentrationen von jeweils 1  $\mu\text{M}$  zeigten (Sierens et al., 2002). Eine 30-minütige Vorbehandlung von Lymphozyten mit 0,1-10  $\mu\text{M}$  GEN und anschließender Untersuchung  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierter DNA-Schäden mittels *Comet Assay* zeigte ebenfalls eine signifikante Verringerung des *tail moments*, während die Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  GEN die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  verursachten DNA-Schäden noch zu verstärken schien (Sierens et al., 2001).

Nach 6-stündiger Behandlung kultivierter Lymphozyten mit 25 µM GEN konnte mittels Chromosomenabberationstest mit etwa 35% abberanten Zellen ein im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (3%) etwa 11-facher Wert an Chromosomenabberationen gezeigt werden (Kulling et al., 1999).

In V79-Zellen erwies sich GEN als starker Mikrokerninduktor. Nach 6-stündiger Behandlung mit 5-25 µM GEN und 12-stündiger Nachinkubationszeit kam es zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Anzahl Mikrokern-haltiger Zellen. Eine Behandlung mit 25 µM GEN hatte einen Anstieg auf etwa den 13-fachen Wert der Mikrokernrate der Lösungsmittelkontrolle zur Folge. Die CREST-Färbung zeigte, dass GEN fast ausschließlich kinetochor-negative Mikrokerne induzierte (Kulling und Metzler, 1997).

Dieser Befund wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt: Di Virgilio et al. (2004) wiesen ebenfalls in V79-Zellen nach, dass GEN konzentrationsabhängig von 5-25 µM vornehmlich CREST-negative Mikrokerne induziert (Di Virgilio et al., 2004).

Trotz der gezeigten Eigenschaft von GEN als Mikrokerninduktor wurden in den durchgeführten Versuchen mittels AFE weder zusätzlich induzierte ALS noch ESS detektiert (Abbildung 3.27). Eine konzentrationsabhängige, antioxidative Wirkung von GEN auf die ROS-Generierung konnte in Kapitel 3.3.1 gezeigt werden (Abbildung 3.25).

## **3.4 Untersuchung des genotoxischen Potentials von Daidzein**

### **3.4.1 Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit Daidzein**

Suspendierte MCF-7 Zellen wurden zur Überprüfung der Esteraseaktivität für 1 h bei 37°C mit Daidzein (DAI) inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und der intrazelluläre Calcein-Gehalt durchflußzytometrisch bestimmt.

Über den gesamten Konzentrationsbereich von 1 nM - 100 µM DAI blieb die Anzahl Calcein-positiver Zellen unbeeinträchtigt (Abbildung 3.28).

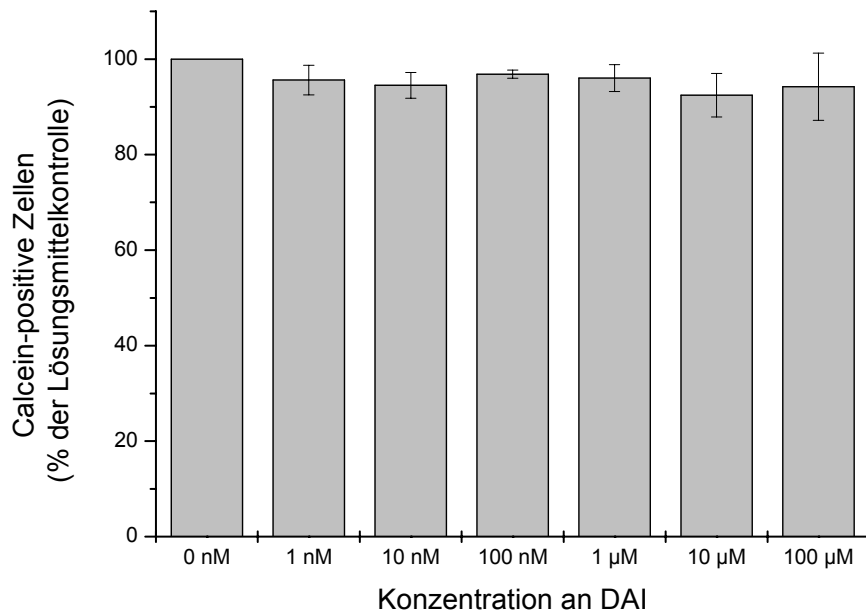


Abbildung 3.28: Prozentualer Anteil Calcein-positiver Zellen nach 1 h Behandlung suspendierter MCF-7 Zellen mit DAI. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar.

DAI zeigte somit unter den verwendeten Versuchsbedingungen keine Hemmung der Esteraseaktivität und konnte in den vorgesehenen Konzentrationen zur Bestimmung der ROS eingesetzt werden.

Hierzu wurden MCF-7 Zellen in Suspension für 1 h bei 37°C gleichzeitig mit DHC AM und DAI inkubiert und im Anschluss durchflußzytometrisch gemessen. Bereits 100 nM DAI senkten die induzierte FI um 0,39 Fluoreszenzeinheiten ab (Abbildung 3.29). Die relative FI wurde um  $7 \pm 1,7\%$  auf etwa 93% des Wertes der Lösungsmittelkontrolle abgesenkt.

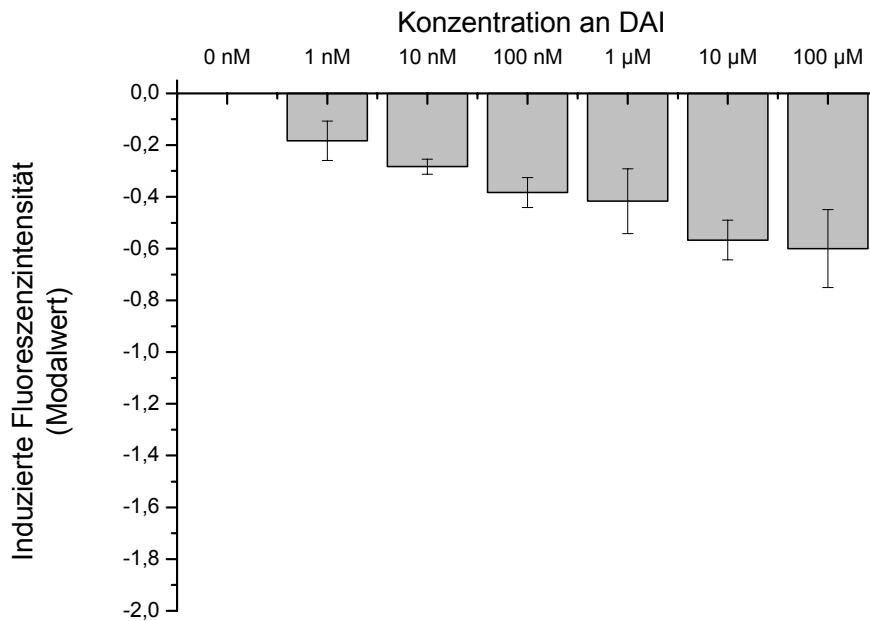


Abbildung 3.29: Induzierte Fluoreszenzintensität nach 1 h Behandlung von suspendierten MCF-7 Zellen mit DAI. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar.

Nach Behandlung mit 100 µM DAI kam es zu einer Erniedrigung der induzierten FI gegenüber der unbehandelten Kontrollzellen von 0,6 Fluoreszenzeinheiten ( $11 \pm 3,3\%$  Senkung der relativen FI). Die Behandlung von MCF-7 Zellen mit bis zu 100 µM DAI hatte somit eine konzentrationsabhängige, nicht signifikante Erniedrigung der induzierten FI zur Folge. DAI scheint in den eingesetzten Konzentrationen, wie GEN auch, antioxidative Eigenschaften zu besitzen. Während 100 µM GEN die induzierte FI gegenüber der unbehandelten Kontrollzellen signifikant um 1,3 Fluoreszenzeinheiten absenkten, erniedrigte eine Behandlung mit 100 µM DAI die induzierte FI nur um 0,6 Fluoreszenzeinheiten. Dieser niedrigere Wert spricht im Vergleich zu GEN für ein geringeres antioxidatives Potential von DAI.

### 3.4.2 Einfluss von Daidzein auf t-BHP-induzierte ROS in MCF-7 Zellen

MCF-7 Zellen wurden bei 37°C für 1 h in Suspension gleichzeitig mit DHC AM, 50 µM t-BHP und DAI inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch gemessen. Nach Behandlung mit 50 µM t-BHP allein kam es gegenüber der Zellpopulation der Lösungsmittelkontrolle zu einer signifikanten Erhöhung der induzierten FI (Kapitel

3.1.3.1). Die gleichzeitige Behandlung mit DAI führte zu keiner signifikanten Veränderung der durch t-BHP induzierten FI (Abbildung 3.30).

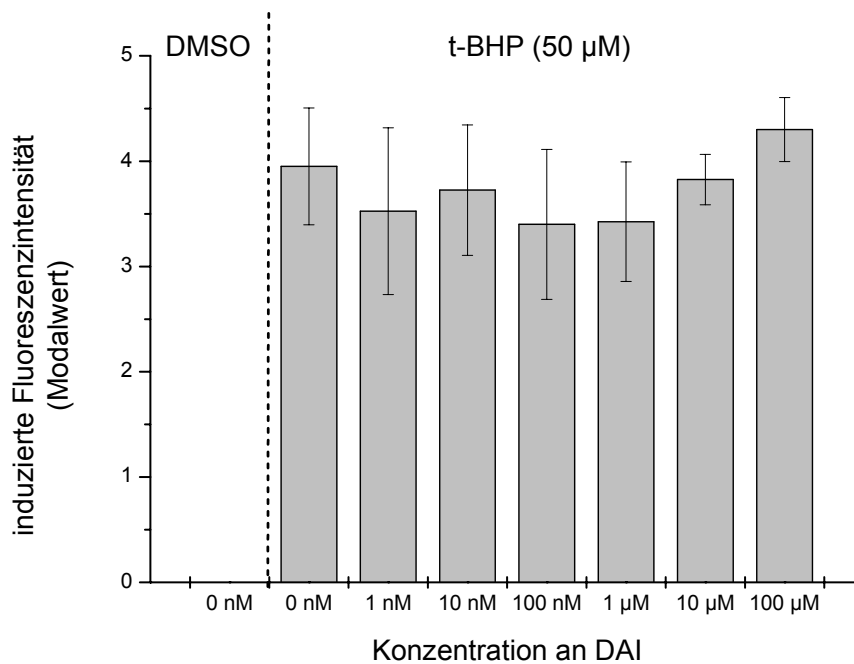


Abbildung 3.30: Induzierte Fluoreszenzintensität nach gleichzeitiger, 1-stündiger Behandlung von suspendierten MCF-7 Zellen mit DAI und 50 µM t-BHP. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar.

Anders als E2 und GEN vermochte DAI die t-BHP-induzierte FI nicht signifikant abzusenkten. DAI zeigte somit unter den verwendeten Versuchsbedingungen in Co-Inkubationsversuchen mit t-BHP keine antioxidative Wirkung.

Rimbach et al. (2003) konnten hingegen mittels ESR zeigen, dass DAI antioxidative Eigenschaften aufwies, indem es als Radikalfänger für Superoxidanionradikale und Hydroxylradikale diente. Dieses Ergebnis konnte sowohl im FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) assay als auch im TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*) assay bestätigt werden. Dabei erwies sich GEN jedoch als das noch potentere Antioxidans (Rimbach et al., 2003).

Arora et al. (1998) zeigten das antioxidative Potential von DAI im zellfreien, liposomalen System zur Erfassung von Lipidperoxidation mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DPH-PA: Die Verringerung der FI von DPH-PA gilt dabei als direktes Maß für Fe(II)-induzierte Lipidperoxidation und wurde kontinuierlich spektrofluorimetrisch überwacht. DAI zeigte in diesem System eine antioxidative Wirkung indem 10 µM DAI die Lipidperoxidation teilweise (und nicht so erfolgreich wie 10 µM GEN) verhinderte (Arora et al., 1998). Dieser Befund spricht wie die

Ergebnisse zur ROS-Bestimmung (Abbildungen 3.26 und 3.30) dafür, dass GEN offensichtlich das potentere Antioxidans der beiden Phytoestrogene GEN und DAI darstellt.

### 3.4.3 Bestimmung des DNA-strangbrechenden Potentials von Daidzein in MCF-7 Zellen

MCF-7 Zellen wurden in Suspension bei 37°C für 1 h mit DAI inkubiert. Anschließend wurden sie zur Erfassung der ALS und ESS mittels AFE analysiert. Zur Erfassung oxidativer DNA-Schäden wurde ein Teil der Zellen mit Fpg-Protein behandelt, der andere nur mit Enzympuffer ohne Fpg. Über den gesamten Konzentrationsbereich von 10 µM bis 100 µM DAI betrug die Anzahl an ESS etwa den Wert der unbehandelten Zellen der Lösungsmittelkontrolle ( $0,41 \pm 0,21$  ESS/Mio bp) (Abbildung 3.31).

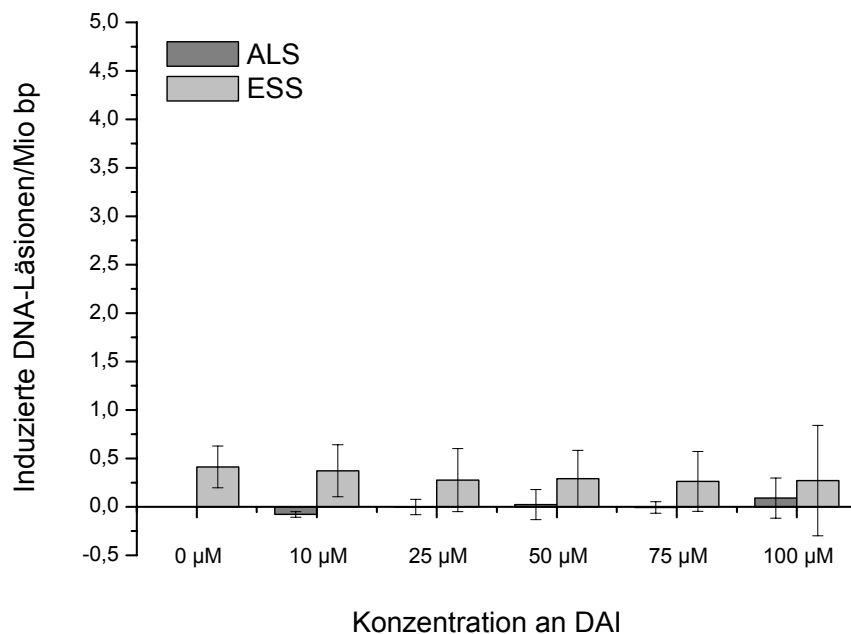


Abbildung 3.31: Induzierte Strangbrüche/ $10^6$  Basenpaare nach 1-stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit DAI. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Bei der Anzahl induzierter ALS konnte ebenfalls keine Veränderung festgestellt werden. Die Anzahl an ALS und ESS wiesen keinen Unterschied zu denen unbehandelter Zellen auf. Der Wert der Lösungsmittelkontrolle lag mit  $0,41 \pm 0,21$  ESS/Mio bp in dem von Will et al. (1998) gezeigten Bereich für unbehandelte

Säugerzellen und menschliche Lymphozyten. Mittels AFE wurde ein Bereich für Zellen der Lösungsmittelkontrolle von etwa 0,25-0,4 ESS/Mio bp ermittelt (Will et al., 1998).

Nach jeweils 1-stündiger Behandlung von MCF-10A Zellen und MCF-7 Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  DAI konnten Murata et al. (2004) mittels HPLC-ECD keine Induktion oxidativer Schäden in Form von 8-Oxoguanin feststellen. Durch Behandlung von Kalbsthymus-DNA mit 10  $\mu\text{M}$  DAI in Gegenwart von NADH und Cu(II) zeigte DAI ebenfalls keine Induktion von 8-Oxoguanin (Murata et al., 2004).

Foti et al. (2005) zeigten mittels comet assay, dass eine 24-stündige Vorbehandlung von Jurkatt-T-Zellen mit 2,5-20  $\mu\text{M}$  DAI beziehungsweise von Lymphozyten mit 10 nM - 2,5  $\mu\text{M}$  DAI, die durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierte Rate an ALS und ESS signifikant absenkte (Foti et al., 2005). Dieser Befund unterstützt die Beobachtung, dass durch Behandlung bis 100  $\mu\text{M}$  DAI weder ALS noch ESS induziert wurden (Abbildung 3.31). Desweiteren wurde die Bildung von Malondialdehyd, als Maß für Lipidperoxidation, mittels HPLC bestimmt. Die Lipidperoxidation wurde durch Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  (als  $\text{FeSO}_4$ ) induziert. Die Vorbehandlung von Lymphozyten mit 2,5  $\mu\text{M}$  DAI senkte die Bildung von Malondialdehyd signifikant um 44% gegenüber der Lösungsmittelkontrolle und wies somit eine gleich starke antioxidative Wirkung wie 2,5  $\mu\text{M}$  GEN auf (Foti et al., 2005).

In mit DAI (12,5  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ ) behandelten menschlichen Colonzellen (HT29-clone 19A) konnten mit Hilfe des für die Behandlung mit Fpg modifizierten comet assays ebenfalls keine oxidativen DNA-Schäden nachgewiesen werden (Pool-Zobel et al., 2000). Dieser Befund steht im Einklang mit den in Abbildung 3.31 dargestellten Ergebnissen.

Nach 6-stündiger Behandlung kultivierter Lymphozyten mit 100  $\mu\text{M}$  DAI konnte mittels Chromosomenabberationstest im Gegensatz zu GEN keine Induktion abberanter Lymphozyten gezeigt werden (Kulling et al., 1999).

Auch DAI zeigte in V79-Zellen eine Induktion von Mikrokernen, die im Vergleich zu GEN jedoch schwächer ausgeprägt war. Nach 6-stündiger Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  DAI und 12-stündiger Nachinkubationszeit kam es zu einer Verdopplung der Anzahl Mikrokern-haltiger Zellen. Im Vergleich dazu hatte eine Behandlung mit 25  $\mu\text{M}$  GEN einen Anstieg auf etwa den 13-fachen Wert der Mikrokernrate der Lösungsmittelkontrolle zur Folge. Die CREST-Färbung zeigte, dass DAI sowohl kinetochor-negative als auch -positive Mikrokerne induzierte (Kulling und Metzler,

1997). Dieser Befund konnte auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden: Eine im Vergleich zu GEN schwächere Induktion CREST-positiver und -negativer Mikrokerne nach Behandlung von V79-Zellen mit 25-100  $\mu\text{M}$  DAI konnte von Virgilio et al. (2004) gezeigt werden (Virgilio et al., 2004).

Die schwache Induktion von Mikrokernen durch DAI spricht für das Ergebnis, dass mittels AFE weder zusätzlich durch DAI induzierte ALS noch ESS detektiert wurden (Abbildung 3.45), da Mikrokerne auf das Auftreten von DNA-Einzelstrangbrüchen, DNA-Doppelstrangbrüchen oder auf DNA-Addukte zurückgeführt werden können. Eine konzentrationsabhängige, hemmende Wirkung von DAI auf die ROS-Generierung konnte in Kapitel 3.4.1 gezeigt werden (Abbildung 3.29).

### **3.5 Einfluss der Isoflavone auf die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit 17 $\beta$ -Estradiol**

Zur näheren Untersuchung der in Kapitel 3. beobachteten antioxidativen Effekte von E2 und der Phytoestrogene GEN (Kapitel 3.3) und DAI (Kapitel 3.4) wurden weitere Versuche durchgeführt. In Co-Inkubationsversuchen sollte der Einfluss der Phytoestrogene auf die durch E2 erniedrigte FI insbesondere auf additive Effekte hin untersucht werden.

#### **3.5.1 Einfluss von Genistein auf die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit 17 $\beta$ -Estradiol**

MCF-7 Zellen wurden in Suspension für 1 h bei 37°C gleichzeitig mit DHC AM, 50  $\mu\text{M}$  GEN und E2 inkubiert und im Anschluss durchflußzytometrisch gemessen. Nach 1-stündiger Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  GEN allein kam es gegenüber der Zellpopulation der Lösungsmittelkontrolle zu einer Abnahme der induzierten FI um 0,92 Fluoreszenzeinheiten (Kapitel 3.3.1). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die GEN-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  für die Co-Inkubationsversuche mit E2 gewählt. Da 100 pM E2 in den Einzelversuchen nur eine leichte, nicht signifikante Abnahme der induzierten FI um 0,1 Fluoreszenzeinheit zeigte (Kapitel 3.2.1), wurde E2 in den Co-Inkubationen in Konzentrationen von 1 nM bis 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Durch 1-stündige



Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  E2 wurde der bereits durch 50  $\mu\text{M}$  GEN gesenkte Wert der induzierten FI um  $93 \pm 31\%$  von  $-0,98 \pm 0,16$  auf  $-1,76 \pm 0,28$  Fluoreszenzeinheiten erniedrigt (Abbildung 3.32). Gegenüber den Zellen der Lösungsmittelkontrolle senkte eine gleichzeitige Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  GEN und 100  $\mu\text{M}$  E2 die induzierte FI um etwa 1,8 Fluoreszenzeinheiten (Senkung der relativen FI um  $52,8 \pm 8\%$ ).

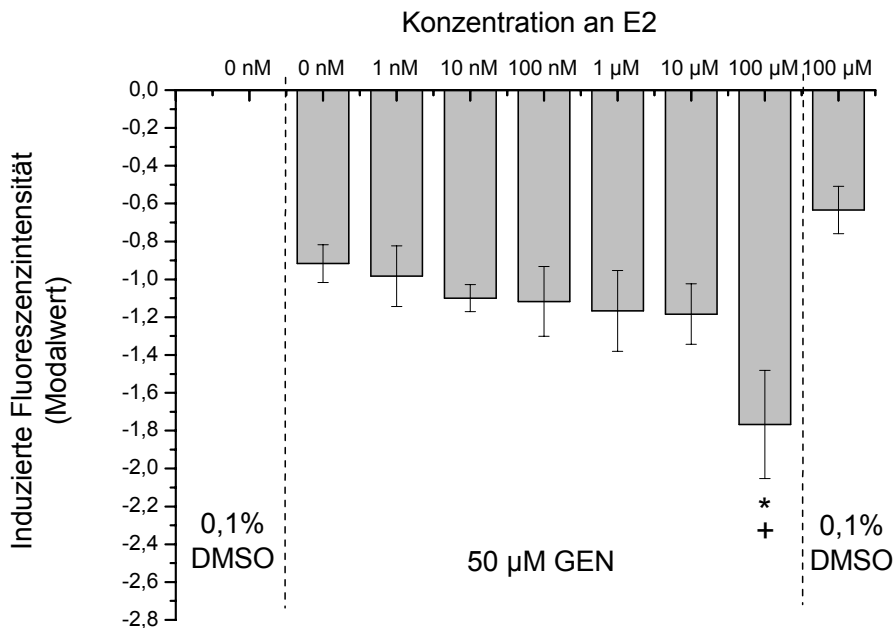


Abbildung 3.32: Induzierte Fluoreszenzintensität nach gleichzeitiger, 1-stündiger Behandlung von suspendierten MCF-7 Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  GEN und E2. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar. \*:  $p < 0,05$  (t-Test gegenüber Lösungsmittelkontrolle + 50  $\mu\text{M}$  GEN), +:  $p < 0,05$  (t-Test gegenüber Lösungsmittelkontrolle 0 nM E2, 0  $\mu\text{M}$  GEN)

Durch gleichzeitige Behandlung mit E2 wurde die GEN-induzierte FI konzentrationsabhängig gesenkt. Die rechnerisch ermittelte Summe der Absenkung der induzierten Fluoreszenzintensitäten aus den Einzelversuchen (50  $\mu\text{M}$  GEN: 0,92 Fluoreszenzeinheiten; 100  $\mu\text{M}$  E2: 0,6 Fluoreszenzeinheiten) beträgt 1,52 Fluoreszenzeinheiten. In den Co-Inkubationen senkte eine gleichzeitige Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  GEN und 100  $\mu\text{M}$  E2 die induzierte FI um 1,8 Fluoreszenzeinheiten. GEN und E2 scheinen in Co-Inkubationen unter den verwendeten Bedingungen gemeinsam die FI stärker abzusenken, als allein in Einzelinkubationen. In ihren antioxidativen Eigenschaften scheinen sie sich in Co-Inkubationen additiv zu verhalten.

### 3.5.2 Einfluss von Daidzein auf die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit 17 $\beta$ -Estradiol

Suspendierte MCF-7 Zellen wurden für 1 h bei 37°C gleichzeitig mit DHC AM, 100  $\mu$ M DAI und E2 inkubiert. Eine 1-stündige Behandlung mit 100  $\mu$ M DAI hatte eine Abnahme der induzierten FI von 0,6 Fluoreszenzeinheiten gegenüber der Zellpopulation der Lösungsmittelkontrolle zur Folge (Kapitel 3.4.1). Für die Co-Inkubationen wurde aufgrund dieses Ergebnisses die DAI-Konzentration von 100  $\mu$ M gewählt. E2 wurde in Konzentrationen von 1 nM bis 100  $\mu$ M eingesetzt. Die Behandlung mit 1  $\mu$ M E2 und 100  $\mu$ M DAI führte zu einer signifikanten Abnahme (83%) der bereits durch 100  $\mu$ M DAI abgesenkten, induzierten FI von -0,6 auf -1,1 Fluoreszenzeinheiten (Abbildung 3.33).

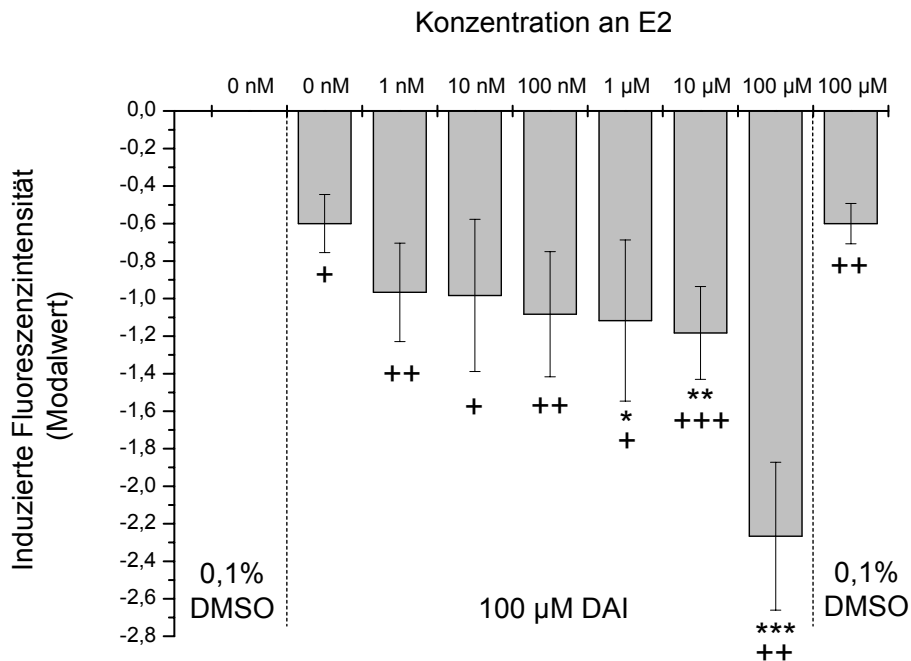


Abbildung 3.33: Induzierte Fluoreszenzintensität nach gleichzeitiger, 1-stündiger Behandlung von suspendierten MCF-7 Zellen mit 100  $\mu$ M DAI und E2. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  (t-Test gegenüber Lösungsmittelkontrolle + 100  $\mu$ M DAI) +:  $p < 0,05$ , ++:  $p < 0,01$ , +++:  $p < 0,001$  (t-Test gegenüber Lösungsmittelkontrolle 0 nM E2, 0  $\mu$ M DAI)

Durch 1-stündige, gleichzeitige Behandlung mit 100  $\mu$ M E2 und 100  $\mu$ M DAI wurde die induzierte FI auf -2,2 Fluoreszenzeinheiten signifikant abgesenkt. Somit kam es durch gleichzeitige Behandlung mit E2 zu einer konzentrationsabhängigen Absenkung der DAI-induzierten FI. Die rechnerisch bestimmte Summe der Absenkung der induzierten Fluoreszenzintensitäten aus den Einzelversuchen (100

$\mu\text{M}$  DAI: 0,6 Fluoreszenz-einheiten; 100  $\mu\text{M}$  E2: 0,6 Fluoreszenzeinheiten) beträgt 1,2 Fluoreszenzeinheiten. In Co-Inkubationen mit 100  $\mu\text{M}$  DAI und 100  $\mu\text{M}$  E2 senkte eine gleichzeitige Behandlung die induzierte FI um 2,2 Fluoreszenzeinheiten. Ebenso wie GEN scheint DAI in Co-Inkubationen mit E2 unter den verwendeten Bedingungen die FI stärker abzusenken, als in Einzelinkubationen. Die antioxidativen Eigenschaften von E2 und DAI scheinen sich in Co-Inkubationen somit noch stärker als additiv zu verhalten.

### **3.6 Untersuchung des genotoxischen Potentials von 4-Hydroxyestradiol**

Beim oxidativen Metabolismus wird E2 an verschiedenen Stellen hydroxyliert (Abbildung 1.2). Bei diesem durch CYP450 katalysierten Vorgang können unter anderem die Catecholestrogene 2-Hydroxyestradiol (2-HO-E2) und 4-Hydroxyestradiol (4-HO-E2) entstehen. Aufgrund ihrer Catecholstruktur wird vermutet, dass CE in metabolisches *Redoxcycling* eintreten und dadurch zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen können (Zhu und Conney, 1998).

Um den Schritt der metabolischen Aktivierung von E2 zu umgehen, wurden MCF-7 Zellen direkt mit dem E2-Metaboliten 4-HO-E2 behandelt und auf die Induktion von ROS, Mikrokernen und oxidativer DNA-Schäden hin untersucht.

#### **3.6.1 Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit 4-Hydroxyestradiol**

Um den Einfluss von 4-HO-E2 auf die Esteraseaktivität zu überprüfen, wurden MCF-7 Zellen für 1 h bei 37°C in Suspension mit 4-HO-E2 inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und der intrazelluläre Calcein-Gehalt durchflußzytometrisch bestimmt.

Die Anzahl der Zellen mit grüner Fluoreszenz (Calcein-positive Zellen) nahm ab einer Konzentration von 7,5  $\mu\text{M}$  4-HO-E2 stetig ab (Abbildung 3.34).

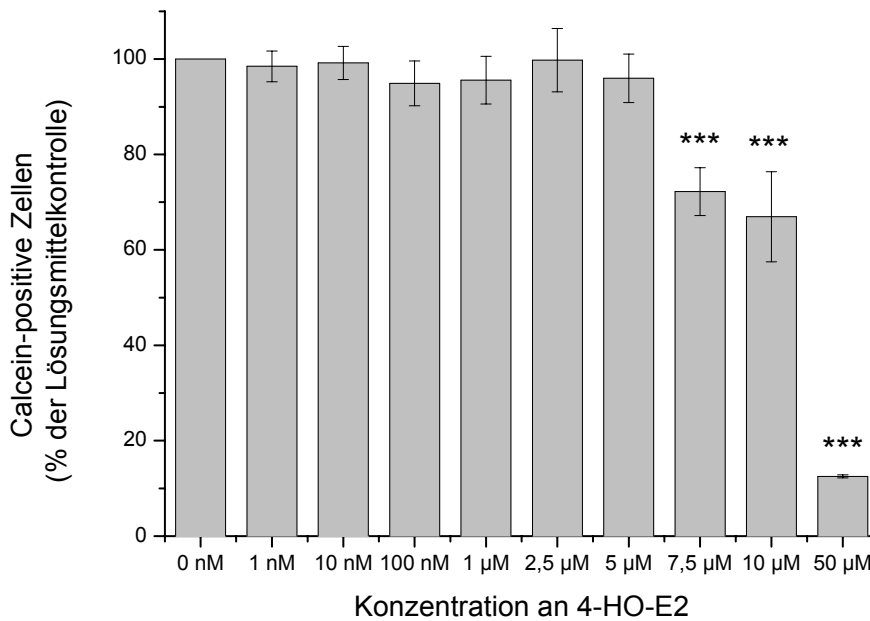


Abbildung 3.34: Prozentualer Anteil Calcein-positiver Zellen nach 1 h Behandlung suspendierter MCF-7 Zellen mit 4-HO-E2. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 5 unabhängigen Versuchen dar. \*\*\*:  $p < 0,001$  (t-Test gegenüber Lösungsmittelkontrolle)

Während etwa 100% der Kontrollzellen Calcein AM zu Calcein mit grüner Fluoreszenz umsetzen konnten, betrug der Anteil Calcein-positiver Zellen nach Behandlung mit 7,5 µM 4-HO-E2 nur noch  $72 \pm 4,9\%$ . 4-HO-E2 schien in diesem Konzentrationsbereich toxisch auf die Esterasen zu wirken, da es verhinderte, dass die Estergruppen des Calcein AMs abgespalten werden konnten. Die Abnahme der FI ist auf die Abnahme der Esteraseaktivität zurückzuführen und als Zeichen für die Zytotoxizität von 4-HO-E2 zu bewerten. Somit ist eine Verwendung von 4-HO-E2 zur Bestimmung dessen ROS-generierenden Potentials nur in Konzentrationen bis 7,5 µM sinnvoll.

MCF-7 Zellen wurden in Suspension für 1 h gleichzeitig mit DHC AM und 4-HO-E2 bei 37°C inkubiert. Nach Behandlung von MCF-7 Zellen mit 1 µM 4-HO-E2 zeigte die induzierte FI eine nicht signifikante Abnahme gegenüber der Kontrolle (Abbildung 3.35). Ab einer Konzentration von 2,5 µM 4-HO-E2 (und höher) kam es zu einer signifikanten Abnahme der induzierten FI.

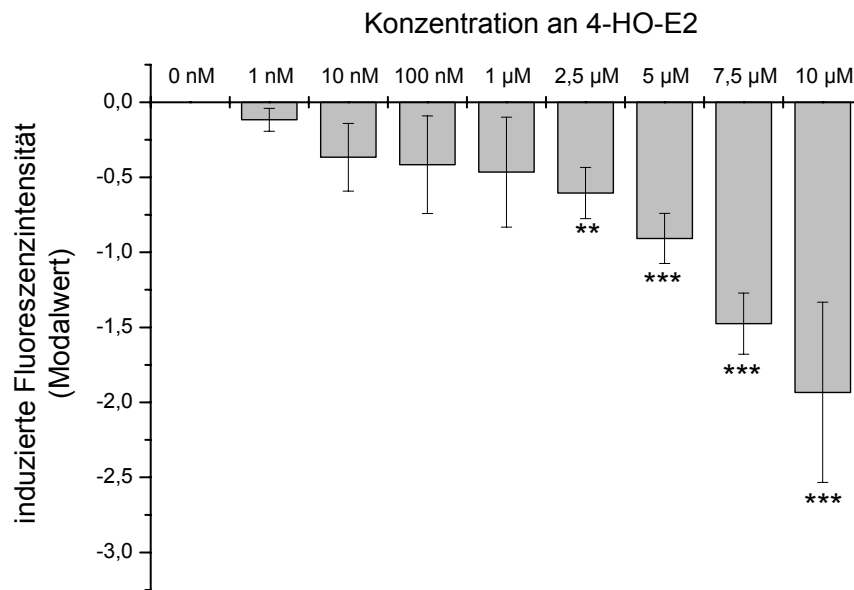


Abbildung 3.35: Induzierte Fluoreszenzintensität nach 1 h Behandlung von suspendierten MCF-7 Zellen mit 4-HO-E2. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 5 unabhängigen Versuchen dar. \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  (t-Test gegenüber Lösungsmittelkontrolle)

Dieser konzentrationsabhängige Effekt ist jedoch nicht auf eine verminderte ROS-Generierung und somit ein antioxidatives Potential von 4-HO-E2 zurückzuführen, sondern auf dessen toxische Wirkung auf die Esteraseaktivität. Mit steigender 4-HO-E2 Konzentration nehmen Esterase-hemmende Effekte zu und aufgrund dessen die induzierte FI ab. Eine signifikante Abnahme der Esteraseaktivität konnte ab 7,5 µM 4-HO-E2 gezeigt werden. Die Ergebnisse zu 2,5 und 5 µM 4-HO-E2 lassen keine eindeutige Zuordnung zu substanzinduzierten oder bereits zytotoxischen Effekten zu. Nach 6-stündiger Behandlung von MCF-10A mit 50 µM 4-HO-E2 konnten Chen et al. (2005) mittels DCFH DA eine signifikante Zunahme der Bildung von ROS feststellen (Chen et al., 2005).

In GSH-depletierten LNCaP (Prostatakrebs-) Zellen, die für 90 min mit 10 µM 4-HO-E2 behandelt wurden, konnte mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Carboxy-2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (CDF DA) eine Zunahme der FI auf den 1,7-fachen Wert der Lösungsmittelkontrolle beobachtet werden (Muzandu et al., 2005). Die Erfassung intrazellulärer ROS mit CDF DA beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Detektion mit DHC AM. Durch eine Absenkung des GSH-Gehaltes konnten somit durch 4-HO-E2 induzierte ROS detektiert werden. In MCF-7 Zellen mit unverändertem GSH-Gehalt konnten mittels DHC AM keine durch 4-HO-E2 induzierte ROS detektiert

werden (Abbildung 3.35). Hier zeigte die Behandlung mit 7,5  $\mu\text{M}$  4-HO-E2 bereits eine signifikante Absenkung der Esteraseaktivität (Abbildung 3.34).

### 3.6.2 Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 24-stündige Behandlung mit 4-Hydroxyestradiol

Nach 1-stündiger Behandlung von MCF-7 Zellen mit 4-HO-E2 konnte in nicht Esterase-hemmenden Konzentrationen keine erhöhte Induktion von ROS festgestellt werden. Als mögliche Ursache hierfür könnte die zu kurze Inkubationszeit gelten, die nicht genügte um 4-HO-E2 ins *Redoxcycling* zu überführen. In den folgenden Versuchen wurden MCF-7 Zellen für 24 h bei 37°C mit 4-HO-E2 behandelt. Nach 24-stündiger Behandlung wurde die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt (Abbildung 3.36). Anschließend wurden die Zellen weiter analysiert.

Bis zu 5  $\mu\text{M}$  4-HO-E2 besteht im Wachstumsverhalten der Zellen kein Unterschied zu dem unbehandelten Kontrollzellen (etwa 3,8 Mio Zellen) (Abbildung 3.36). Ab 7,5  $\mu\text{M}$  4-HO-E2 nimmt die Zellzahl auf  $3,25 \pm 0,8$  Mio Zellen ab, um mit  $2,8 \pm 0,5$  Mio Zellen bei 10  $\mu\text{M}$  4-HO-E2 unter die ursprünglich ausgestreuten 3 Mio Zellen zu fallen.

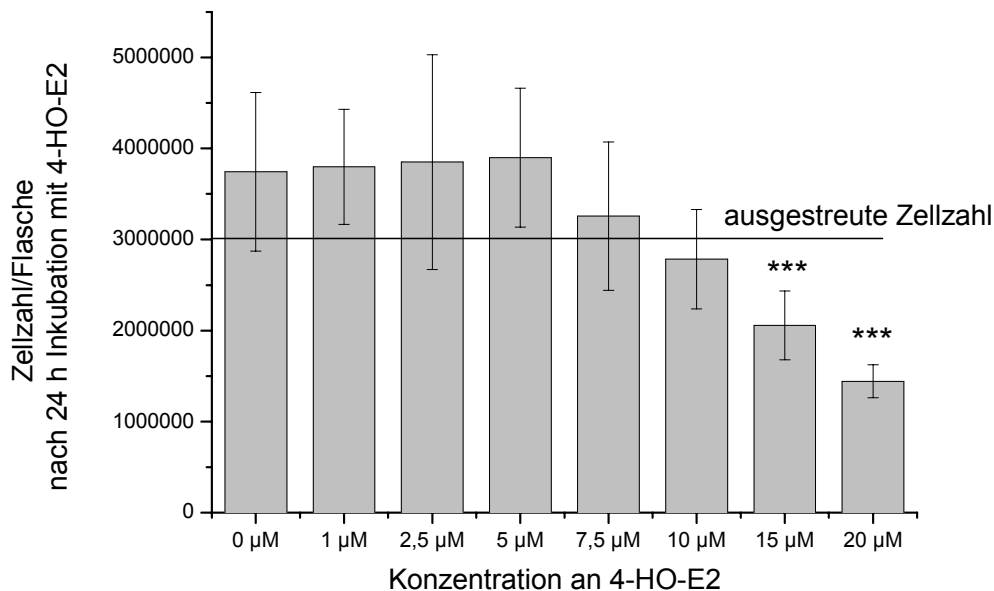


Abbildung 3.36: Zellzahl pro Zellkulturflasche nach 24-stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit 4-HO-E2. Dargestellt sind die Mittelwerte aus bis zu 12 unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. \*\*\*:  $p < 0,001$  (t-Test)

Nach Behandlung mit 15  $\mu\text{M}$  4-HO-E2 und mehr kam es gegenüber der Lösungsmittelkontrolle zu einer signifikanten Abnahme der Zellzahl. Die Bestimmung der Zellzahl liefert daher erste Hinweise auf beginnende Zytotoxizität von 4-HO-E2 im Konzentrationsbereich von 7,5 bis 10  $\mu\text{M}$ . Der konzentrationsabhängige Rückgang der Zellzahl unterstützt die Ergebnisse zur Bestimmung der Esteraseaktivität in 1-stündig mit 4-HO-E2 behandelten MCF-7 Zellen (Kapitel 3.6.1).

Zur Überprüfung der Esteraseaktivität wurden MCF-7 Zellen, die für 24 h mit 4-HO-E2 behandelt wurden, für 15 min bei 37°C in Suspension mit Calcein AM inkubiert. Mit steigender 4-HO-E2-Konzentration nahm die Anzahl Calcein-positiver Zellen stetig ab. So betrug der Anteil der Zellen mit gleicher Esteraseaktivität bei mit 10  $\mu\text{M}$  4-HO-E2 behandelten Zellen nur noch  $82 \pm 12\%$  der Kontrolle (Abbildung 3.37). Bei mit 30  $\mu\text{M}$  4-HO-E2 inkubierten Zellen, die nach 24 h bereits im Medium über dem Zellrasen schwammen (tote Zellen; 30  $\mu\text{M}$  Überstand) betrug der Anteil Calcein-positiver Zellen nur noch  $38 \pm 2\%$ .

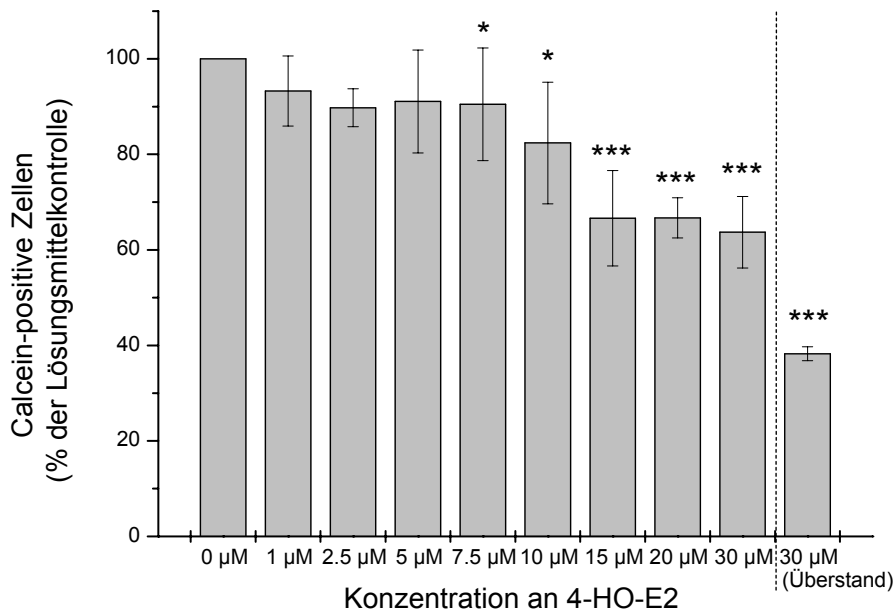


Abbildung 3.37: Prozentualer Anteil Calcein-positiver Zellen nach 24 h Behandlung von MCF-7 Zellen mit 4-HO-E2. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus bis zu 5 unabhängigen Versuchen dar. \*:  $p < 0,05$  \*\*\*:  $p < 0,001$  (t-Test gegenüber Lösungsmittelkontrolle)

4-HO-E2 wirkt unter diesen Inkubationsbedingungen ab 7,5  $\mu\text{M}$  schädigend auf die Esteraseaktivität. Dieses Ergebnis stimmt ebenfalls mit den Daten zur Bestimmung

der Esteraseaktivität in 1-stündig mit 4-HO-E2 behandelten MCF-7 Zellen überein (Kapitel 3.6.1).

MCF-7 Zellen wurden nach 24-stündiger Behandlung mit 4-HO-E2 1 h in Suspension mit DHC AM inkubiert und die Calcein-Fluoreszenz direkt im Anschluss gemessen. Bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  kam es zu keiner Veränderung der induzierten FI gegenüber der Kontrolle (Abbildung 3.38).

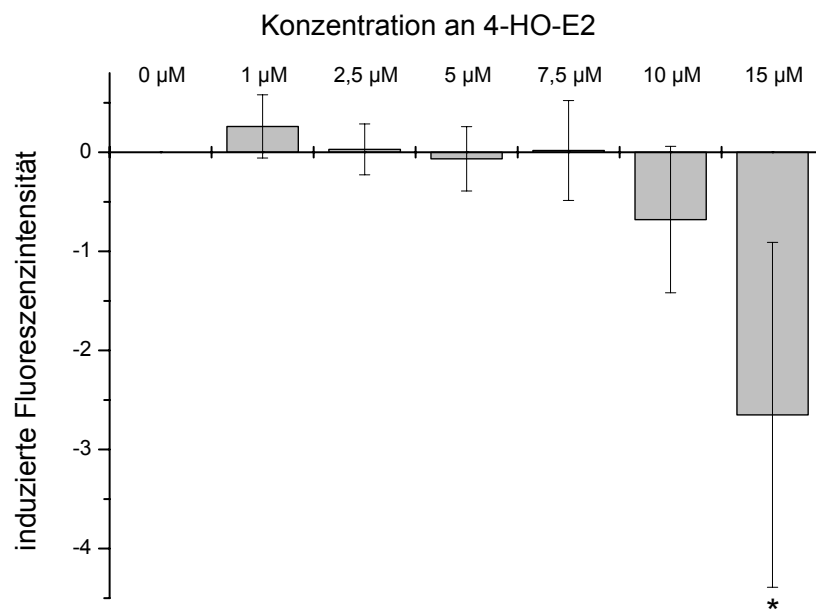


Abbildung 3.38: Induzierte Fluoreszenzintensität nach 24 h Behandlung von MCF-7 Zellen mit 4-HO-E2. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus bis zu 5 unabhängigen Versuchen dar.\*:  $p < 0,05$  (t-Test gegenüber Lösungsmittelkontrolle)

Erst ab 15  $\mu\text{M}$  kam es zu einer signifikanten Erniedrigung der induzierten FI. Dieser Befund würde für einen antioxidativen Effekt von 4-HO-E2 sprechen. Unter Berücksichtigung der Daten des Esteraseaktivitätstests zeigt sich jedoch, dass die Senkung der FI auf die Absenkung der Esteraseaktivität durch 4-HO-E2 zurückzuführen ist.

Eine erhöhte Bildung von ROS durch 4-HO-E2 konnte im verwendeten Testsystem somit nicht nachgewiesen werden.



### 3.6.3 Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 1-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit 4-Hydroxyestradiol

Um die Membranintegrität zu überprüfen, wurden MCF-7 Zellen für 1 h bei 37°C in Suspension mit 4-HO-E2 inkubiert. Unmittelbar vor der Messung wurde der Suspension PI hinzugefügt. Die Anzahl rot fluoreszierender Zellkerne wurde durchflußzytometrisch bestimmt.

Ab einer Konzentration von 5 µM 4-HO-E2 kam es zu einem signifikanten Anstieg des Anteils der Zellen mit geschädigter Zellmembran (Abbildung 3.39).

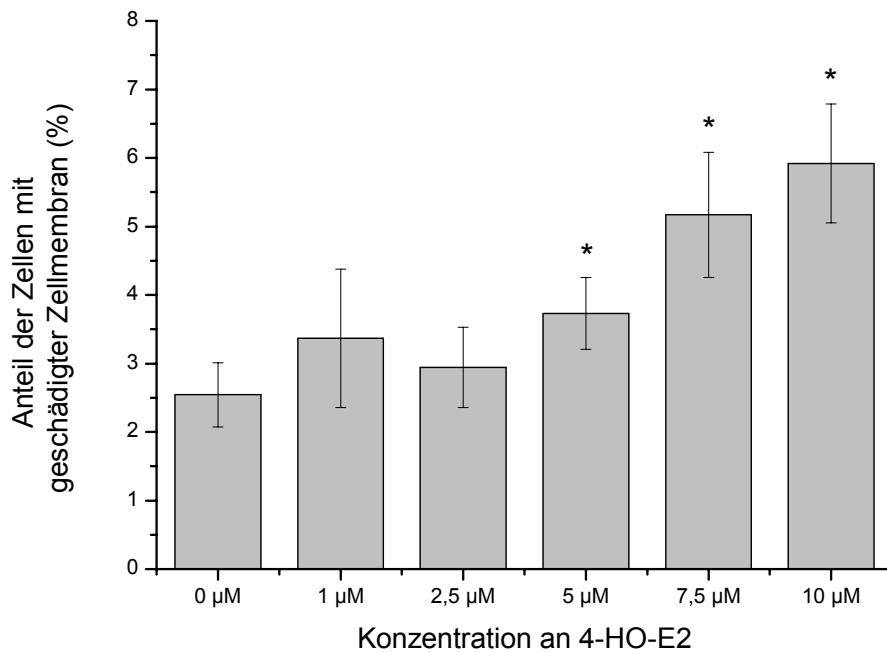


Abbildung 3.39: Prozentualer Anteil der Zellpopulation mit geschädigter Zellmembran nach 1 h Behandlung von MCF-7 Zellen mit 4-HO-E2. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 5 unabhängigen Versuchen dar. \*:  $p < 0,05$  (t-Test gegenüber Lösungsmittelkontrolle)

Nach Behandlung mit 10 µM 4-HO-E2 kam fast zu einer Verdreifachung des Anteils der Zellen mit geschädigter Membran von  $2,4 \pm 0,5\%$  (Zellen der Lösungsmittelkontrolle) auf  $6 \pm 0,9\%$ . 4-HO-E2 wirkt in Konzentrationen ab 5 µM zellmembranschädigend.

Die Viabilität der Zellen wurde auch fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension auf Objektträger zentrifugiert und mit PI und dem membranpermeablen DNA-Farbstoff Hoechst 33258 blau angefärbt (Zellkerne), um alle Zellen zu erfassen. Jeweils 500 Zellen (Lösungsmittelkontrolle und 10 µM 4-HO-E2) wurden fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (Abbildung 3.40).

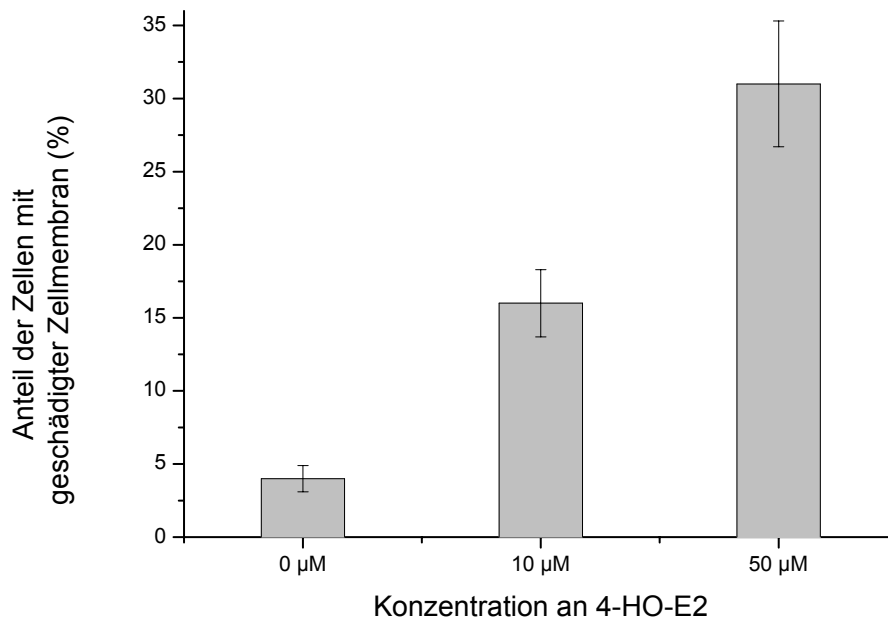


Abbildung 3.40: Fluoreszenzmikroskopische Erfassung des prozentualen Anteils der Zellen mit geschädigter Zellmembran nach 1 h Behandlung von MCF-7 Zellen mit 4-HO-E2. Die Fehlerbalken stellen die Range einer Doppelbestimmung aus einem Versuch dar.

Der Anteil der durch PI rot gefärbten Zellkerne betrug in den Kontrollzellen  $4 \pm 0,9\%$ . Im Gegensatz dazu wiesen  $16 \pm 2,3\%$  der mit  $10 \mu\text{M}$  4-HO-E2 behandelten Zellkerne eine rote Färbung auf. Der durchflußzytometrische Befund, dass 4-HO-E2 in diesem Konzentrationsbereich membranschädigend ist, konnte somit bestätigt werden.

MCF-7 Zellen wurden in Suspension bei  $37^\circ\text{C}$  für 1 h mit 4-HO-E2 inkubiert. Anschließend wurden sie zur Erfassung der ALS und ESS mittels AFE analysiert. Zur Erfassung oxidativer DNA-Schäden wurde ein Teil der Zellen mit Fpg-Protein behandelt, der andere nur mit Enzympuffer ohne Fpg. Die Anzahl an ALS und ESS wiesen im Konzentrationsbereich bis  $20 \mu\text{M}$  4-HO-E2 keinen Unterschied zu denen unbehandelte Zellen auf. Ab  $25 \mu\text{M}$  4-HO-E2 nahm sowohl die Anzahl der ALS als auch der ESS zu (Abbildung 3.41).

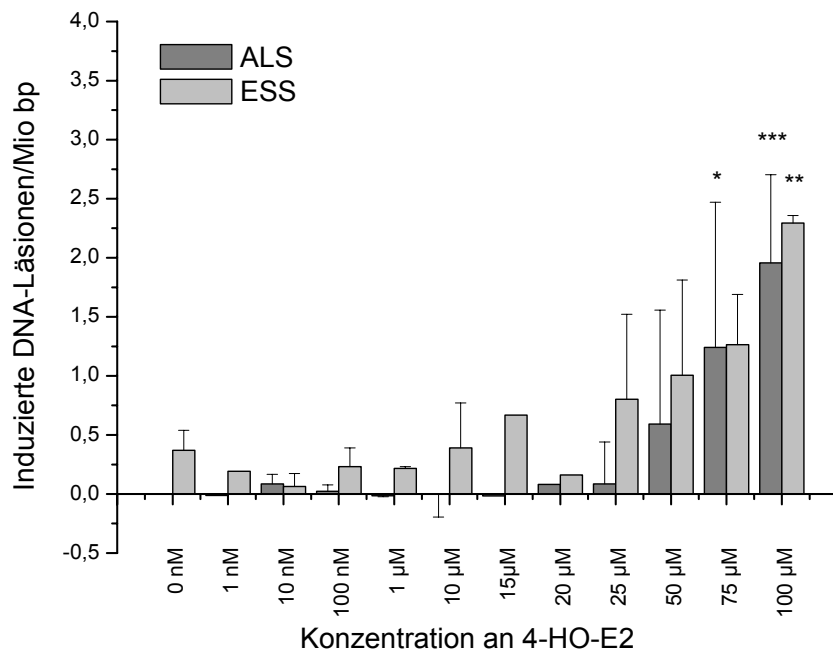


Abbildung 3.41: Induzierte Strangbrüche/ $10^6$  Basenpaare nach 1-stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit 4 OH-E2. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  (t-Test)

Ab einer Konzentration von 75  $\mu\text{M}$  4-HO-E2 kam es zu einer signifikanten Erhöhung der ALS. Die Anzahl der ESS wurde ab 100  $\mu\text{M}$  4-HO-E2 signifikant erhöht. Nach Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  4-HO-E2 war die Zahl der ESS mit  $2,29 \pm 0,06$  ESS/Mio bp im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ( $0,37 \pm 0,5$  ESS/Mio bp) um das 6-fache erhöht. In Kapitel 3.6.3 wurde jedoch gezeigt, dass membranschädigende Effekte bereits bei Konzentrationen ab 7,5  $\mu\text{M}$  4-HO-E2 auftraten (Abbildung 3.39). Nach fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung der mit 50  $\mu\text{M}$  4-HO-E2 behandelten Zellen waren, im Gegensatz zur Kontrolle mit 96%, nur noch 69% der Zellen vital (Abbildung 3.40). Die Zunahme der Strangbrüche nach Behandlung der Zellen mit 4-HO-E2 Konzentrationen von über 20  $\mu\text{M}$  ist somit nicht auf die oxidative Wirkung von 4-HO-E2 zurückzuführen sondern auf dessen sekundär zytotoxische Effekte.

In MCF-7 Zellen, deren Glutathionspiegel durch Vorinkubation (18 h) mit 100  $\mu\text{M}$  BSO erniedrigt wurde, konnten Mobley und Brueggemeier (2002) mittels HPLC signifikant erhöhte Level an 8-oxodG nach 30-minütiger Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  4-HO-E2 zeigen (Mobley und Brueggemeier, 2002).

Nach 6-stündiger Behandlung von MCF-10A mit 20  $\mu$ M 4-HO-E2 konnten Chen et al. (2005) mittels HPLC ebenfalls eine signifikante (4-fache) Zunahme der Rate oxidativer DNA-Schäden in Form von 8-oxodG feststellen (Chen et al., 2005).

Lin et al. (2003) wiesen nach Behandlung mit 100 nM 4-HO-E2 eine 10-fach erhöhte Anzahl aldehydischer Stellen in Kalbsthymus-DNA nach, welche apurine Stellen verursachen und somit zu Strangbrüchen führen können. Des Weiteren stellten Lin et al. ebenfalls eine Erhöhung des 8-oxodG-Gehaltes mittels HPLC-ECD fest (Lin et al., 2003).

Li et al. (2004) konnten nach Injektion von 4-HO-E2 in das Brustdrüsengewebe von ACI-Ratten und anschließender Quantifizierung der DNA-Addukte feststellen, dass 4-HO-E2-1-N3Adenin und 4-HO-E2-1-N7Guanin 99% der Addukte bildeten. Diese zählen zu den depurinierenden Produkten und werden unter anderem für die Entstehung von Mutationen verantwortlich gemacht.

In GSH-depletierten LNCaP Zellen, die anschließend für 2 h mit 5, 10, 20 und 50  $\mu$ M 4-HO-E2 behandelt wurden, konnte mittels *Comet Assay* eine konzentrationsabhängige, signifikante Zunahme der Anzahl an ALS beobachtet werden (Muzandu et al., 2005).

Rajapakse et al. (2005) berichten über eine signifikante Zunahme des *tail moments* im *Comet Assay* von MCF-7 Zellen die für 2 h mit 100 nM 4-HO-E2 behandelt wurden. Durch Behandlung mit Fpg wurden auch oxidative DNA-Schäden erfasst. Mittels digitaler Auswertetechnik konnten Rajapakse et al. signifikante Unterschiede des *tail moments* der mit und ohne Fpg (Erfassung von ESS und ALS) behandelten Zellen gegenüber Zellen der Lösungsmittelkontrolle zeigen (Rajapakse et al., 2005).

#### **3.6.4 Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 24-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit 4-Hydroxyestradiol**

Um die Membranintegrität 24-stündig mit 4-HO-E2 behandelter MCF-7 Zellen zu überprüfen, wurde ein Aliquot der Suspension für 15 min bei 37°C unmittelbar vor der Messung am Durchflußzytometer mit PI versetzt. (Der Großteil der Zellsuspension wurde parallel zur Bestimmung der ALS und ESS verwendet). Mit PI wurden die Zellen mit defekter Membran erfasst.

Es kam ab einer Konzentration von 15  $\mu$ M 4-HO-E2 zu einem signifikanten Anstieg des Anteils der Zellen mit geschädigter Zellmembran (Abbildung 3.42).

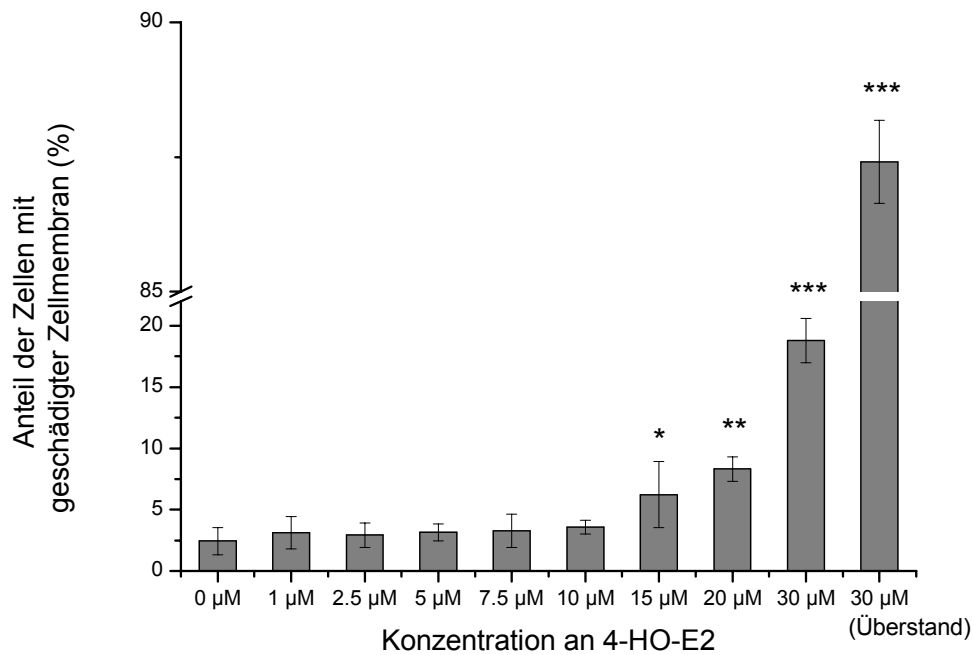


Abbildung 3.42: Prozentualer Anteil der Zellen mit defekter Zellmembran nach 24 h Behandlung von MCF-7 Zellen mit 4-HO-E2. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 5 unabhängigen Versuchen dar. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  (t-Test)

Durch 24-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit 15 µM 4-HO-E2 kam es fast zu einer Verdreifachung des Anteils der Zellen mit geschädigter Membran von ca.  $2,4 \pm 1,1\%$  (Zellen der Lösungsmittelkontrolle) auf  $6,2 \pm 2,7\%$ .

Aus derselben Suspension 24-stündig behandelter MCF-7 Zellen, deren Membranintegrität in parallelen Versuchen untersucht wurde, wurden jeweils 1 Mio Zellen zur Bestimmung der ALS und ESS in der AFE verwendet. Zur Überprüfung des Systems wurden stets mit 40 µM  $\text{KO}_2$  behandelte MCF-7 Zellen als Positivkontrolle mitgeführt. Im Konzentrationsbereich von 1-7,5 µM 4-HO-E2 konnte keine Veränderung der Anzahl an DNA-Schäden/Mio bp gegenüber Zellen der Lösungsmittelkontrolle beobachtet werden (Abbildung 3.43).

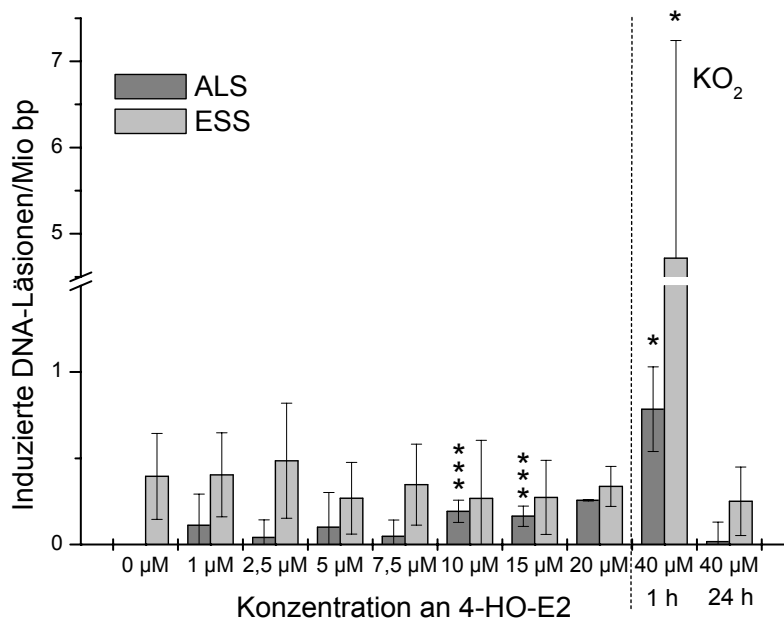


Abbildung 3.43: Induzierte Strangbrüche/ $10^6$  Basenpaare nach 24-stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit 4-HO-E2. Dargestellt sind die Mittelwerte aus bis zu 12 unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. \*:  $p < 0,05$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  (t-Test)

Ab einer Behandlung mit  $10 \mu\text{M}$  4-HO-E2 und mehr kam es zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl an ALS um  $0,19 \pm 0,06$  ALS/Mio bp. Bei der Bestimmung der Membranintegrität konnte eine signifikante Membranschädigung ab  $15 \mu\text{M}$  4-HO-E2 nachgewiesen werden (Abbildung 3.42). Die Erhöhung der Anzahl an ALS ab  $10 \mu\text{M}$  4-HO-E2 scheint auf einsetzender Membranschädigung zu beruhen.

Durch den Radikalbildner  $\text{KO}_2$  wurde nach 1-stündiger Behandlung mit  $4,7$  ESS/Mio bp eine etwa 12-fach höhere Anzahl oxidativer DNA-Schäden induziert als bei Lösungsmittel-behandelten Zellen ( $0,39 \pm 0,25$  ESS/Mio bp) beobachtet wurde. Auch die Anzahl an ALS stieg nach 1-stündiger Behandlung mit  $40 \mu\text{M}$   $\text{KO}_2$  signifikant auf  $0,78$  ALS/Mio bp an. Wurden die Zellen jedoch für 24 h mit  $40 \mu\text{M}$   $\text{KO}_2$  inkubiert, war dieser Effekt nicht mehr zu sehen. Wahrscheinlich konnten die entstandenen DNA-Schäden innerhalb der 24 h erfolgreich repariert werden. Diese Überlegung sollte auch für die Inkubationsversuche mit 4-HO-E2 in Betracht gezogen werden. So könnte es sein, dass nach 1-stündiger Inkubation der Prozess der ROS-Generierung (*Redoxcycling*) noch nicht ausreichend in Gang gesetzt wurde und nach 24 h bereits induzierte DNA-Schäden teilweise wieder repariert wurden.

### 3.6.5 Induktion oxidativer DNA-Schäden durch 4-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen mit 4-Hydroxyestradiol

Für die Reparatur der DNA benötigt die Zelle einen kompletten Durchlauf des Zellzyklus. Um dem Prozess des *Redoxcyclings* mehr als 1 h Zeit zu gewähren und gleichzeitig eine mögliche Reparatur geschädigter DNA im 24 h Versuch zu unterbinden, wurden in den folgenden Versuchen MCF-7 Zellen nach 4-stündiger Inkubation mit 4-HO-E2 mittels AFE analysiert.

MCF-7 Zellen wurden für 4 h bei 37°C mit 4-HO-E2 inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen abtrypsinert und zur Bestimmung der Zellzahl in Medium resuspendiert. Nach 4-stündiger Behandlung mit 4-HO-E2 kam es zu einer leichten Abnahme der Zellzahl (Abbildung 3.44).

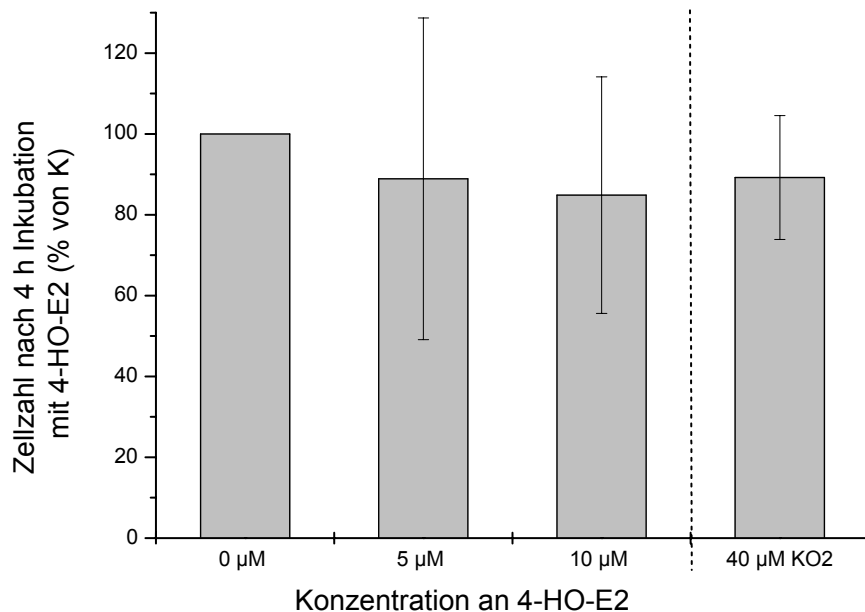


Abbildung 3.44: Zellzahl (% der Lösungsmittelkontrolle) nach 4-stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit 4-HO-E2. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 Bestimmungen aus 2 unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Nach Inkubation mit 10 µM 4-HO-E2 betrug die Zellzahl nur noch etwa 85% der Lösungsmittelkontrolle.

Nach 4-stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit 4-HO-E2 wurde kein Anstieg der DNA-Schäden beobachtet. Die Behandlung mit 40  $\mu\text{M}$   $\text{KO}_2$  führte ebenfalls zu keiner Veränderung der Anzahl an DNA-Läsionen. (Abbildung 3.45).

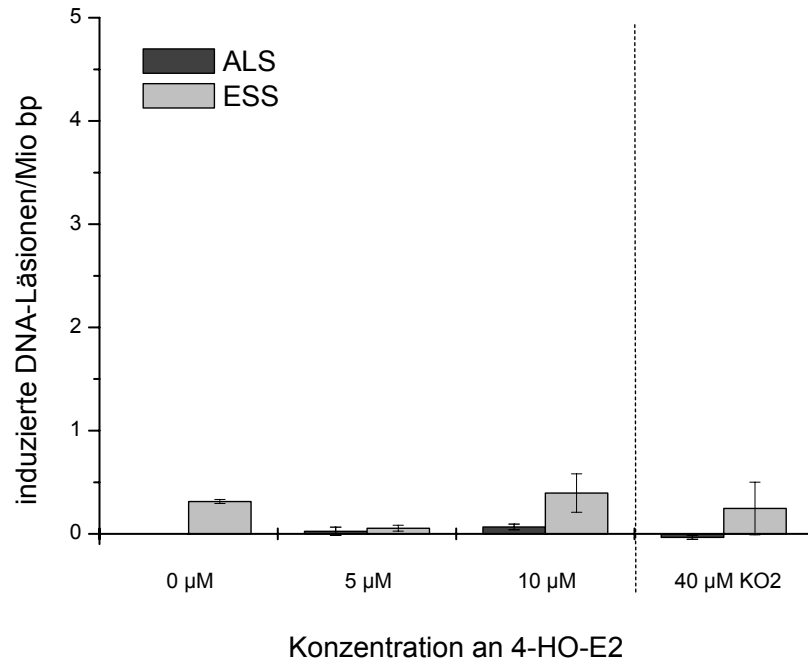


Abbildung 3.45: Induzierte Strangbrüche/ $10^6$  Basenpaare nach 4-stündiger Inkubation von MCF-7 Zellen mit 4-HO-E2. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 Bestimmungen aus 2 unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Nach 4-stündiger Inkubation wies die Kontrolle mit  $0,31 \pm 0,019$  ESS /Mio bp etwa gleich viele ESS auf wie nach 24-stündiger Inkubation ( $0,41$  ESS/Mio Bp  $\pm 0,49$ ). Die Werte der Lösungsmittelkontrolle stimmten auch hier mit den von Will et al. (1998) gezeigten  $0,25-0,4$  ESS/Mio bp überein (Will et al. 1998). Bei einer Inkubationszeit von 4 h induzierte 4-HO-E2, weder ALS noch ESS. Es konnten keine zusätzlichen DNA-Schäden festgestellt werden. Eine mögliche Reparatur induzierter DNA-Schäden bei 24-stündiger Inkubation scheint nicht in Frage zu kommen, da im Konzentrationsbereich von  $1-10 \mu\text{M}$  4-HO-E2 weder in 1-stündigen noch in 4- oder 24-stündigen Versuchen eine Induktion von ALS oder ESS beobachtet wurde.



### 3.6.6 Übersicht der Ergebnisse zur Bestimmung durch 4-Hydroxyestradiol induzierter ROS und oxidativer DNA-Schäden

In Tabelle 3.1 sind zusammenfassend die Ergebnisse der Bestimmungen der ALS, ESS, ROS, Membranintegrität, Esteraseaktivität und Zellzahl nach 1-, 4- und 24-stündiger Behandlung mit 4-HO-E2 dargestellt.

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen zur Bestimmung durch 4-HO-E2 induzierter ROS und oxidativer DNA-Schäden. Dargestellt sind die Konzentrationen, bei denen erstmals signifikante Veränderungen gegenüber der Lösungsmittelkontrolle beobachtet wurden. ↑: Erhöhung, →: keine Veränderung, ↓: Senkung des Effektes.

| Endpunkt             | Behandlungsdauer |         |          |
|----------------------|------------------|---------|----------|
|                      | 1 h              | 4 h     | 24 h     |
| ROS                  | 2,5 µM ↓         | -       | 15 µM ↓  |
| ALS                  | 75 µM ↑          | 10 µM → | 10 µM ↑  |
| ESS                  | 100 µM ↑         | 10 µM → | 20 µM →  |
| Esteraseaktivität    | 7,5 µM ↓         | -       | 7,5 µM ↓ |
| Membranpermeabilität | 5 µM ↑           | -       | 15 µM ↑  |
| Zellzahl             | -                | 10 µM → | 15 µM ↓  |

### 3.6.7 Mikrokerntest in V79-Zellen nach 6-stündiger Behandlung mit 4-Hydroxyestradiol

Um das genotoxische Potential von 4-HO-E2 nicht nur als Summenparameter mehrerer Mio Zellen mittels AFE zu erfassen, sondern auch auf Einzelzellebene zu untersuchen, wurde der Mikrokerntest (MNT) durchgeführt. Hierfür wurden V79-Zellen für 6 h mit verschiedenen 4-HO-E2-Konzentrationen inkubiert, nach verschiedenen substanzfreien Nachinkubationszeiten fixiert und auf die Induktion von Mikrokernen hin untersucht. Bereits direkt nach der Behandlung mit 6 µM 4-HO-E2 (Zeitpunkt 0 h) ist ein leichter konzentrationsabhängiger Anstieg der Mikrokernrate von 4,5 mikrokernhaltigen Zellen/10<sup>3</sup> Zellen in der Kontrolle auf 10 Zellen mit Mikrokern/10<sup>3</sup> Zellen zu beobachten (Abbildung 3.46).

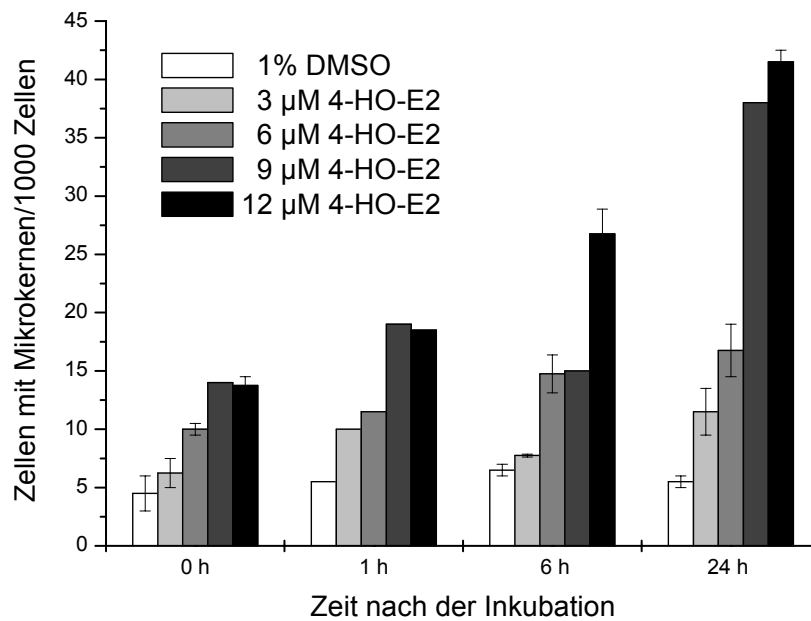


Abbildung 3.46: Mikrokerninduktion nach 6-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit 4 HO-E2 und verschiedenen substanzfreien Nachinkubationszeiten. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Range/2 aus 2 unabhängigen Versuchen.

Nach zwei substanzfrei durchlaufenen Zellzyklen (24 h) kommt es mit 17 Mikrokernen/ $10^3$  Zellen durch 6  $\mu$ M 4-HO-E2 zu einer Verdreifachung gegenüber der Kontrolle (5,5 Zellen mit Mikrokern/ $10^3$  Zellen). Durch 9  $\mu$ M 4-HO-E2 werden zum gleichen Zeitpunkt 38 Zellen mit Mikrokern/ $10^3$  Zellen gebildet, was dem 7-fachen Wert der Kontrolle entspricht.

Die Differenzierung der Mikrokerne in Kinetochor-positive (kinetochorhaltige) und Kinetochor-negative Mikrokerne mittels immunologischer CREST-Färbung der chromosomalen Kinetochorproteine (Abbildung 3.47) erlaubt es, Aussagen über den Wirkmechanismus einer Substanz treffen zu können. Es wird davon ausgegangen, dass durch Aneugene gebildete Kinetochor-positive Mikrokerne ganze Chromosomen enthalten, während Kinetochor-negative Mikrokerne azentrische Chromosomenfragmente enthalten, die auf die Wirkung von Klastogenen zurückzuführen ist (zusammengefasst in Kirsch-Volders et al., 1997).

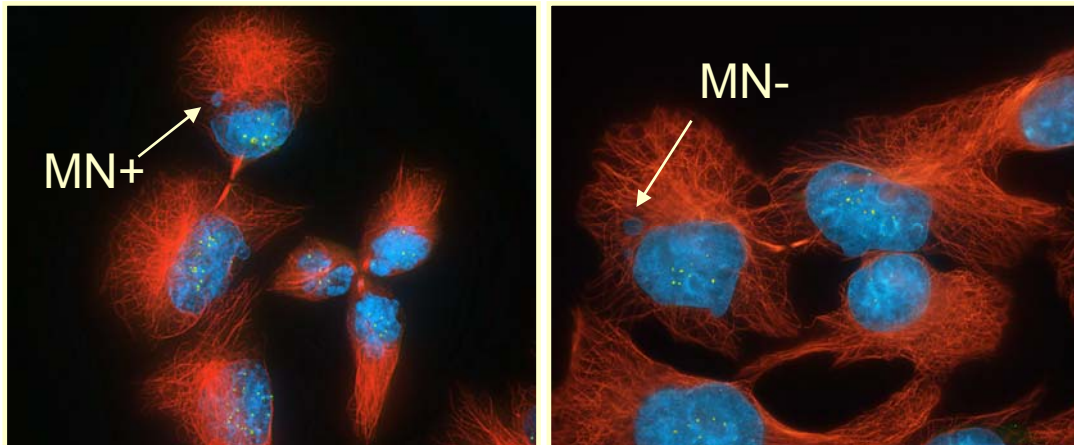


Abbildung 3.47: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von V79-Zellen nach Behandlung mit 4-HO-E2. CMTC (rot), Kinetochor Proteine (gelb) und DAPI-gefärbte Zellkerne (blau); MN+, kinetochorpositiver Mikrokern; MN-, kinetochornegativer Mikrokern. Auf dem linken Bild ist neben einer Zelle mit kinetochorpositivem Mikrokern eine tripolare Cytokinese zu sehen.

Nach Behandlung von V79-Zellen mit 4-HO-E2 wurde mit steigender 4-HO-E2-Konzentration eine Zunahme der Anzahl Kinetochor-positiver und Kinetochor-negativer Mikrokern beobachtet (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Anzahl der V79-Zellen mit Kinetochor-positiven und Kinetochor-negativen Mikrokernen nach Behandlung mit 4HOE2 für 6 h und 24 h Nachinkubation. (n=2)

| c [ $\mu\text{M}$ ] | Zellen mit Mikrokernen/1000 Zellen |              |          |
|---------------------|------------------------------------|--------------|----------|
|                     | Kinetochor +                       | Kinetochor - | $\Sigma$ |
| 0                   | 1 (16,7%)                          | 5 (83,3%)    | 6        |
| 6                   | 9 (34,6%)                          | 17 (65,4%)   | 26       |
| 9                   | 13 (32,5%)                         | 27 (67,5%)   | 40       |

Nach Behandlung mit 9  $\mu\text{M}$  4-HO-E2 kam es mit 9 Kinetochor-positiven Mikrokernen/1000 Zellen zum 9-fachen Wert der Lösungsmittelkontrolle. Die Anzahl Kinetochor-negativer Mikrokern verdreifachte sich etwa von 5 (Lösungsmittelkontrolle) auf 17 Mikrokern/1000 Zellen durch die Behandlung mit 9  $\mu\text{M}$  4-HO-E2.

Mit steigender 4-HO-E2-Konzentration nahm auch die Anzahl der Zellteilungen deutlich ab (Abbildung 3.48).

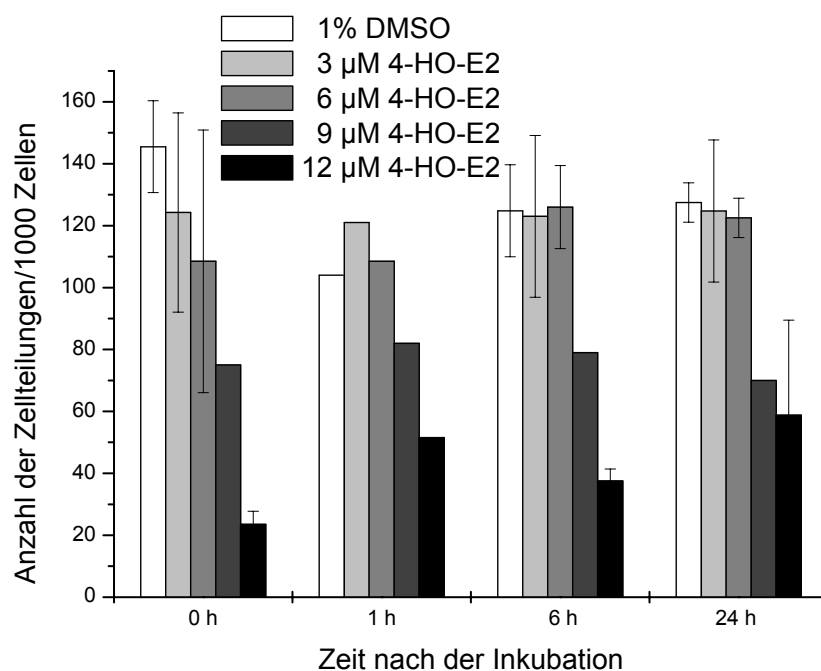


Abbildung 3.48: Anzahl mitotischer und frisch geteilter Zellen/1000 Zellen nach 6-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit 4-HO-E2. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Range/2 aus 2 unabhängigen Versuchen.

4-HO-E2 hemmt somit konzentrationsabhängig die Teilungsfähigkeit von V79-Zellen.

9  $\mu$ M 4-HO-E2 und mehr führten zu einer Zunahme polypolarer und gestörter Mitosespindelapparate und einer Reduktion der Ana- und Telophasen (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Anzahl der Pro-/Meta- und Ana-/Telophasen (pro 1000 Zellen) nach Behandlung mit 4-HO-E2 für 6 h und 24 h Nachinkubation.

| c [ $\mu$ M] | Pro-/Metaphase |          |         |    | $\Sigma$ | Ana-/Telophase |
|--------------|----------------|----------|---------|----|----------|----------------|
|              | normal         | tripolar | gestört |    |          |                |
| 0            | 17             | 0        | 0       | 17 | 45       |                |
| 3            | 18             | 0        | 0       | 18 | 36       |                |
| 6            | 18             | 1        | 0       | 19 | 31       |                |
| 9            | 8              | 6        | 8       | 22 | 26       |                |
| 12           | 3              | 9        | 5       | 17 | 4        |                |

Gleichzeitig kam es zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen (Abbildung 3.49).

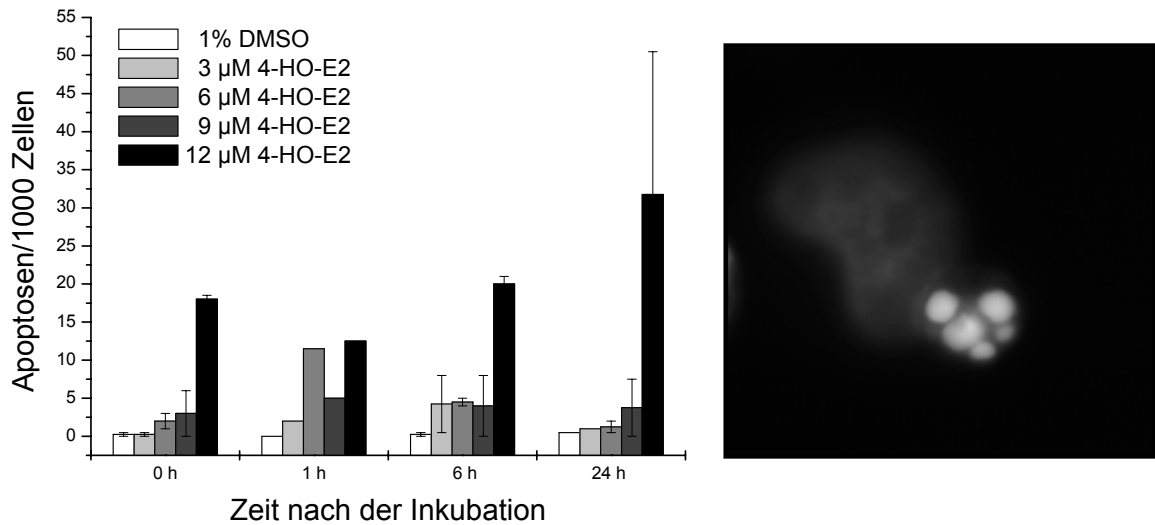


Abbildung 3.49: Induktion von Apoptose nach 6-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit 4-HO-E2 und verschiedenen substanzfreien Nachinkubationszeiten. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Range/2 aus 2 unabhängigen Versuchen. Rechts: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Apoptose nach 6-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit 4-HO-E2. Apoptotische Zellen fluoreszieren intensiver blau als die Zellkerne lebender Zellen. Auf dem Bild ist die für die Apoptose charakteristische Fragmentierung hyperkondensierter DNA zu erkennen.

Aufgrund des konzentrationsabhängigen Rückgangs der Zellteilungen, der Zunahme von Apoptosen und Nekrosen, zunehmender Störung des Spindelapparates und Depolymerisierung der Mikrotubuli wirkt 4-HO-E2 ab Konzentrationen von etwa 12  $\mu$ M zytotoxisch auf V79-Zellen.

### 3.6.8 Mikrokerntest in Ishikawa-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit 4-Hydroxyestradiol

Ishikawa-Zellen wurden in 24-Lochplatten für 72 h mit 0, 1, 5, und 10  $\mu$ M 4-HO-E2 inkubiert. Nach dem Abtrypsinieren wurde ein Aliquot der Zellsuspension auf Objektträger aufzentrifugiert, fixiert und auf die Induktion von Mikrokernen hin untersucht. Mit steigender Konzentration an 4-HO-E2 kam es zu einer Verdreifachung der Mikrokernrate auf 15 Zellen mit Mikrokern/ $10^3$  Zellen (10  $\mu$ M 4-HO-E2) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen mit 5 Zellen mit Mikrokern/ $10^3$  Zellen (Abbildung 3.50).

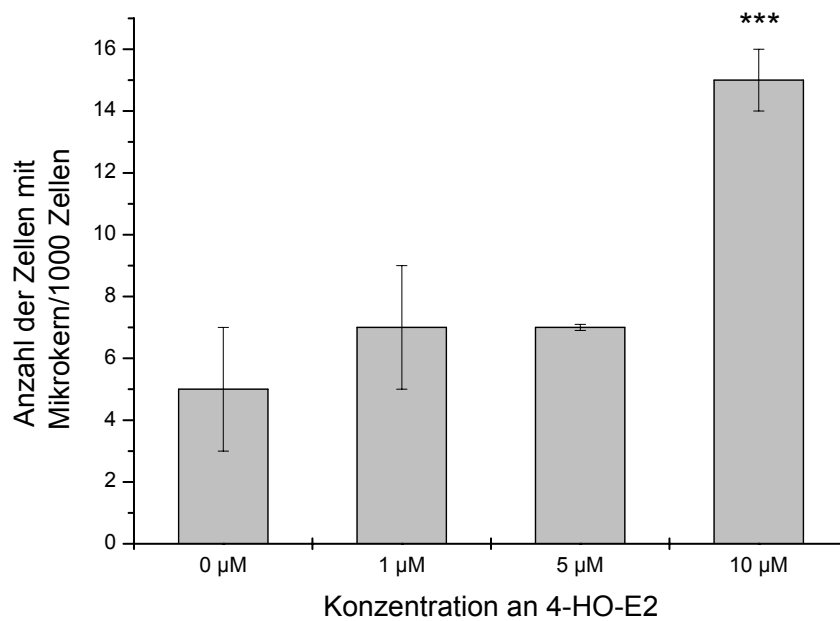


Abbildung 3.50: Mikrokerninduktion nach 72-stündiger Behandlung von Ishikawa-Zellen mit 4-HO-E2. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus bis zu 4 Versuchen dar. \*\*\*:  $p < 0,001$  (t-Test gegenüber Lösungsmittelkontrolle)

Nach Behandlung von Ishikawa-Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  4-HO-E2 konnte somit eine signifikante Erhöhung der Mikrokernrate im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle beobachtet werden. Wie bereits in V79-Zellen gezeigt (Kapitel 3.6.7) induziert 4-HO-E2 auch in Ishikawa-Zellen die Bildung von Mikrokernen.

### 3.7 Effekte von $17\beta$ -Estradiol auf die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen mit gesteigerter EROD-Aktivität

Neben anderen extrahepatischen Geweben wird das endogene Hormon E2 auch im Brustgewebe durch Isoenzyme der CYP-Familien 1A und 1B zu den Catecholestrogenen 2- und 4-HO-E2 metabolisiert (Larsen et al., 1998; zusammengefasst in Zhu und Conney, 1998; Angus et al., 1999, Jefcoate et al., 2000). Aufgrund ihrer Catecholstruktur können diese nach Oxidation zum Semichinon über den Mechanismus des *Redoxcyclings* die DNA schädigen und somit zur Tumorbildung beitragen (Liehr et al., 1995; Cavalieri und Rogan, 2000). Die

Catecholestrogene können unter anderem von der COMT durch O-Methylierung schnell und effizient entgiftet werden (Lipsett et al., 1983). Unter Bedingungen die zu einer Reduktion der O-Methylierungskapazität führen, wie der Anwesenheit von COMT-Inhibitoren oder einem Überschuss an Catecholen, kann es zu einer signifikanten Erhöhung der Halbwertszeit von Catecholestrogenen kommen (Weisz et al. 2000). Der folgenden Versuchsreihe ging die Überlegung voraus, den E2-Metabolismus der Zellen durch Induktion der CYP mittels 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo[p]dioxin (TCDD) zu steigern und gleichzeitig die Aktivität der COMT mit Ro 41-0960 zu hemmen (Spink et al., 1994; Lavigne et al., 2001). Dazu wurden MCF-7 Zellen ausgestreut und für 48 h in Kultur-Medium kultiviert. Die folgenden Schritte wurden alle in cdFKS-haltigem, Phenolrot-freiem Medium durchgeführt. Ab Tag 3 wurden die Zellen für 72 h mit 10 nM TCDD oder mit DMSO (Lösungsmittelkontrolle) behandelt (Abbildung 3.51). Danach wurden die Zellen für 12 h in frischem Medium kultiviert. 30 min vor der 12-stündigen Behandlung mit 10 µM E2 wurde der COMT-Inhibitor Ro 41-0960 (3 µM) dazugegeben. An Tag 7 wurden die Zellen durchflußzytometrisch analysiert.

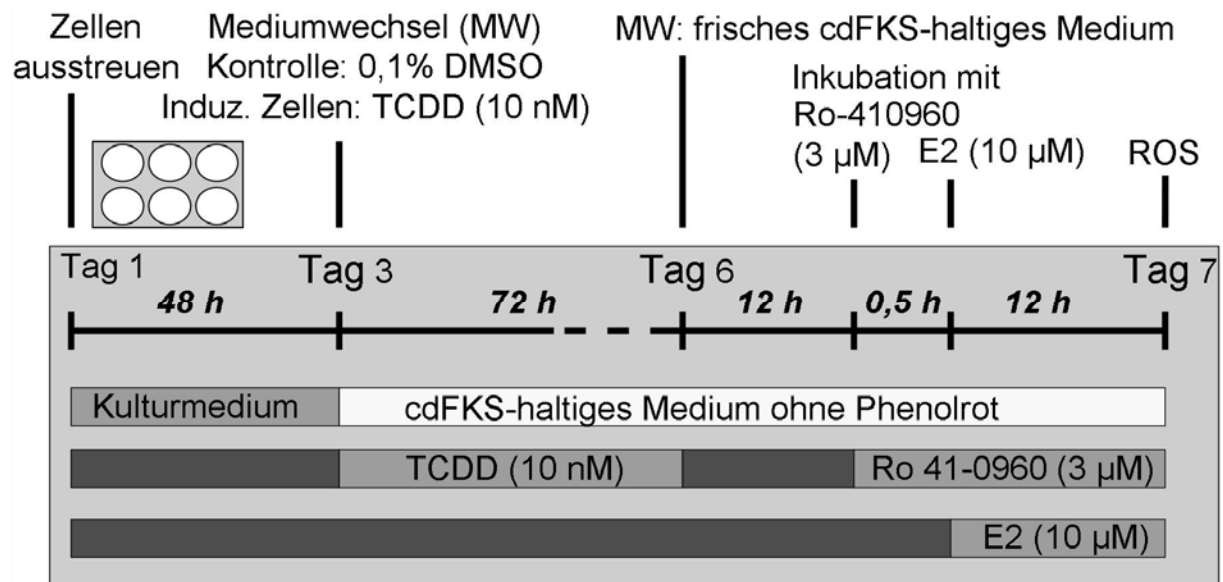


Abbildung 3.51: Inkubationsschema zu den Versuchen mit MCF-7 Zellen mit gesteigerter EROD-Aktivität. Nähere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.

### 3.7.1 Überprüfung der CYP-Induktion in MCF-7 Zellen mittels EROD-assay

Parallel zur Bestimmung der ROS wurde an Tag 6 (vor der E2-Behandlung) und an Tag 7 die Ethoxyresorufin-O-deethylierungs (EROD)-Aktivität bestimmt. Die CYP-Aktivität wurde über den Umsatz des Substrates Ethoxyresorufin zum fluorimetrisch quantifizierbaren Resorufin (Kapitel 5.7) bestimmt. Die Deethylierung von Ethoxyresorufin ist hauptsächlich auf die Deethylase-Aktivität von CYP 1A1 zurückzuführen und somit ein Marker für die CYP-Induktion (Doostdar et al., 2000, zitiert in Spink et al., 2003). Im EROD-assay konnte nach der TCDD-Behandlung an Tag 7 ein starker Anstieg der Deethylierung von Ethoxyresorufin auf den 16-fachen Wert der Lösungsmittelkontrolle gezeigt werden (Abbildung 3.52).

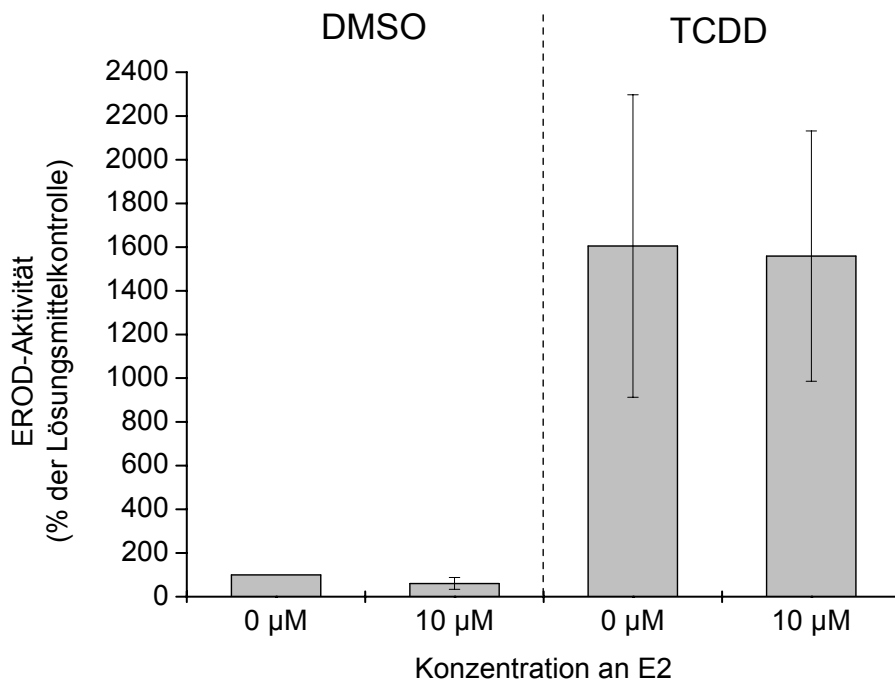


Abbildung 3.52: Bildung von Resorufin in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit E2 (Tag 7) mit und ohne Vorinkubation mit 10 nM TCDD. Dargestellt sind die Mittelwerte und Range/2 aus zwei unabhängigen Versuchen.

Bei nicht mit TCDD vorbehandelten Zellen kam es nach Behandlung mit 10 µM E2 zu einer Abnahme der Resorufinbildung auf  $60,5 \pm 27,1\%$  des Wertes der Lösungsmittelkontrolle. Nach Vorbehandlung mit TCDD wurden keine Unterschiede zwischen mit und ohne E2 behandelten Zellen festgestellt. In MCF-7 Zellen, die für 30 Passagen in Kulturmedium kultiviert wurden und anschließend für 72 h mit 10 nM TCDD behandelt wurden, konnten Spink et al. (2003) eine starke Induktion der EROD-Aktivität auf etwa den 35-fachen Wert der Lösungsmittelkontrolle zeigen.



Durch Anwesenheit von 10 pM E2 und mehr während der TCDD-Behandlung im Medium wurde dieser Effekt signifikant reduziert. Durch 72-stündige Behandlung von MCF-7 Zellen, die vorher für 30 Passagen in estrogenfreiem Medium kultiviert wurden, mit 10 nM TCDD kam es ebenfalls zu einer Induktion der EROD-Aktivität. Diese betrug im Vergleich zu Zellen, die in normalem Kulturmedium belassen wurden nur 16%. Auch hier kam es zu einer signifikanten Reduktion dieses Effektes durch gleichzeitige Behandlung mit 1 nM E2 und mehr (Spink et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte durch 72-stündige Behandlung mit TCDD ebenfalls eine starke Induktion der EROD-Aktivität gezeigt werden. Anders als in den Versuchen von Spink et al. wurden die Zellen erst 12 h nach der Induktion durch TCDD mit E2 behandelt. In nicht mit TCDD vorbehandelten Zellen konnte nach der Behandlung mit 10 µM E2 eine Erniedrigung der EROD-Aktivität beobachtet werden. Erwartungsgemäß zeigte sich somit kein Induktions-hemmender Effekt von E2.

### **3.7.2 Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen mit gesteigerter EROD-Aktivität**

Zur Überprüfung der Esteraseaktivität wurden MCF-7 Zellen, die mit/ohne 10 nM TCDD, 3 µM Ro 41-0960 und 10 µM E2 behandelt wurden, für 15 min bei 37°C in Suspension mit Calcein AM inkubiert. Es konnte gegenüber den Zellen der Lösungsmittelkontrolle keine Veränderung des Anteils Calcein-positiver Zellen, die Calcein AM zu grün fluoreszierendem Calcein umsetzen können, festgestellt werden (Abbildung 3.53).

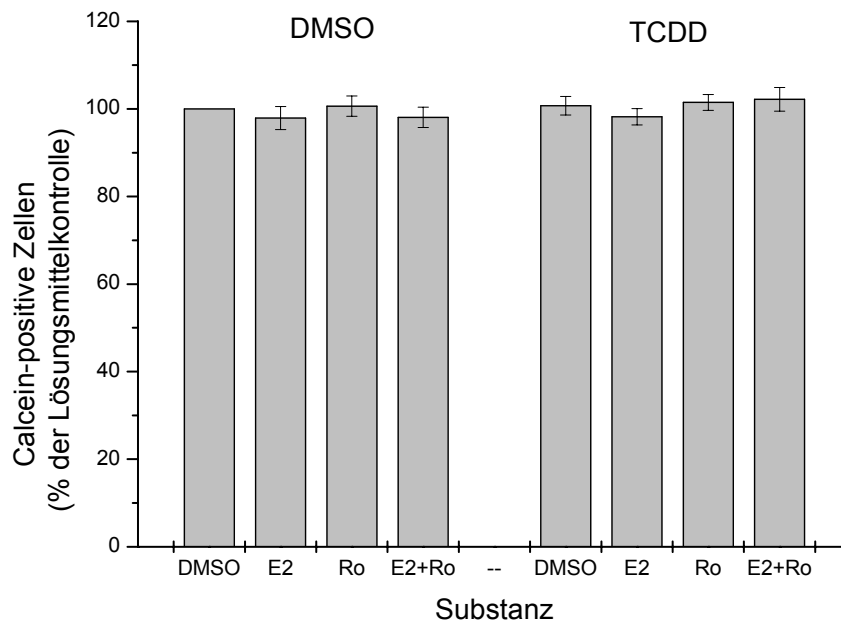


Abbildung 3.53: Calcein-positive Zellen (Prozent der Lösungsmittelkontrolle) nach Behandlung von MCF-7 Zellen mit/ohne 10 nM TCDD, 3  $\mu$ M Ro 41-0960 und 10  $\mu$ M E2. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus 4 unabhängigen Versuchen.

Unter den beschriebenen Bedingungen schien weder die Vorbehandlung mit TCDD noch die Behandlung mit E2 und Ro 41-0960 alleine oder in Kombination die Esteraseaktivität der Zellen zu beeinflussen.

MCF-7 Zellen wurden nach der Behandlung mit TCDD, E2 und Ro 41-0960 für 1 h in Suspension bei 37°C mit DHC AM inkubiert und die Calcein-Fluoreszenz direkt im Anschluss gemessen. Die Behandlung von MCF-7 Zellen mit 10  $\mu$ M E2 führte zu einer Reduktion der induzierten FI um 0,7 Fluoreszenzeinheiten (Abbildung 3.54). 3  $\mu$ M Ro 41-0960 senkten die induzierte FI signifikant um 1,5 Fluoreszenzeinheiten. In Anwesenheit von Ro 41-0960 betrug die durch E2 verursachte Reduktion der induzierten FI 1 Fluoreszenzeinheit. Die Behandlung von MCF-7 Zellen mit E2 und Ro 41-0960 (einzeln und in Kombination) zeigte somit im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) reduzierte Grundlevel an ROS. Auch nach einstündiger Behandlung mit 10  $\mu$ M E2 wurde die FI signifikant um 0,4 Fluoreszenzeinheiten gesenkt (Abbildung 3.20, Kapitel 3.2.1).

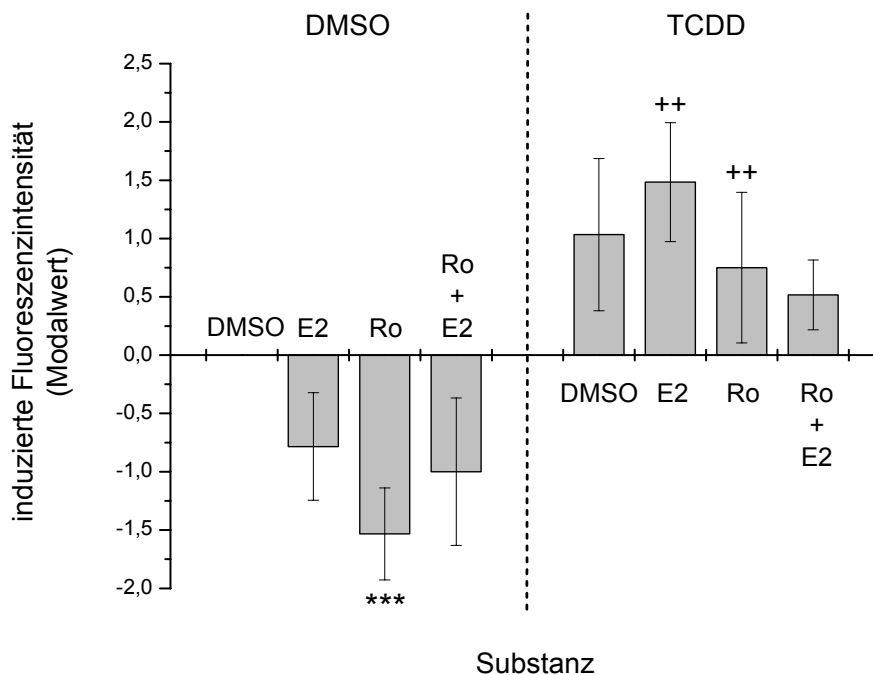


Abbildung 3.54: Induzierte Fluoreszenzintensität nach Behandlung von MCF-7 Zellen mit/ohne 10 nM TCDD, 3  $\mu$ M Ro 41-0960 und 10  $\mu$ M E2. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen dar. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  (t-Test gegenüber jeweiliger Lösungsmittelkontrolle), +:  $p < 0,05$ , ++:  $p < 0,01$ , +++:  $p < 0,001$  (t-Test Substanz (DMSO-vorbehandelt) gegenüber Substanz (TCDD-vorbehandelt))

Innerhalb der TCDD-vorbehandelten Zellpopulation kam es durch Behandlung mit 10  $\mu$ M E2 und 3  $\mu$ M Ro 41-0960 allein und in Kombination zu keinen signifikanten Veränderungen der induzierten FI gegenüber der TCDD-Kontrolle (Abbildung 3.54). Die induzierte FI nahm nach Behandlung mit 10  $\mu$ M E2 den 1,5-fachen Wert der dazugehörigen Lösungsmittelkontrolle (TCDD/DMSO) an. Hier schien die Behandlung mit 10  $\mu$ M E2 die Bildung von ROS im Vergleich zur Zellpopulation der Lösungsmittelkontrolle leicht zu erhöhen. Dieses Ergebnis spräche für die Überlegung, dass CYP-induzierte Zellen infolge des gesteigerten E2-Metabolismus und der zusätzlichen Behandlung mit E2 verstärkt Catecholestrogene bilden, die wiederum in *Redoxcycling* eintreten können und es somit zu einer erhöhten Bildung von ROS kommt. Aufgrund der relativ großen Schwankungen der Versuchswerte und der Möglichkeit, dass Superoxidanionradikale mittels DHC AM wahrscheinlich nicht erfasst werden, konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Die Behandlung mit Ro 41-0960 allein und in Kombination mit E2 führte zu nicht signifikanten Reduktionen der induzierten FI gegenüber der TCDD-behandelten Lösungsmittelkontrolle. Durch

die durch Ro 41-0960 verursachte Hemmung der COMT sollte die Entgiftung der entstandenen Catecholestrogene vermindert und die Bildung von ROS erhöht werden (Lavigne et al. 2001). Durch gleichzeitige CYP-Induktion und E2-Behandlung sollte dieser Effekt aufgrund des gesteigerten E2-Metabolismus und der damit verbundenen Bildung von 4-HO-E2 noch gesteigert werden. Diese These konnte in den durchgeführten Versuchen nicht bestätigt werden. Hierbei sollte in Betracht gezogen werden, dass die COMT in den Versuchen möglicherweise nicht gehemmt wurde. Die gleichzeitige Hemmung der COMT und Behandlung mit 10  $\mu$ M E2 zeigte in CYP-induzierten Zellen bezogen auf Zellen der mit TCDD vorbehandelten Lösungsmittelkontrolle keine Steigerung der ROS-Generierung. Möglicherweise ist dieses Ergebnis darauf zurückzuführen, dass Superoxidanionradikale mittels DHC AM nicht erfasst werden können (Kapitel 3.1.2.1).

Zur Betrachtung des Einflusses von TCDD auf die Generierung von ROS wurden die Fluoreszenzintensitäten nach der jeweiligen Substanzbehandlung von TCDD-vorbehandelten Zellen mit denen nicht-induzierter Zellen verglichen. Die Differenz der induzierten FI beider Lösungsmittelkontrollen betrug etwa eine Fluoreszenzeinheit. Im Vergleich dazu kam es nach Behandlung mit 10  $\mu$ M E2 und 3  $\mu$ M Ro 41-0960 allein jeweils zu einer Erhöhung auf etwa den 2,3-fachen Wert. Beim Vergleich der Behandlung mit E2 und Ro 41-0960 in Kombination zeigte sich gegenüber der Lösungsmittelkontrolle eine 1,5-fach höhere induzierte FI. Somit zeigten mit 10 nM TCDD vorbehandelte Zellen, unabhängig von einer Behandlung mit E2 und Ro 41-0960 alleine oder in Kombination, stets statistisch signifikant erhöhte Grundlevel an ROS.

Lavigne et al. (2001) konnten mittels HPLC-Analyse von E2 und dessen Metaboliten im Kulturmedium von mit 10 nM TCDD für 72 h vorbehandelten MCF-7 Zellen eine Induktion des E2-Metabolismus nachweisen. Während in nicht TCDD-vorbehandelten Zellen 80% der wiedergefundenen Estrogene als nichtmetabolisiertes E2 identifiziert wurde, waren in TCDD-vorbehandelten Zellen etwa 70% des zuvor eingesetzten E2s metabolisiert worden. Des Weiteren wurde mittels HPLC der Anteil an 8-OxidG in der isolierten DNA der mit TCDD vorbehandelten Zellen bestimmt. Nach Behandlung mit 10  $\mu$ M E2 konnte keine erhöhte Bildung von 8-OxidG gegenüber der DNA der Lösungsmittelkontrolle beobachtet werden. Die Behandlung mit TCDD allein wies ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede gegenüber der Lösungsmittelkontrolle auf. Erst durch eine

gleichzeitige Hemmung der COMT kam es zu einer Erhöhung an 8-OxodG (Lavigne et al. 2001).

## 4 Zusammenfassung

Estrogen wirksame Substanzen können zusätzlich zu ihrer hormonellen Aktivität ein genotoxisches Potential aufweisen, welches nicht Estrogenrezeptor-vermittelt ist und oft mit einer metabolischen Aktivierung verbunden ist. Der oxidative  $17\beta$ -Estradiol Metabolit 4-Hydroxyestradiol kann aufgrund seiner Catecholstruktur in *Redoxcycling* eintreten und während dieses Prozesses ein direkt DNA-schädigendes Chinon sowie reaktive Sauerstoffspezies bilden. Reaktive Sauerstoffspezies können aufgrund ihrer hohen Reaktivität mit allen molekularen Strukturen der Zelle wie zum Beispiel DNA, Proteine oder Lipide reagieren, was zu strukturellen und funktionellen Störungen führen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in kultivierten Zellen die Induktion von DNA-Schäden und intrazellulärem oxidativen Stress durch 4-Hydroxyestradiol und  $17\beta$ -Estradiol an den Endpunkten intrazelluläre ROS-Spiegel (Durchflußzytometrie), Chromsomenmutation (Mikrokerntest), DNA-Strangbrüche und apurine Stellen (alkalische Filterelution und alkalischer Comet Assay) sowie oxidative DNA Basenmodifikationen (Formamidopyrimidinglycosylase-Modifikation der alkalischen Filterelution und des Comet Assays) untersucht.

In Kurzzeitinkubationen induzierten die Positivkontrollen für reaktive Sauerstoffspezies Singulett-Sauerstoff (sichtbares Licht), Peroxylradikale (tert.-Butylhydroperoxid), Superoxidanionradikale (Kaliumsuperoxid), und durch *Redoxcycling* generierte Superoxidanionradikale (Menadion) oxidative DNA-Basenmodifikationen.

Im Gegensatz dazu konnte die gesteigerte Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies durchflußzytometrisch durch die Oxidation von Dihydrocalcein zu Calcein nur nach Behandlung mit tert.-Butylhydroperoxid oder Bestrahlung mit sichtbarem Licht detektiert werden.

$17\beta$ -Estradiol hemmte konzentrationsabhängig sowohl die basale als auch die tert.-Butylhydroperoxid-induzierte Oxidation von Dihydrocalcein zu Calcein und zeigte somit antioxidative Eigenschaften. Darüber hinaus wurde nach Behandlung von MCF-7 Zellen mit bis zu  $10\ \mu\text{M}$   $17\beta$ -Estradiol keine Genotoxizität oder Induktion oxidativer DNA-Basenmodifikationen beobachtet.

4-Hydroxyestradiol induzierte in verschiedenen Säugerzelllinien im Mikrokerntest nachweisbare Chromosomenmutationen und einen signifikanten Anstieg der Anzahl alkalilabiler Stellen. Erwartungsgemäß wurde durch 4-Hydroxyestradiol keine Induktion der mit der verwendeten durchflußzytometrischen Methode nachweisbaren Peroxylradikale oder Singulett-Sauerstoff beobachtet.

Eine Vorbehandlung von MCF-7 Zellen mit 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo[p]dioxin zur Stimulierung des intrazellulären Metabolismus von E2 bewirkte eine Erhöhung der basalen Spiegel intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies, die durch Behandlung mit 17 $\beta$ -Estradiol nicht weiter gesteigert wurde.

Genistein reduzierte konzentrationsabhängig sowohl die basalen als auch die tert.-Butylhydroperoxid-induzierten intrazellulären Spiegel reaktiver Sauerstoffspezies und zeigte somit antioxidative Eigenschaften. Die Kombination von 17 $\beta$ -Estradiol und Genistein reduzierte den Spiegel intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies additiv. Die Behandlung von MCF-7 Zellen mit Genistein führte zu einem Anstieg der Anzahl von DNA-Strangbrüchen und Apurinen Stellen, nicht jedoch von oxidativen DNA-Basenmodifikationen.

Daidzein hemmte konzentrationsabhängig den basalen, jedoch nicht den tert.-Butylhydroperoxid-induzierten intrazellulären Spiegel reaktiver Sauerstoffspezies. Die Kombination von 17 $\beta$ -Estradiol und Daidzein reduzierte den Spiegel intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies additiv. Daidzein war in dem eingesetzten Konzentrationsbereich nicht genotoxisch und induzierte keine oxidativen DNA-Basenmodifikationen.

4-Hydroxyestradiol erwies sich in kultivierten Zellen als genotoxisch. Unter den gewählten Bedingungen wurde keine durch 4-Hydroxyestradiol induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies beobachtet. In den verwendeten Testsystemen konnten antioxidative Eigenschaften sowohl von Genistein als auch von 17 $\beta$ -Estradiol gezeigt werden.

## 5 Material und Methoden

Nicht näher spezifizierte Chemikalien stammen von Carl Roth, Fluka/Sigma/Aldrich oder VWR in mindestens der jeweils nötigen Reinheit. Die Firmensitze sind im Anhang aufgelistet.

Wenn nicht anders angegeben, wird VE-Wasser aus der Hausversorgung verwendet.

### 5.1 Geräte

**Sterilbank** Uni Equip Uniflow UVUB 1200 Biohazard

**Brutschrank**

Sanyo CO<sub>2</sub> -Inkubator MCO-17AI

Heraeus B5061 EK-CO<sub>2</sub>

**Zellzählgerät, elektronisch** Schärfe Systeme CASY<sup>®</sup>1DT

**Fluoreszenzmikroskop**

- Zeiss Axioskop Plan Neofluor  
Okular: 10x; Objektive: 63x/100x (Oil)  
Filterblocks: A (DAPI), I2/3 (FITC), N2 (Rhodamin), Tripelfilter
- Nikon Eclipse E400  
Okular: 10x; Objektive: Plan Apo 60x, 100x (Öl)  
Filterblocks: UV-2A (DAPI, Ex<sup>1</sup>: 330-380, DM<sup>2</sup>: 400, BA<sup>3</sup>: 420),  
G-2A (Rhodamin, Ex: 510-560, DM: 575, BA: 590), FITC (Ex: 465-495,  
DM: 505, BA: 515-555), Tripelfilter  
Dokumentation: Spot-RT monochrom CCD-Digitalkamera (Diagnostic  
Instruments), MetaView (Universal Imaging Corp.)

**Durchflusszytometer** Partec PA II, Anregung mit Quecksilberdampf Lampe

**Lampe für sichtbares Licht** Hedler Turbo Lux Profi, Maxi Soft Compact (40 cm x 40 cm)

---

<sup>1</sup>Anregung, Wellenlänge in nm

<sup>2</sup>Dichroistischer Spiegel, Wellenlänge in nm <sup>3</sup>Emissionsfilter, Wellenlänge in nm



**Phasenkontrastmikroskop** Leitz Labovert FS; Objektive: 10x, 20x, 32x

**Mikrotiterplattenlesegerät** Tecan GENios mit Auswertesoftware XFluor

**Handzählgeräte** (VWR)

**Pipetten**

Biozym Precision 0,5 – 10 µl / 5 – 50 µl / 50 – 200 µl Eppendorf 50 µl / 100 µl /

Research 2 – 20 µl / Research 20 – 200 µl / Research 500 – 5000 µl /

Oktapette / Multipetteplus

Abimed Pipetman P5000 / P1000 / P200 / P100 / P20 / P2

Roth 0,5 – 10 µl / 10 – 100 µl / 100 – 1000 µl / 0,5 – 5 ml

**Zentrifugen**

Heraeus Megafuge 1.0R (Kendro) mit Rotor 2705, Zentrifugenbecher 2252H,

Zytozentrifuge

Eppendorf 5417R

**Trockenschrank** Heraeus

**Wasserbad** mgw Lauda, Thermostar

**Waagen**

Sartorius Handy H51 und PT 1200

Mettler ME22, BA25, BE22

**Magnetrührer**

**pH-Meter** Metrom 610 Ion-Meter; Schott pH-Elektrode Blueline 12

**Photometer**

Tegimenta Kontron UV/VIS–Spektralphotometer Uvikon 930 mit Thermostatic

Circulator Jasco V–550 UV/VIS Spektrometer

**Fluorimeter**

Perkin-Elmer LS-50B Lumineszenz Spektrometer

Shimadzu RF-5301

**Vakuumpumpe** Membran-Vakuumpumpe Typ: N86KN.18

Förderleistung l/min: 6,0 (Roth)

**Ultraschallbad** Bandelin Sonorex Super RK255H

**Laborspülmaschine** Miele Mielabor G 7783 Multitronic

**Fraktionssammler** Abimed Gilson Fraktionssammler FC 204

**Schlauchpumpe** Watson Marlow 205s mit Förderschläuchen 0,8 mm Innendurchmesser (Orange/Orange)

## 5.2 Verbrauchsmaterialien

**CASYTON** (Schärfe Systeme)

**CASY<sup>®</sup>cup** (Schärfe Systeme)

**Reaktionsgefäße** 1,5 ml (Sarstedt)

**Reaktionsgefäße** 20 ml (Greiner)

**Pipettenspitzen, Plastik** 1 ml, 200 µl, 10 µl (Sarstedt)

**Pipettenspitzen, Plastik** 5 ml, 300 µl (Eppendorf)

**Pipettenspitzen Multipette plus** 50 ml, 10 ml, 5 ml, 2,5 ml, (Eppendorf)

**Pipettenspitzen, Plastik** 5 ml (Greiner)

**Mikrotiterplatten** Nunclon 96-Loch, 24-Loch, 6-Loch, steril (Nunc)

**„Quadriperm“-Inkubationsgefäße** (Greiner) Multischalen 132 x 82 mm<sup>2</sup>,

4 Vertiefungen

**Zellkulturflaschen** Cellstar 550 ml, 175 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche / 250 ml, 75 cm<sup>2</sup> / 50 ml, 22 cm<sup>2</sup> (Greiner)

**Petrischalen** Durchmesser 145 mm / 94 mm / 35 mm (Greiner)

**Objektträger, superfrost** (Menzel)

**Deckgläser** 24 x 60 mm (Rothoder VWR)

**Zentrifugenröhrchen** 50 ml (Greiner); 15 ml (Sarstedt); 3,5 ml (Sarstedt); 2 ml (Greiner, „cryo.s“)

**Coplinbecher (Glas)** (VWR)

**Küvetten für die Photometrie** aus Quarzglas (Hellma) und aus Polystyrol (Sarstedt)

**Küvetten für die Fluorimetrie** aus Quarzglas oder optischem Spezialglas (Hellma)

**Sterilfilter** Porengröße 0,45 µm und 0,22 µm (Rothoder Sarstedt)

**Spritzenkanüle** Einmal-Kanülen: Durchmesser: 0,45 mm, 0,55 mm, 0,90 mm, 1,2 mm, (VWR oder Roth)

## 5.3 Methoden in der Zellkultur

### 5.3.1 Zellen und allgemeine Zellkulturarbeiten

#### Zellen

##### **V79**

Lungenfibroblasten eines männlichen Chinesischen Hamsters. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von H. Glatt (Bergholz-Rehbrücke) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wachsen adhärent und werden in DMEM mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert.

##### **MCF7-BUS 127 Zellen**

Zelllinie aus humanem Brustkarzinom, die freundlicherweise von Frau Ana Soto (Tufts University School of Medicine, Boston, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Die Zellen wachsen adhärent und werden in DMEM mit 5% fetalem Kälberserum (FKS) kultiviert.

Die Zellen werden in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C kultiviert. Den Medien wird Penizillin (Endkonzentration: 100 IU/ml) und Streptomycin (Endkonzentration: 100 µg/ml) (P/S) zugesetzt.

#### Reagenzien

Die Zellkulturmedien und Zusätze stammen von Sigma, wenn nicht anders angegeben.

**Foetales Kälberserum** (Invitrogen)

**Pferdeserum** (Biochrom) für 30 min bei 56 ° C im Wasserbad hitzeinaktivieren.

**Penizillin/ Streptomycin** (Sigma)

**10x PBS-CMF** 80 g NaCl (1,37 M), 2 g KCl (27 mM), 11,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (wasserfrei) (78 mM), 2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (15 mM), ad 1l.

**PBS-CMF** 10x PBS-CMF wird mit Wasser 1:10 verdünnt (pH:7,4), autoklaviert. Die Lösung ist bei  $-20^{\circ}\text{C}$  3 Monate haltbar. Trypsin 0,2% EDTA in PBS-CMF (pH:7,4, autoklaviert) mit 10x Trypsin-Lösung (2,5%, Sigma) mischen. Die Mischung ist bei  $-20^{\circ}\text{C}$  3 Monate haltbar.

### **Durchführung**

Vor der Benutzung werden alle Lösungen auf  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt.

**Auftauen** Der Eispropf wird mit warmem Medium geschmolzen und die Suspension in 10 ml Medium überführt. Die Zellen werden bei 400 g für 5 min abzentrifugiert, in 20 ml frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 24 h wird das Medium gewechselt. Sobald die Zellen normal wachsen, können sie für Versuche eingesetzt werden.

**Subkultivieren** Zum Passagieren von adhärennten Zellen wird das Medium abgegossen, der Zellrasen zweimal mit 10 ml PBS-CMF und einmal mit 10 ml Trypsin gewaschen und mit etwa 3 ml Trypsin bedeckt solange in den Brutschrank gestellt, bis sich die Zellen abgekugelt haben. Die Zellen werden durch Klopfen vom Flaschenboden getrennt, und in 20 ml Medium aufgenommen. Etwa 1 Mio. Zellen werden in 20 ml frischem Medium ausgestreut.

Alle zwei Tage wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wird das Medium aus der Kulturflasche gegossen und durch 20 ml frisches Medium ersetzt.

**Einfrieren** V79-Zellen werden in kaltem Einfrier-Medium (Medium mit 20 % FKS, 10 % DMSO) suspendiert (1 Mio. Zellen / ml) und in Portionen zu 1,5 ml für 24 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und dann während weiteren 24 h auf  $-80^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Dann werden die Gefäße in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert.

### 5.3.2 Mikrokerntest

#### Prinzip

Zellen werden nach dem Anwachsen mit der Testsubstanz behandelt und anschließend substanzfrei nachinkubiert. Während der folgenden Zellteilungen können sich Mikrokerne bilden.

#### Durchführung

Sterile Objektträger werden innerhalb der Sterilbank in Quadriperm-Inkubationsgefäße gelegt. Etwa 50000 Zellen werden in 5 ml Medium auf den Objektträgern ausgestreut. Nach 24 h sind die Zellen angewachsen und die Testsubstanz wird zugegeben. Nach der Inkubation wird das Medium gewechselt und die Zellen werden substanzfrei nachinkubiert. Anschließend werden die Zellen auf den Objektträgern fixiert, gefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

### 5.3.3 Immunologische Färbung

#### Reagenzien

**2x CB-Puffer** Der Puffer besteht aus NaCl (274 mM), KCl (10 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2,2 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,8 mM), Mg Cl<sub>2</sub> (4 mM), EDTA (4 mM), Pipes (10 mM), Glucose (11 mM). Der pH-Wert ist 6,1.

**Triton X-100-Lösung** Triton-X-100 (Sigma) wird als 10%ige (w/v) Lösung in Wasser eingesetzt.

**Formaldehyd-Fixans** Es werden 3,5g Paraformaldehyd (Merck) in 50 ml Wasser suspendiert und mit 1 ml NaOH-Lösung (1M) gemischt. Für 5 min auf 60°C erhitzen. Davon 40 ml mit dem gleichen Volumen 2x CB-Puffer mischen und den pH-Wert auf 6,1 einstellen. Es werden 2 ml Triton X-100-Lösung zugemischt. Die Lösung ist im Kühlschrank etwa 4h haltbar.

**PBS-Lösung** MgCl<sub>2</sub> (650 µM), CaCl<sub>2</sub> (680 µM) in 1l PBS-CMF lösen.

**Antifade-Lösung** 100 mg p-Phenylendiamin-dihydrochlorid (Sigma) in 10 ml PBS-Lösung lösen und mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (0,5 M, pH 9,0 mit NaOH) auf pH 8,0 einstellen. Mit Glycerin auf 100 ml auffüllen. Sterilfiltrieren und bei  $-20^\circ\text{C}$  lichtgeschützt aufbewahren.

**DAPI-Antifade-Lösung** In 10 ml Antifade-Lösung werden 10  $\mu\text{l}$  DAPI-Lösung (1 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$ ) gelöst (Konz.: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). In Portionen à ca. 0,7 ml lichtgeschützt bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahren.

**PBS-CMF** Ein Volumenteil 10x PBS-CMF wird in etwa 5 Volumenteilen Wasser aufgenommen. Der pH-Wert wird auf 8,0 eingestellt und mit Wasser auf 10 Volumenteile aufgefüllt.

**Ziegennullserum** (Sigma)

**BSA-Lösung** (1%, m/v) Rinderserumalbumin (Roth) wird in PBS-CMF gelöst.

**Primäre Antikörper**

Centromer positive Control („CREST-Antikörper“) (DPC Biermann)  
Monoclonaler Anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper aus Maus-Ascitesflüssigkeit (Sigma)

**Primärantikörper-Lösung** Die Primärantikörper werden mit BSA-Lösung verdünnt (CREST: 1:15; Tubulin: 1:500).

**Sekundäre Antikörper**

Polyvalenter Anti-Human-Antikörper der Ziege (Sigma); FITC-konjugiert Anti-Maus-Antikörper der Ziege (Jackson Immuno Research); CY3-konjugiert

**Sekundärantikörper-Lösung** Die Sekundärantikörper werden mit BSA-Lösung verdünnt (Anti-Human: 1:200; Anti-Maus: 1:250).

**Fixierung der Zellen**

Die Objektträger werden für 5 min in Formaldehyd-Fixans gestellt. Anschließend bis zur Verwendung in Methanol ( $-20^\circ\text{C}$ ) gelagert.

**Färbung der Zellen**

Alle Inkubationsschritte erfolgen in einer feuchten Kammer bei  $37^\circ\text{C}$ .

Die Objektträger werden dreimal für 5 min in PBS-CMF gewaschen.

Es wird mit 200 µl Ziegenserum (Deckglas) für 1h inkubiert. Die Deckgläser werden entfernt und die Objektträger in PBS-CMF geschwenkt.

Mit 50 µl Primärantikörper-Lösung(Deckglas) für 1h inkubieren. Die Deckgläser werden entfernt und die Objektträger dreimal für 5 min in PBS-CMF gewaschen.

Die Objektträger für 1h mit je 50 µl Sekundärantikörper-Lösung (Deckglas) behandeln. Die Objektträger dreimal für 5 min in PBS-CMF waschen.

Die Objektträger werden mit etwa 30 µl DAPI-Antifade-Lösung eingedeckt.

Die Markierung ist im Dunkeln mehrere Wochen haltbar.

#### **5.3.4 Tod-Lebend-Färbung von Zellen**

##### **Prinzip**

Zur Färbung der Zellkerne werden die Zellen mit einem membrangängigen DNA-Farbstoff (z. B. Hoechst 33342) inkubiert. Alle Kerne und Kernfragmente nehmen den Farbstoff auf und sind damit sichtbar. Dies eignet sich besonders zur Gegenfärbung bei anderen Färbungen.

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität werden die Zellen mit einem Prä-Fluorophor (z. B. Calcein AM, Fluoresceindiacetat) behandelt, den die Zelle aktiv in ein Fluorophor umwandelt.

Die Integrität der Zellmembran lässt sich untersuchen, indem die Zellen mit einem nicht membrangängigen DNA-Farbstoff (z. B. Propidiumiodid) behandelt werden. Nur Zellen mit perforierter Membran zeigen die Fluoreszenz, während Zellen mit intakter Membran kein Signal zeigen.

Nach diesen Färbungen kann die Auswertung sowohl fluoreszenzmikroskopisch, als auch durchflußzytometrisch erfolgen.

## Reagenzien

**Hoechst 33342-Lösung** 0,5 mM in DMSO (Sigma)

**Calcein AM-Lösung** 1 mg/ml in DMSO (Sigma)

**Fluoresceindiacetat** 0,5 mg/ml in DMSO (Sigma)

**Propidiumiodid-Lösung** 1 mg/ml in Wasser (Sigma)

## Durchführung

Die Zellen werden in Medium (ggf. angewachsen) mit 0,5  $\mu$ M Hoechst 33342 inkubiert. Nach mindestens 10 min können die Zellen untersucht werden. Die Färbung mit diesem Farbstoff stört die Zellhomöostase nicht weiter und kann daher auch für Langzeituntersuchungen eingesetzt werden.

Die Zellen werden in Medium für 1h mit 1,5  $\mu$ g/ml Calcein AM inkubiert. Dann sollte direkt ausgewertet werden (Filtersatz für Durchflußzytometer:KG1, BG12, TK500, TK560, OG590, EM 520; doppeltlogarithmische Auftragung).

Die Zellen werden in Medium für 15 min mit 0,5  $\mu$ g/ml Fluoresceindiacetat inkubiert. Dann sollte direkt ausgewertet werden.

Die Färbung mit Propidiumiodid (10  $\mu$ g/ml) erfolgt 5 bis 10 min vor der Auswertung, da es ansonsten auch in Zellen mit intakter Zellmembran eindringt.

## Nebenbemerkung

Objektträger mit Deckglas eindecken, dann können Objektträger direkt mikroskopiert werden, das heißt, sie müssen nicht mit Antifade eingedeckt werden.

## 5.4 Alkalische Filterelution

### Prinzip

Die Alkalische Filterelution nach Kohn et al. (1976) erlaubt es, DNA auf Strangbrüche zu untersuchen. Epe et al. (1993) haben die Methode so ergänzt, dass spezifische DNA-Schäden detektiert werden können. Die Methode von Pflaum und Epe (2000) wird mit Modifikationen eingesetzt.



Die Zellen werden auf einem Filter lysiert, mittels Schadens-spezifischer Reparaturrendonukleasen werden zusätzliche Strangbrüche eingefügt, und die DNA wird mit einer alkalischen Lösung vom Filter gewaschen. Je stärker die DNA geschädigt ist, desto schneller lässt sie sich herunter waschen. Die Waschlösung wird in Fraktionen aufgefangen und der DNA-Gehalt mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33258 erfasst.

### Reagenzien

**PBS-G** 100 ml 10xPBS-CMF, 0,135 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,0 g Glucose, ad 1l (pH 7,4).

**Nuclei-Puffer** 100 ml 10xPBS-CMF, 0,2g EDTA, ad 1l (pH7,4).

**Lyse-Puffer** 7,5 g Glycin (100 mM), 7,44 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (20 mM), ad 1l (pH10), 20 g SDS.

**BE1** 3,15 g TRIS/HCl (20 mM), 5,84 g NaCl (100 mM), 0,372 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (1 mM), ad 1l (pH 7.5), autoklaviert bei 8°C zwei Monate haltbar.

**100xBE1-BSA** 10 mg/ml BSA in BE1. Bei -20°C aufbewahren.

**Fpg-Puffer** 10 ml BE1 mit 100 µl 100xBE1-BSA und 10 µl Fpg mischen. Um die Rate der Alkali-labilen Stellen zu bestimmen, wird das Fpg weggelassen.

**Wasch-Puffer** 7,44 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (20 mM), ad1l (pH 10).

**Elutions-Puffer** 5,844 g EDTA (freieSäure, 20 mM), mit Tetraethylammoniumhydroxyd (Alfa Aesar) pH 12,2 einstellen, ad 1l.

**Neutralisations-Puffer** Natriumphosphat (100 mM ) in Wasser (pH 6,0)

**Hoechst-Lösung** 8,82 mg Hoechst 33258 (0,141 mM), ad 100 ml

**Färbe-Lösung** 450 ml Neutralisations-Puffer mit 3 ml Hoechst-Lösung (Endkonzentration: 0,94 µM) mischen.

### Durchführung

Wenn nicht anders angegeben, werden die Lösungen mit 1 ml/min eingezogen.

- System mit Wasser spülen
- Filter (Typ TTTP, Millipore) in Filterhalter (Swinnex SX00025, Millipore) einspannen
- Filter mit 5 ml eiskaltem PBS-G spülen
- Zellen<sup>4</sup> in eiskaltem PBS-G suspendiert aufgeben und einziehen.

- 2x mit 3 ml eiskaltem Nuclei-Puffer spülen.
- 2 ml Lyse-Puffer einziehen.
- 5 ml Lysepuffer innerhalb von 1h einziehen.
- 2x mit 5 ml, 1x mit 10 ml und 1x mit 5 ml BE1 spülen.
- 2 ml Fpg-Puffer aufgeben, den ersten Milliliter mit max. Geschwindigkeit, den Rest innerhalb von 1h einziehen.
- Mit 5 ml BE1 spülen.
- 5 ml Lysepuffer (mit 0,5 mg/ml Proteinase K, VWR) innerhalb von 0,5h einziehen.
- 2x mit 5 ml, 1x mit 10 ml und 1x mit 5 ml BE1 spülen.
- Mit 5 ml Waschpuffer spülen.
- Mit 20 ml Elutionspuffer innerhalb von 8h eluieren. Dabei 10 Fraktionen über jeweils eine Stunde sammeln.
- Filter entfernen und Anlage mit 5 ml Elutionspuffer spülen. Filter zerkleinern und zusammen mit der Spüllösung und der 11. Fraktion für 15 min ins Ultraschallbad stellen.
- Volumina der Fraktionen messen
- Alle Fraktionen mit 1 VOL Farbe-Lösung mischen und nach 20 min fluorimetrisch den DNA-Gehalt quantifizieren (EX: 360 nm; EM: 450 nm).

### Auswertung

Von allen Fluoreszenzen  $F$  den Chemikalienblindwert  $F_{Bw}$  abziehen. Durch Multiplikation der DNA-Fluoreszenz mit dem jeweiligen Volumen die DNA-Menge je Fraktion  $DNA_i$  berechnen.

Der Anteil DNA auf dem Filter nach Fraktion  $n$  berechnet sich nach folgender Formel:

$$FRAC_n = 1 - \left[ \frac{\sum_{i=1}^n DNA_i}{\sum_{i=1}^{11} DNA_i} \right]$$

---

<sup>4</sup> Nagerzellen: 1,5 Mio. Zellen; humane Zellen: 1,0 Mio. Zellen

Es wird  $\log FRAC_n$  gegen  $n$  aufgetragen und die Anfangssteigung bestimmt. Die zusätzliche (induzierte) Steigung gegenüber der Kontrolle ist ein Maß für die Strangbruchrate.

Die zusätzliche Steigung Fpg-behandelter Ansätze gegenüber nicht-Fpg-behandelter Ansätze ist ein Maß für die Anzahl oxidativer Schäden.

Eine induzierte Steigung von 0,0071/h entspricht 0,18 Schäden pro  $10^6$  bp.

## 5.5 Durchflußzytometrische Bestimmung von ROS

### Reagenzien

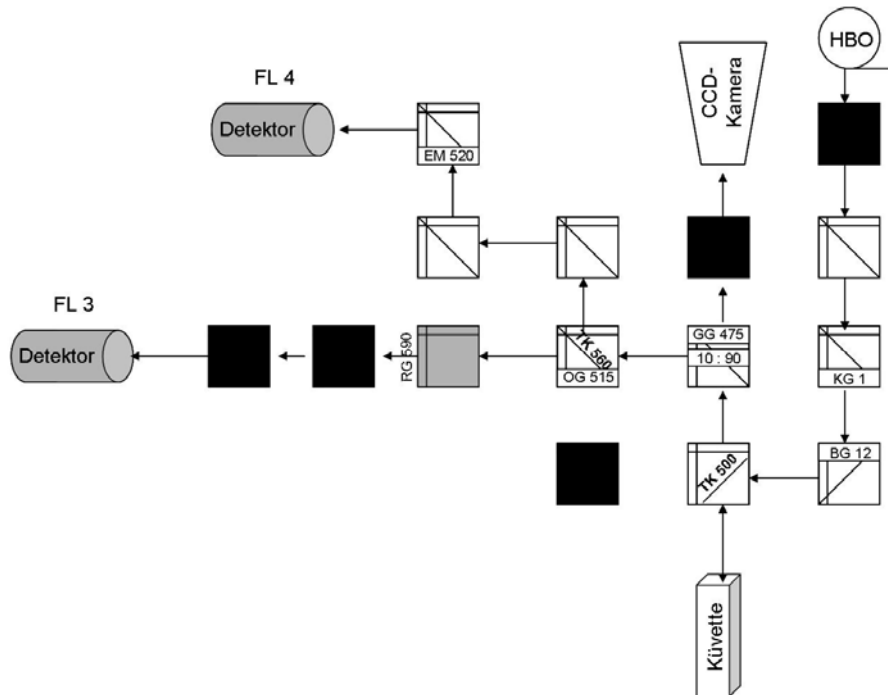
Calcein AM (Molecular Probes, Leiden)

Dihydrocalcein AM (Molecular Probes)

### Durchführung

MCF-7 BUS127 Zellen werden abtrypsinisiert, in frischem Medium aufgenommen und eine Zelldichte von 50000 Zellen/ml eingestellt. Die Suspension wird in zwei Aliquots aufgeteilt und Dihydrocalcein AM (Endkonzentration 500 nM) beziehungsweise Calcein AM (Endkonzentration 500 nM) zugegeben und durchmischt. Die so mit den Farbstoffen vorgemischten Suspensionen werden auf Reaktionsgefäße (2 ml) verteilt und bei 37°C mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert. Nach 10 min werden die Proben zur Bestimmung der Esteraseaktivität (Suspension Calcein AM) aus dem Brutschrank genommen und bis zur direkten Messung auf 4°C temperiert. Nach 1 h werden die Proben zur Bestimmung der ROS (DHC AM) aus dem Brutschrank genommen und bis zur Messung auf 4°C temperiert. Für die Messung werden je 900 µl in ein Partec-Reaktionsgefäß überführt, gevortext und gemessen. Je Reaktionsgefäß (2 ml) werden zwei Proben gemessen (1. Messung in aufsteigender Konzentration, 2. Messung beginnend mit höchster Konzentration).

Geräteeinstellungen:      Speed: 4;                      Gain: FL3: 450; FL4: 350



Filtersatz: KG 1, BG 12; TK 500, TK 560; OG 590, EM 520  
 FL3 und FL4 werden logarithmisch (log3) dargestellt.

### Auswertung der Meßdaten

Während der Messung wird von der Software ein Histogramm der Zellpopulation erstellt. Dieses wird mit Hilfe der Peak Analyse zur Auswertung herangezogen. Mit der Funktion „fit Gauss' peak“ wird eine Gauß-Verteilung des Histogramms berechnet. Das Maximum der Gauß'schen Verteilung liefert den häufigsten Wert (Modalwert) der Fluoreszenzintensität. Dieser Wert stellt die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellpopulation dar. Da die Fluoreszenzintensität der Kontrollzellen mit der Zeit leicht zunimmt, muss dieser Effekt bei der Auswertung berücksichtigt werden. Eine Messreihe beginnt und endet stets mit einer Kontrolle. Die Differenz der Fluoreszenzintensität der Kontrollen wird durch die Anzahl der Messungen dividiert und anteilig zur Fluoreszenzintensität der Kontrolle (erste Messung) addiert.

$$K_{\text{korr}} = K_1 + (\Delta_K / (n-1)) * F$$

$K_{\text{korr}}$  : korrigierte Kontrolle

$K_1$  : erster Messwert der Kontrolle

$\Delta_K$  : Differenz der Fluoreszenzintensitäten beider Kontrollen

n : Anzahl der Messungen

F : Faktor

| Messung | F   |
|---------|-----|
| 1       | 0   |
| 2       | 1   |
| 3       | 2   |
| ...     | ... |

Die so für jeden Messpunkt korrigierte Fluoreszenzintensität der Kontrolle wird von den Messwerten subtrahiert, so dass die induzierte Fluoreszenzintensität der Kontrollzellen in der graphischen Darstellung immer den Wert 0 aufweist.

## 5.6 Comet Assay

### Reagenzien

NMA (0,5%ig): 50 mg NMA/ 10 ml PBS-CMF

LMA (0,7%ig): 70 mg LMA/ 10 ml PBS\_CMF

Lyselösung: 2,5 M NaCl

37,2 g EDTA

10 mM Tris

1% N-Laurylsarcosin, Natriumsalz

pH = 10 einstellen, mit dest. H<sub>2</sub>O auf 1l auffüllen. Am Gebrauchstag 0,1% Triton X-100 und 10% DMSO zugeben.

Enzympuffer: 20 mM Tris

100 mM NaCl

0,37 g EDTA

0,5 g BSA

pH = 7,5 einstellen, mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen. Am Gebrauchstag 1,5 µg/ml Fpg-Protein zugeben.

Elektrophoresepuffer: 0,37 g EDTA

12 g NaOH

Mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen, pH = 13 überprüfen.

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Neutralisationspuffer:          | 400 mM Tris<br>pH = 7,5 einstellen, mit dest. H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen und<br>autoklavieren. |
| Ethidiumbromid-<br>Stammlösung: | 10 mg Ethidiumbromid mit dest. H <sub>2</sub> O auf 50 ml auffüllen.                                   |
| Gebrauchslösung:                | 1 ml Stammlösung mit dest. H <sub>2</sub> O auf 10 ml auffüllen.                                       |

### **Durchführung**

Nach der Substanzbehandlung wird die Zellzahl der Zellsuspension bestimmt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 1200 U/min (270 x g) wird das Zellpellet in so viel kaltem PBS-CMF resuspendiert, dass die Zelldichte  $2 \times 10^6$ / ml beträgt. Je 100 µl der Suspension ( $2 \times 10^5$  Zellen) werden in Reaktionsgefäße überführt und erneut bei 4°C und 1200 U/min (270 x g) für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen zur Verhinderung der Reparatur auf Eis gelagert.

Die nachfolgenden Schritte erfolgen in einem abgedunkelten Raum unter Rotlicht, um Lichteinfall, der zu zusätzlichen oxidativen Basenschäden führen kann, zu verhindern.

Für die Herstellung der Präparate werden einseitig aufgerauhte Objektträger (OT) verwendet, auf denen die aufgetragenen Agaroseschichten besser haften als auf glatten. Die OT werden zunächst mit einem dünnen Ausstrich (40µl) 0,5%iger normal schmelzender (60°C) Agarose (NMA) versehen, um die Haftung der nachfolgenden Schichten zu verbessern. Als Grundschicht werden 85 µl der 0,5%igen NMA (60°C) aufgetragen und durch Auflegen eines Deckglases verteilt. Eine längere Lagerung ist in einer feuchten Kammer bei 4°C möglich. Die Deckgläser werden vorsichtig entfernt, um die nächste Schicht, die die Zellsuspension enthält, aufzugeben. Dazu werden die Zellpellets mit 75 µl einer 0,7%igen niedrig schmelzenden (37°C) Agarose (LMA) vermischt, aufpipettiert und mit einem Deckglas verteilt. Zur Beschleunigung der Verfestigung der Agarose werden die OT auf eine gekühlte Metallbox gelegt. Nach Abziehen des Deckglases wird als abschließende Schicht 75 µl der 0,7%igen LMA (37°C) aufgetragen und ebenfalls mit einem Deckglas verteilt.

Nach dem Aushärten werden die Deckgläser entfernt und die Präparate mindestens eine Stunde in eine Färbeküvette mit gekühlter Lyselösung (4°C) gestellt. Ein Aufbewahren der Präparate in der Lyselösung ist für mehrere Tage möglich. Anschließend werden die OT dreimal für je fünf Minuten in einer Färbeküvette mit




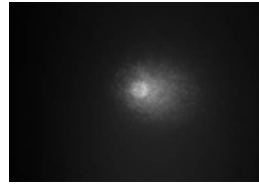
Enzympuffer gewaschen. Zur Detektion Fpg-sensitiver Stellen werden auf die eingebettete DNA 50 µl Enzympuffer mit je 1,5 µg/ml Fpg-Protein (Zugabe erst kurz vor der Inkubation) gegeben, mit einem Deckglas verteilt und 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Auf die OT, bei denen nur auf DNA-Strangbrüche geprüft werden soll, erfolgt die Inkubation mit 50 µl Enzympuffer ohne Fpg-Protein. Anschließend werden die OT, nach Entfernen der Deckgläser, in eine auf Eis gelagerte, horizontale Gelelektrophoresekammer gelegt und mit kaltem Elektrophoresepuffer überschichtet. Nach 20-minütiger Alkali-Denaturierung erfolgt die 20-minütige Elektrophorese bei einer Spannung von 25 V, beziehungsweise einer Feldstärke von 0,8 V/cm. Die Stromstärke wird durch Hinzufügen bzw. Entfernen des Elektrophoresepuffers auf 300 mA eingestellt. Nach der Elektrophorese werden die OT dreimal für je fünf Minuten in einer Küvette mit Neutralisationslösung gewaschen und anschließend mit etwa 30 µl Ethidiumbromid angefärbt. Die Präparate werden bis zur Auszählung in einer dunklen, feuchten Box bei 4°C aufbewahrt. Die Auswertung erfolgt frühestens nach 24 h, um eine vollständige Anfärbung zu gewährleisten.

### **Auswertung**

Die Datenanalyse erfolgt mittels eines Fluoreszenzmikroskopes bei 200-facher Vergrößerung mit einer Anregungswellenlänge von 254 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm.

Die Zellen werden beim „*visual scoring*“ in vier verschiedene Klassen eingeteilt (Kategorien „ungeschädigt“ bis „stark geschädigt“). In Tabelle 5.1 sind die Schadens-Kategorien definiert und bildlich dargestellt. Es werden je Objektträger 100 bis zu 500 Zellkerne bewertet und den jeweiligen Kategorien zugeordnet.

Tabelle 5.1: fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild der Zellkerne und Charakterisierung in Schadens-Kategorien beim *Comet Assay*. Vergrößerung 630-fach.

| <b>Typ 1</b><br>Ungeschädigt  | <b>Typ 2</b><br>Leicht geschädigt   | <b>Typ 3</b><br>Mittel geschädigt  | <b>Typ 4</b><br>Stark geschädigt  |
|---|---|--|---|
| Kern kompakt, klar begrenzt;<br><br>Schweif ist nicht vorhanden                   | Kern ist leicht fragmentiert;<br><br>Schweif beginnt sich auszubilden             | Kern fragmentiert;<br><br>Schweif deutlich erkennbar                               | Kern ist stark fragmentiert, z.T. kaum mehr ausgebildet;<br>Schweif sehr lang, stark ausgeprägt |
|  |  |  |              |

## 5.7 EROD-Assay

Der EROD-Assay nach Donato et al. (1993) wurde modifiziert. Beim EROD-Assay wird das 7-Ethoxyresorufin durch Deethylaseaktivität der MCF-7 Zellen unter NADPH-Verbrauch zu Resorufin deethyliert, welches fluorimetrisch gemessen werden. (Donato et al., 1993).

### Ausstreuen der Zellen

#### Lösungen

**Kulturmedium** (DMEM mit Phenolrot, steroidhaltig)

**Versuchsmedium** (cdFKS haltiges DMEM ohne Phenolrot, steroidfrei)

**PBS-CMF** (1x)

**Trypsin**

#### Durchführung

Die gewünschte Zellzahl wird mit Kulturmedium eingestellt. Versuchsplatten (24-Lochplatten) werden mit 300.000 Zellen pro 500 µl Zellsuspension und well Kontrollplatten mit 30.000 Zellen/500 µl und well ausgestreut und für 48 h in Kulturmedium kultiviert.



### **Vorbehandlung der Zellen mit TCDD**

Das Inkubationsmedium wird mit cdFKS-haltigem, Phenolrot-freiem Versuchsmedium angesetzt. Pro well werden 500 µl Inkubationsmedium pipettiert. Zellen der Lösungs-mittelkontrolle werden für 72 h mit DMSO behandelt. Zur Steigerung der EROD-Aktivität werden die Zellen für 72 h mit TCDD (Endkonzentration 10 nM) behandelt.

### **Inkubation mit EROD-Medium**

#### **Lösungen**

##### **EROD-Medium**

#### **Durchführung**

Das Medium wird aus den wells abgesaugt. Jedes well wird mit 200 µl EROD-Medium beladen und für 6h im Brutschrank inkubiert.

### **Messung der EROD-Umsetzung**

#### **Lösungen**

##### **EtOH** reinst

#### **Durchführung**

Nach genau 6 h Inkubation mit EROD-Medium wird eine Doppelbestimmung von je 75 µl pro well entnommen und in eine 96-Lochplatte überführt. Den wells der 96-Lochplatte werden 200 µl EtOH vorgelegt. Die Messplatte wird 10 min. bei 2800 rpm zentrifugiert. Die anschließende Messung des Resorufins erfolgt bei einer Anregungswellenlänge von 535 nm und einer Emissionswellenlänge von 595 nm.

### **Erstellung der Kalibriergeraden für die Resorufinbestimmung**

#### **Lösungen**

##### **Resorufin-Lösung**

##### **Ethanol** (reinst)

#### **Durchführung**

Die Kalibrierlösungen werden zwischen 0 und 45 nM Resorufin in Ethanol angesetzt. Es werden 200 µl einer jeder Kalibrierlösung als Vierfachbestimmung in eine 96-

Lochplatte pipettiert. Die Mengen an Resorufin entsprechen damit 0 bis 9 pmol/well. Zu den vorgelegten 200  $\mu$ l Kalibrierlösung werden 75  $\mu$ l Versuchsmedium hinzu pipettiert. Die Messplatte wird 10 min. bei 2800 rpm zentrifugiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt bei 535 nm Anregungs- und 595 nm Emissionswellenlänge.

### **Auswertung der Resorufin-Kalibriergeraden**

Die 4 gemessenen Fluoreszenzintensitäten von jeder eingesetzten Kalibrierkonzentration sowie die der Blindwerte werden für sich gemittelt. Dem Mittelwert der Proben wird jeweils der Mittelwert der Blindwerte subtrahiert (MW-BW). Die Kalibriergeraden werden in Excel als Auftragung von MW-BW gegen die Menge Resorufin in pmol/well dargestellt.

## **5.8 Statistik**

Unterschiede zwischen den Behandlungen wurden mit dem Student t-Test für unabhängige Werte statistisch untersucht. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

## 6 Literaturverzeichnis

Adlercreutz, H. (1990). Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, **201**: 3-23.

Altman, S. A., T. H. Zastawny, et al. (1994). tert.-butyl hydroperoxide-mediated DNA base damage in cultured mammalian cells. *Mutat Res*, **306** (1): 35-44.

Angus, W. G., Larsen, M. C., and Jefcoate, C. R. (1999). Expression of CYP1A1 and CYP1B1 depends on cell-specific factors in human breast cancer cell lines: role of estrogen receptor status. *Carcinogenesis*, **20**: 947-955.

Axelson, M., J. Sjovall, et al. (1984). Soya--a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in man and animals. *J Endocrinol*, **102** (1): 49-56.

Ayres, S., W. Abplanalp, et al. (1998). Mechanisms involved in the protective effect of estradiol-17beta on lipid peroxidation and DNA damage. *Am J Physiol* **274**, (6 Pt 1): E1002-8.

Babior, B. M. (1992). The respiratory burst oxidase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **65**: 49-95.

Barber, A. A. and F. Bernheim (1967). Lipid peroxidation: its measurement, occurrence, and significance in animal tissues. *Adv Gerontol Res*, **2**: 355-403

Bingham, S. A., C. Atkinson, et al. (1998). Phyto-oestrogens: where are we now? *Br J Nutr*, **79** (5): 393-406.

Bolton, J. L., Pisha, E., Zhang, F., Qiu, S. (1998). Role of quinoids in estrogen carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*, **11** (10): 1113-1127.

Burdette, J. E., S. N. Chen, et al. (2002). Black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.) protects against menadione-induced DNA damage through scavenging of reactive oxygen species: bioassay-directed isolation and characterization of active principles. *J Agric Food Chem*, **50** (24): 7022-8.

Cavalieri, E. L., D. E. Stack, et al. (1997). Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94** (20): 10937-42.

Cavalieri, E., Frenkel, K., Liehr, J. G., Rogan, E., and Roy, D. (2000). Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 75-93.

Chen, Z. H., H. K. Na, et al. (2005). 4-Hydroxyestradiol induces oxidative stress and apoptosis in human mammary epithelial cells: possible protection by NF-kappaB and ERK/MAPK. *Toxicol Appl Pharmacol*, **208** (1): 46-56.

Creveling, C. R. (2002). Estrogen metabolism: does the formation of estrogen quinone provide a potential pathway to breast carcinogenesis? in Nagatsu et al. (editor): *Catecholamine Research*. 533-536. Kluwer Academic/Plenum.

Davies, K. J. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*, **61**: 1-31.

Devanesan, P., Todorovic, R., Zhao, J., Gross, M.L., Rogan, E.G. (2001). Catechol estrogen conjugates and DNA adducts in the kidney of male Syrian golden hamsters treated with 4-hydroxyestradiol: potential biomarkers for estrogen-initiated cancer. *Carcinogenesis*, **22** (3): 489-497.

Donato, M. T., Gomez-Lechon, M. J., and Castell, J. V. (1993). A microassay for measuring cytochrome P450IA1 and P450IIB1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* **213**, 29-33.

Doostdar, H., Burke, M. D., and Mayer, R. T. (2000). Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology*, **144**: 31-38.

Eastman, A. and M. A. Barry (1992). The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis? *Cancer Invest*, **10** (3): 229-40.

Elia, M. C., R. D. Storer, et al. (1993). Cytotoxicity as measured by trypan blue as a potentially confounding variable in the in vitro alkaline elution/rat hepatocyte assay. *Mutat Res*, **291** (3): 193-205.

Epe, B. (1995). DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **127**: 223-49.

Fischer, W. H., A. Keiwan, et al. (2001). Increased formation of micronuclei after hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells. *Mutagenesis*, **16** (3): 209-12.

Fischer-Nielsen, A., G. B. Corcosan, et al. (1994). Menadione-Induced DNA Fragmentation without 8-Oxo-2'-Deoxyguanosine Formation isolated Rat Hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, **49** (10): 1469-1474.

Fishman, J., Norton, B., (1975) Catechol estrogen formation in the central nervous system of the rat. *Endocrinology*, **96**: 1054-1059

Foti, P., D. Erba, et al. (2005). Comparison between daidzein and genistein antioxidant activity in primary and cancer lymphocytes. *Arch Biochem Biophys*, **433** (2): 421-7.

Gulberg, H. C., and Marsden, C. A. (1975). Catechol-O-methyl transferase: pharmacological aspects and physiological role. *Pharmacol Rev*, **27**: 135-206.

Halliwell, B. (1995). Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis*, **54** (6): 505-10.

Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, **186**: 1-85.

Han, X., Liehr, J. G. (1994). 8-Hydroxylation of guanine bases in kidney and liver DNA hamsters treated with estradiol. Role of free radicals in estrogen-induced carcinogenesis. *Cancer Res* **54**: 5515-5517.

Hayes, C. L., Spink, D. C., Spink, B. C., Cao, J. Q., Walker, N. J., and Sutter, T. R. (1996). 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 9776-9781.

Hu, Y. F., Russo, I. H., Russo, J. (2002). Estrogen and Human Breast Cancer in M. Metzler (editor): *Endocrine Disruptors Part 2 von The Handbook of Environmental Chemistry*. 1-25. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Jefcoate, C. R., Liehr, J. G., Santen, R. J., Sutter, T. R., Yager, J. D., Yue, W., Santner, S. J., Tekmal, R., Demers, L., Pauley, R., Naftolin, F., Mor, G., and Berstein, L. (2000). Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens. *J Natl Cancer Inst Monogr*, **95**: 95-112.

Kirkman, H., (1959). Estrogen-induced tumours of the kidney in the Syrian Hamster. III. Growth characteristics in the Syrian Hamster. *J Natl Cancer Inst Monogr*, **(1)**: 1-57.

Kirsch-Volders, M., A. Elhajouji, et al. (1997). The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res*, **392** (1-2): 19-30.

Klotz, L. O. (2002). Oxidant-induced signalling: effects of peroxynitrite and singlet oxygen. *Biol Chem*, **383** (3-4): 443-456.

Kohlmeier, L., N. Simonsen, et al. (1995). Dietary modifiers of carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, **103** Suppl 8: 177-84.

Kohn, K. W., Erickson, L. C., Ewig, R. A., Friedman, C. A. (1976) Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry*, **15** (21): 4629-37.

Kohn, KW. (1991). Principles and Practice of DNA Filter Elution. *Pharmac. Ther.*, **49**: 55-77

Kohn, KW., Grimek-Ewig, R.A. (1973). Alkaline Elution Analysis, A New Approach to the Study of DNA Single-Strand Interruptions in Cells. *Cancer Research*, **33**: 1849-1853

Kuiper, G. G., J. G. Lemmen, et al. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, **139** (10): 4252-63.

Kulling, S. E. and M. Metzler (1997). Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol. *Food Chem Toxicol*, **35** (6): 605-13.

Kulling, S. E., B. Rosenberg, et al. (1999). The phytoestrogens coumestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch Toxicol*, **73** (1): 50-4.

Lapshina, E. A., I. B. Zavodnik, et al. (2005). Cytotoxic and genotoxic effects of tert-butyl hydroperoxide on Chinese hamster B14 cells. *Mutat Res*, **583** (2): 189-97.

Larsen, M. C., Angus, W. G., Brake, P. B., Eltom, S. E., Sukow, K. A., and Jefcoate, C. R. (1998). Characterization of CYP1B1 and CYP1A1 expression in human mammary epithelial cells: role of the aryl hydrocarbon receptor in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. *Cancer Res*, **58**: 2366-2374.

Lavigne, J. A., Goodman, J. E., Fonong, T., Odwin, S., He, P., Roberts, D. W., 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 Res*, **61**: 7488-7494.

Lazzé, M. C., R. Pizzala, et al. (2003). Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells. *Mutat Res*, **535** (1): 103-15.

Li, K. M., R. Todorovic, et al. (2004). Metabolism and DNA binding studies of 4-hydroxyestradiol and estradiol-3,4-quinone in vitro and in female ACI rat mammary gland in vivo. *Carcinogenesis*, **25** (2): 289-97.

Liehr, J. G., A. M. Ballatore, et al. (1985). Carcinogenicity and metabolic activation of hexestrol. *Chem Biol Interact*, **55** (1-2): 157-76.

Liehr, J. G., and Ricci, M. J. (1996). 4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 3294-3296.

Liehr, J. G., Ricci, M. J., Jefcoate, C. R., Hannigan, E. V., Hokanson, J. A., and Zhu, B. T. (1995). 4-Hydroxylation of estradiol by human uterine myometrium and myoma microsomes: implications for the mechanism of uterine tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**: 9220-9224.

Liehr, J. G., Sirbasku, D. A. (1985) Estrogen-dependent kidney tumours. In: Taub, M. editor. *Tissue culture of epithelial cells*. New York: Plenum Press; 205-234.

Lin, P. H., J. Nakamura, et al. (2003). Aldehydic DNA lesions induced by catechol estrogens in calf thymus DNA. *Carcinogenesis*, **24** (6): 1133-41.

Lindahl, T., (1982): DNA repair enzymes, *Annu. Rev. Biochemistry*, **51**: 61-89

Liu, X., J. Yao, et al. (2002). Oxidative DNA damage induced by equine estrogen metabolites: role of estrogen receptor alpha. *Chem Res Toxicol*, **15** (4): 512-9.

Lundstrom, K., Salminen, M., Jalanko, A., Savolainen, R., and Ulmanen, I. (1991). Cloning and characterization of human placental catechol-O-methyltransferase cDNA. *DNA Cell Biol*, **10** 181-189.

Mahns, A., I. Melchheier, et al. (2003). Irradiation of cells with ultraviolet-A (320-400 nm) in the presence of cell culture medium elicits biological effects due to extracellular generation of hydrogen peroxide. *Free Radic Res*, **37** (4): 391-7

Malvy, C., Lefrançois, M.; Bertrand, J. R., Markovits, J.; (2000). Modified alkaline elution allows the measurement of intact apurinic sites in mammalian genomic DNA. *Biochimie*, **82**: 717-721

Minford, J., Y. Pommier, et al. (1986). Isolation of intercalator-dependent protein-linked DNA strand cleavage activity from cell nuclei and identification as topoisomerase II. *Biochemistry*, **25** (1): 9-16.

Mobley, J. A. and R. W. Brueggemeier (2002). Increasing the DNA damage threshold in breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, **180** (3): 219-26.

Moslen, M. T. (1994). Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. *Adv Exp Med Biol*, **366**: 17-27.

Murata, M., K. Midorikawa, et al. (2004). Genistein and daidzein induce cell proliferation and their metabolites cause oxidative DNA damage in relation to isoflavone-induced cancer of estrogen-sensitive organs. *Biochemistry*, **43** (9): 2569-77.

Muzandu, K., Z. Shaban, et al. (2005). Nitric oxide enhances catechol estrogen-induced oxidative stress in LNCaP cells. *Free Radic Res*, **39** (4): 389-98.

Nandi, S., R. C. Guzman, et al. (1995). Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92** (9): 3650-7.

Ngo, E. O., Sun, T., Chang, J., Wang, C., Chi, K., Cheng, A., Nutter, L. M. (1991). Menadione-induced DNA damage in a human tumor cell line. *Biochem Pharmacol*, **42** (10): 1961-1968.

Nieminen, A. L., A. M. Byrne, et al. (1997). Mitochondrial permeability transition in hepatocytes induced by t-BuOOH: NAD(P)H and reactive oxygen species. *Am J Physiol*, **272** (4 Pt 1): C1286-94.

Niki, E. und Nakano, M., (1990). Estrogens as Antioxidants. *Meth Enzymol*, **186** (34): 330-333.

Pflaum, M., Kielbassa, C., Garmyn, M., Epe, B. (1998b) Oxidative DNA damage induced by visible light in mammalian cells: extent, inhibition by antioxidants and genotoxic effects. *Mutation Research*, **408** (2) 137–46.

Pflaum, M.; Will, O.; Mahler, H.-C.; Epe, B.; (1998a): DNA Oxidation Products Determined with Repair Endonucleases in Mammalian Cells: Types, Basal Levels and Influence of Cell Proliferation; *Free Rad. Res*, **29**: 585-594

Pool-Zobel, B. L., Adlerkreutz, H., Glei, M., Liegibel, U.M., Sittlington, J., Rowland, I., Wähälä, K., Rechkemmer, R. (2000) Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative damage in human colon cells. *Carcinogenesis*, **21**: 1247-1252.

Prall, O. W., E. M. Rogan, et al. (1998). Estrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **65** (1-6): 169-74.

Raffael, A., Nebe, C. Th., Valet, G. (1994) Grundlagen der Durchflusszytometrie. In Schmitz, G. und Rothe, G. (Hrsg.): *Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. 3-49. Schattauer, Stuttgart, New York.

Rajapakse, N., M. Butterworth, et al. (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.

Saelens, X., N. Festjens, et al. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, **23** (16): 2861-74.

Salminen, M., Lundstrom, K., Tilgmann, C., Savolainen, R., Kalkkinen, N., and Ulmanen, I. (1990). Molecular cloning and characterization of rat liver catechol-O-methyltransferase. *Gene*, **93**: 241-247.

Sierens, J., Hartley, J. A., Campbell, M. J., Leathem, A. J. C., Woodside, J. V. (2001). Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. *Mutat Res*, **485**: 169-176.

Sierens, J., J. A. Hartley, et al. (2002). In vitro isoflavone supplementation reduces hydrogen peroxide-induced DNA damage in sperm. *Teratog Carcinog Mutagen*, **22** (3): 227-34.

Sies, H. (1986). Biochemie des oxidativen Stress. *Angew Chem*, **98**: 1061-1075

Speit, G., P. Schutz, et al. (2004). Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol Lett*, **146** (2): 151-8.

Speit, G., S. Haupter, et al. (1999). Comparative evaluation of the genotoxic properties of potassium bromate and potassium superoxide in V79 Chinese hamster cells. *Mutat Res*, **439** (2): 213-21.



Spink, D. C., Hayes, C. L., Young, N. R., Christou, M., Sutter, T. R., Jefcoate, C. R., and Gierthy, J. F. (1994). The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on estrogen metabolism in MCF-7 breast cancer cells: evidence for induction of a novel 17 beta-estradiol 4-hydroxylase. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **51**: 251-258.

Spink, D. C., Katz, B. H., Hussain, M. M., Pentecost, B. T., Cao, Z., and Spink, B. C. (2003). Estrogen regulates Ah responsiveness in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis*, **24**: 1941-1950.

Stopper, H., E. Schmitt, et al. (2003). Increased cell proliferation is associated with genomic instability: elevated micronuclei frequencies in estradiol-treated human ovarian cancer cells. *Mutagenesis*, **18** (3): 243-7.

Stout, D. L., Becker, F. F., (1982). Fluorometric Quantitation of Single-Stranded DNA: A Method Applicable to the Technique of Alkaline Elution. *Analytical Biochemistry*, **127**: 302-307

Tham, D. M., C. D. Gardner, et al. (1998). Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab*, **83** (7): 2223-35.

Wang, M., Liehr, J. G. (1994). Identification of fatty acid peroxidation cofactors in the cytochrome P450-mediated oxidation of estrogens to quinone metabolites. Role and balance of lipid peroxides during estrogen-induced carcinogenesis. *J Biol Chem*, **269**: 284-291.

Ward, W. E., Thompson, L. U. (2001). in M. Metzler (editor): *Endocrine Disruptors Part 1 von The Handbook of Environmental Chemistry*. Ch. 6, p. 101. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Wefers, H. and H. Sies (1986). Reactive oxygen species formed in vitro and in cells: role of thiols (GSH). Model studies with xanthine oxidase and horseradish peroxidase. *Adv Exp Med Biol*, **197**: 505-12.

Weisz, J., Clawson, G. A., and Creveling, C. R. (1998). Biogenesis and inactivation of catecholestrogens. *Adv Pharmacol*, **42**: 828-833.

Weisz, J., Fritz-Wolz, G., Gestl, S., Clawson, G. A., Creveling, C. R., Liehr, J. G., and Dabbs, D. (2000). Nuclear localization of catechol-O-methyltransferase in neoplastic and nonneoplastic mammary epithelial cells. *Am J Pathol*, **156** 1841-1848.

Will, O., Schindler, D., Boiteux, S., Epe, B., (1998). Fanconi's anaemia cells have normal steady state levels and repair of oxidative DNA base modifications sensitive to FPG protein. *Mutat Res*, **409**: 65-72.

Yen, C. H., Hsieh, C. C., Chou, S. Y., Lau, Y. T. (2001). 17 $\beta$ -estradiol inhibits oxidized low density lipoprotein-induced generation of reactive oxygen species in endothelial cells. *Life Sci*, **70**: 403-413.

Zhu, B. T. (2002). Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-mediated methylation metabolism of endogenous bioactive catechols and modulation by endobiotics and xenobiotics: importance in pathophysiology and pathogenesis. *Curr Drug Metab*, **3**: 321-349.

Zhu, B. T., and Conney, A. H. (1998). Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis*, **19**: 1-27.

## 7 Anhang

**Daten zu Abbildung 3.1:** Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht. MCF-7 Zellen wurden, in PBS-G auf einem Eisblock gelagert und mit sichtbarem Licht hoher Intensität (1,5 kJ) für 0, 10, 20 und 30 Minuten bestrahlt (Mittelwerte  $\pm$  Range/2 der Doppelbestimmung eines Versuches).

| Bestrahlungsdauer (min) | Induzierte Fluoreszenzintensität |
|-------------------------|----------------------------------|
| Kontrolle               | 0 $\pm$ 0                        |
| 10                      | 1,7 $\pm$ 0,1                    |
| 20                      | 6,5 $\pm$ 0,1                    |
| 30                      | 12,9 $\pm$ 0,1                   |

**Daten zu Abbildung 3.2:** Bestimmung durch sichtbares Licht induzierter, oxidativer DNA-Schäden in MCF-7 Zellen mittels AFE. Die bestrahlten Zellen wurden in Suspension auf Polycarbonatfilter überführt, dort lysiert und anschließend mit alkalischem Puffer behandelt. Induzierte DNA-Schäden/ $10^6$  Basenpaare nach Bestrahlung von MCF7-Zellen mit sichtbarem Licht (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Bestrahlungsdauer (min) | ALS                   | ESS                   |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Kontrolle               | 0 $\pm$ 0             | 0,35732 $\pm$ 0,31285 |
| 10                      | 0,13766 $\pm$ 0,18778 | 0,77981 $\pm$ 0,51285 |
| 20                      | 0,47424 $\pm$ 0,20911 | 1,09071 $\pm$ 0,18468 |
| 30                      | 0,47015 $\pm$ 0,02634 | 1,22401 $\pm$ 0,19825 |

**Daten zu Abbildung 3.3:** Bestimmung durch sichtbares Licht induzierter, oxidativer DNA-Schäden in V79-Zellen mittels AFE. Die bestrahlten Zellen wurden in Suspension auf Polycarbonatfilter überführt, dort lysiert und anschließend mit alkalischem Puffer behandelt. Induzierte DNA-Schäden/ $10^6$  Basenpaare nach Bestrahlung von V79-Zellen mit sichtbarem Licht (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Bestrahlungsdauer (min) | ALS             | ESS             |
|-------------------------|-----------------|-----------------|
| Kontrolle               | 0 $\pm$ 0       | 0,2 $\pm$ 0,091 |
| 10                      | 0,2 $\pm$ 0,124 | 3,2 $\pm$ 0,254 |
| 20                      | 0,5 $\pm$ 0,195 | 6,1 $\pm$ 1,934 |

**Daten zu Abbildung 3.4:** Bestimmung des DNA-strangbrechenden Potentials von sichtbarem Licht in V79-Zellen mittels comet assay. DNA-Schäden in V79-Zellen nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht. Die Analyse erfolgte mittels comet assay durch Einteilung der Zellen nach Schädigungsgrad der DNA in verschiedene Schadenskategorien (Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Versuchen).

| Bestrahlungsdauer (min) | ALS     |      | ALS +ESS |      | Oxidative DNA-Schäden (%- der Kontrolle) |
|-------------------------|---------|------|----------|------|--|
| Kontrolle               | 105 ±   | 1    | 115 ±    | 0    | 100 ± 1                                  |
| 5                       | 115 ±   | 3    | 155 ±    | 27   | 400 ± 24                                 |
| 10                      | 143 ±   | 4    | 231,5 ±  | 48,5 | 885 ± 52,5                               |
| 20                      | 229,5 ± | 47,5 | 306 ±    | 53   | 765 ± 5,5                                |

**Daten zu Abbildung 3.5:** Durchflußzytometrische Bestimmung der Esteraseaktivität von Kaliumsuperoxid. MCF-7 Zellen wurden für 1 h bei 37°C in Suspension mit KO<sub>2</sub> inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und der intrazelluläre Calcein-Gehalt durchflußzytometrisch bestimmt (Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an KO <sub>2</sub> | Prozentualer Anteil Calcein-positiver Zellen |
|----------------------------------|--|
| 0 µM                             | 100  |
| 1 µM                             | 105,09526 ± 5,92932                          |
| 5 µM                             | 104,11711 ± 6,03048                          |
| 10 µM                            | 105,82146 ± 5,58833                          |
| 25 µM                            | 102,229 ± 4,5482                             |
| 50 µM                            | 104,93865 ± 5,52215                          |
| 75 µM                            | 101,03928 ± 7,50763                          |
| 100 µM                           | 96,76224 ± 7,85624                           |
| 1 mM                             | 89,01763 ± 1,39305                           |
| 2 mM                             | 82,73352 ± 2,83606                           |
| 3 mM                             | 67,96778 ± 2,64717                           |
| 4 mM                             | 29,45323 ± 6,97418                           |
| 6 mM                             | 11,61855 ± 0,53277                           |

**Daten zu Abbildung 3.6:** Durchflußzytometrische Bestimmung des ROS-generierenden Potentials von Kaliumsuperoxid. MCF7-Zellen wurden in Suspension für 1 h gleichzeitig mit DHC AM und KO<sub>2</sub> bei 37°C inkubiert (Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an KO <sub>2</sub> | Induzierte Fluoreszenzintensität |           |
|----------------------------------|----------------------------------|-----------|
| 0 µM                             | 0                                | ± 0       |
| 1 µM                             | -0,28333                         | ± 0,07638 |
| 5 µM                             | -0,5                             | ± 0,17321 |
| 10 µM                            | -0,33333                         | ± 0,05774 |
| 25 µM                            | 0,1                              | ± 0,1     |
| 50 µM                            | 0,33333                          | ± 0,30551 |
| 75 µM                            | 0,16667                          | ± 0,49075 |
| 100 µM                           | 0,26667                          | ± 0,78156 |

**Daten zu Abbildung 3.7:** Durchflußzytometrische Bestimmung der Membranintegrität von KO<sub>2</sub>. Zur Beurteilung der Membranintegrität wurden suspendierte MCF-7 Zellen für 1 h bei 37°C in mit KO<sub>2</sub> inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und unmittelbar vor der Messung Propidiumiodid (PI) hinzugefügt (Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an KO <sub>2</sub> | Prozentualer Anteil der Zellpopulation mit geschädigter Zellmembran |
|----------------------------------|---|
| 0 µM                             | 4,59201 ± 1,19766   |
| 1 µM                             | 5,04474 ± 1,64605   |
| 5 µM                             | 3,40764 ± 0,59319   |
| 10 µM                            | 4,39783 ± 1,59993   |
| 25 µM                            | 5,44789 ± 2,16334   |
| 50 µM                            | 5,08477 ± 1,44854   |
| 75 µM                            | 5,07553 ± 1,21336   |
| 100 µM                           | 6,02726 ± 1,65165   |

**Daten zu Abbildung 3.8:** Bestimmung des DNA-strangbrechenden Potentials von Kaliumsuperoxid. MCF-7 BUS127-Zellen wurden in Suspension bei 37°C für 1 h mit KO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Erfassung der ALS und ESS wurden sie anschließend mittels AFE analysiert. Ein Teil der Zellen wurde zur Erfassung oxidativer DNA- Basenmodifikationen mit FPG-Protein behandelt, der andere nur mit Enzympuffer ohne FPG (Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an KO <sub>2</sub> | ALS     |           | ESS     |           |
|----------------------------------|---------|-----------|---------|-----------|
| 0 µM                             | 0       | ± 0       | 0,38157 | ± 0,32676 |
| 10 µM                            | 0,02    | ± 0,06648 | 0,7468  | ± 0,70989 |
| 15 µM                            | 0,01558 | ± 0,03432 | 1,4805  | ± 0,46909 |
| 20 µM                            | 0,18969 | ± 0,123   | 2,17402 | ± 0,16883 |
| 25 µM                            | 0,31143 | ± 0,03351 | 2,32872 | ± 0,04501 |
| 30 µM                            | 0,87285 | ± 0,40839 | 3,4233  | ± 0,73906 |
| 40 µM                            | 1,40321 | ± 0,27278 | 4,71687 | ± 0,67094 |

**Daten zu Abbildung 3.9:** Einfluss von t-BHP auf die Esteraseaktivität der MCF-7 Zellen. MCF-7 Zellen wurden für 1 h bei 37°C in Suspension mit t-BHP inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und der intrazelluläre Calcein-Gehalt durchflußzytometrisch bestimmt. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an t-BHP | Prozentualer Anteil Calcein-positiver Zellen |
|------------------------|--|
| 0 nM                   | 100 $\pm$ 0                                  |
| 100 nM                 | 97,79604 $\pm$ 3,81966                       |
| 1 $\mu$ M              | 99,29104 $\pm$ 5,46352                       |
| 2,5 $\mu$ M            | 95,84319 $\pm$ 1,003                         |
| 5 $\mu$ M              | 93,62774 $\pm$ 7,89976                       |
| 10 $\mu$ M             | 98,87417 $\pm$ 3,28345                       |
| 25 $\mu$ M             | 95,73979 $\pm$ 4,20006                       |
| 50 $\mu$ M             | 93,65792 $\pm$ 6,71657                       |
| 75 $\mu$ M             | 99,51274 $\pm$ 4,75677                       |
| 100 $\mu$ M            | 97,08302 $\pm$ 10,47771                      |
| 250 $\mu$ M            | 97,87735 $\pm$ 26,21338                      |
| 500 $\mu$ M            | 95,57659 $\pm$ 8,77119                       |
| 700 $\mu$ M            | 96,94281 $\pm$ 15,7965                       |

**Daten zu Abbildung 3.10:** Durchflußzytometrische Bestimmung des ROS-generierenden Potentials von tert.-Butylhydroperoxid. Suspensierte MCF7-Zellen wurden für 1 h gleichzeitig mit DHC AM und mit verschiedenen Konzentrationen t-BHP bei 37°C inkubiert (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an t-BHP | Induzierte Fluoreszenzintensität |
|------------------------|----------------------------------|
| 0 $\mu$ M              | 0 $\pm$ 0                        |
| 100 nM                 | -0,05 $\pm$ 0,01414              |
| 1 $\mu$ M              | 0,45 $\pm$ 0,53083               |
| 2,5 $\mu$ M            | 0,5 $\pm$ 0,16162                |
| 5 $\mu$ M              | 0,85 $\pm$ 0,17173               |
| 10 $\mu$ M             | 2,675 $\pm$ 1,24605              |
| 25 $\mu$ M             | 2,65 $\pm$ 0,19193               |
| 50 $\mu$ M             | 3,95 $\pm$ 0,55558               |
| 75 $\mu$ M             | 4,5 $\pm$ 0,14142                |
| 100 $\mu$ M            | 6,82593 $\pm$ 1,87473            |
| 250 $\mu$ M            | 7,87778 $\pm$ 1,55579            |
| 500 $\mu$ M            | 6,47917 $\pm$ 1,26628            |
| 700 $\mu$ M            | 5,89306 $\pm$ 1,27521            |

**Daten zu Abbildung 3.11:** Durchflußzytometrische Bestimmung der Membranintegrität von tert.-Butylhydroperoxid. MCF-7 Zellen wurden für 1 h bei 37°C in Suspension mit KO<sub>2</sub> inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und unmittelbar vor der Messung PI hinzugefügt (Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an t-BHP (µM) | Prozentualer Anteil der Zellpopulation mit geschädigter Zellmembran |            |
|-----------------------------|---|------------|
| 0                           | 100   | ± 0        |
| 1                           | 112,98509   | ± 24,37252 |
| 2                           | 116,81166   | ± 13,4847  |
| 3                           | 126,06731   | ± 8,99617  |
| 4                           | 129,09119   | ± 31,52598 |
| 5                           | 133,94407   | ± 22,18781 |

**Daten zu Abbildung 3.12:** Bestimmung des DNA-strangbrechenden Potentials von tert.-Butylhydroperoxid. MCF7-Zellen wurden in Suspension bei 37°C für 1 h mit t-BHP inkubiert und anschließend zur Erfassung der ALS und ESS mittels AFE analysiert. Ein Teil der Zellen wurde zur Erfassung oxidativer DNA-Basenmodifikationen mit FPG-Protein behandelt, der andere nur mit Enzympuffer ohne FPG.

| Konzentration an t-BHP (µM) | ALS    |        | ESS    |         |
|-----------------------------|--------|--------|--------|---------|
| 0                           | 0      | ± 0    | 0,4649 | ± 0,247 |
| 1                           | 1,7775 | ± 0,78 | 2,6529 | ± 0,85  |
| 2                           | 3,2589 | ± 0,74 | 2,1968 | ± 0,21  |
| 3                           | 5,5096 | ± 0,44 | 2,0909 | ± 0,67  |
| 4                           | 5,5455 | ± 0,87 | 1,6586 | ± 2,48  |
| 5                           | 7,6695 | ± 2,42 | 2,4183 | ± 1,08  |

**Daten zu Abbildung 3.13:** Durchflußzytometrische Bestimmung der Membranintegrität von tert.-Butylhydroperoxid MCF-7 Zellen wurden für 24 h bei 37°C mit t-BHP inkubiert. Nach dem Abtrypsinieren wurde die Suspension für 15 min mit Calcein AM versetzt und unmittelbar vor der Messung PI hinzugefügt. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen mit Membranschäden durchflußzytometrisch bestimmt (Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an t-BHP(µM) | Prozentualer Anteil der Zellpopulation mit geschädigter Zellmembran |      |
|----------------------------|---|------|
| 0                          | 100   | ± 0  |
| 1                          | 136   | ± 34 |
| 2                          | 136   | ± 38 |
| 3                          | 156   | ± 15 |
| 4                          | 216   | ± 32 |
| 5                          | 212   | ± 14 |

**Daten zu Abbildung 3.14:** Bestimmung des DNA-strangbrechenden Potentials von tert.-Butylhydroperoxid. MCF7-Zellen wurden bei 37°C für 24 h mit t-BHP inkubiert und anschließend zur Erfassung der ALS und ESS mittels AFE analysiert (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an t-BHP ( $\mu\text{M}$ ) | ALS    |               | ESS    |               |
|--|--------|---------------|--------|---------------|
| 0  | 0      | $\pm$ 0       | 0,549  | $\pm$ 0,18638 |
| 1  | 0,1134 | $\pm$ 0,03042 | 0,2229 | $\pm$ 0,0522  |
| 2  | 0,1013 | $\pm$ 0,10961 | 0,5408 | $\pm$ 0,15767 |
| 3  | 0,0868 | $\pm$ 0,12119 | 0,3556 | $\pm$ 0,34841 |
| 4  | 0,0553 | $\pm$ 0,02423 | 0,8216 | $\pm$ 0,56516 |
| 5  | 0,1706 | $\pm$ 0,04447 | 0,8093 | $\pm$ 0,51004 |

**Daten zu Abbildung 3.15:** Einfluss von Menadion auf die Esteraseaktivität der Zellen. MCF-7 Zellen wurden für 1 h bei 37°C in Suspension mit Menadion inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und der intrazelluläre Calcein-Gehalt durchflußzytometrisch bestimmt (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an Menadion ( $\mu\text{M}$ ) | Prozentualer Anteil Calcein-positiver Zellen |                |
|---|--|----------------|
| 0   | 100  | $\pm$ 0        |
| 1   | 93,50662                                     | $\pm$ 12,01664 |
| 2,5   | 86,51762                                     | $\pm$ 13,83984 |
| 5   | 86,93572                                     | $\pm$ 9,87064  |
| 7,5   | 82,44244                                     | $\pm$ 10,51117 |
| 10  | 74,22512                                     | $\pm$ 5,58718  |
| 25  | 43,67151                                     | $\pm$ 12,81342 |
| 50  | 33,96944                                     | $\pm$ 2,0704   |

**Daten zu Abbildung 3.16:** Durchflußzytometrische Bestimmung des ROS-generierenden Potentials von Menadion. suspendierte MCF7-Zellen wurden bei 37°C für 1 h gleichzeitig mit DHC AM und Menadion inkubiert. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an Menadion | Induzierte Fluoreszenzintensität |               |
|---------------------------|----------------------------------|---------------|
| 0                         | 100                              | $\pm$ 0       |
| 1                         | 101,86725                        | $\pm$ 7,42442 |
| 2,5                       | 81,5                             | $\pm$ 8,20244 |
| 5                         | 70,46043                         | $\pm$ 6,81182 |
| 7,5                       | 64,75                            | $\pm$ 8,55599 |
| 10                        | 59,97243                         | $\pm$ 5,0687  |
| 25                        | 53,52353                         | $\pm$ 7,71409 |
| 50                        | 44,35816                         | $\pm$ 5,14784 |



**Daten zu Abbildung 3.17:** Durchflußzytometrische Bestimmung der Membranintegrität von Menadion. Zur Beurteilung der Membranintegrität wurden suspendierte MCF-7 Zellen für 1 h bei 37°C mit Menadion inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und unmittelbar vor der Messung PI hinzugefügt (Mittelwerte  $\pm$  Range/2 der Doppelbestimmung eines Versuches).

| Konzentration an Menadion ( $\mu\text{M}$ ) | Prozentualer Anteil der Zellpopulation mit geschädigter Zellmembran |           |
|---|---|-----------|
| 0   | 1,8   | $\pm$ 0,6 |
| 0,5   | 2,8   | $\pm$ 1,1 |
| 1   | 2,4   | $\pm$ 0,5 |
| 2,5   | 2,2   | $\pm$ 1   |
| 5   | 2,2   | $\pm$ 0,1 |
| 10  | 2,7   | $\pm$ 0,5 |
| 25  | 12,4  | $\pm$ 2,4 |

**Daten zu Abbildung 3.18:** Bestimmung des DNA-strangbrechenden Potentials von Menadion. Suspendierte MCF-7 Zellen wurden für 1 h bei 37°C mit Menadion inkubiert und anschließend zur Erfassung der ALS und ESS mittels AFE analysiert (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an Menadion ( $\mu\text{M}$ ) | ALS      |               | ESS     |               |
|---|----------|---------------|---------|---------------|
| 0   | 0        | $\pm$ 0       | 0,39867 | $\pm$ 0,41739 |
| 1   | -0,01367 | $\pm$ 0,04095 | 0,262   | $\pm$ 0,2697  |
| 2   | 0,18918  | $\pm$ 0,19129 | 0,4535  | $\pm$ 0,38979 |
| 3   | 1,06009  | $\pm$ 0,62543 | 2,65667 | $\pm$ 1,11575 |
| 5   | 18,378   | $\pm$ 0       | 2,511   | $\pm$ 0       |

**Daten zu Abbildung 3.19:** Durchflußzytometrische Bestimmung der Esteraseaktivität von 17 $\beta$ -Estradiol. Zur Überprüfung des Einflusses von E2 auf die Esteraseaktivität, wurden MCF-7 Zellen für 1 h bei 37°C in Suspension mit E2 inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und der intrazelluläre Calcein-Gehalt durchflußzytometrisch bestimmt. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an E2 | Prozentualer Anteil Calcein-positiver Zellen |               |
|---------------------|--|---------------|
| 0 nM                | 100  | $\pm$ 0       |
| 1 nM                | 97,43333                                     | $\pm$ 6,15229 |
| 10 nM               | 93,95  | $\pm$ 7,44923 |
| 100 nM              | 96,71667                                     | $\pm$ 6,14408 |
| 1 $\mu\text{M}$     | 96,98333                                     | $\pm$ 5,75931 |
| 10 $\mu\text{M}$    | 97,41666                                     | $\pm$ 4,71526 |
| 100 $\mu\text{M}$   | 97,6   | $\pm$ 9,47924 |

**Daten zu Abbildung 3.20:** Durchflußzytometrische Bestimmung des ROS-generierenden Potentials von 17 $\beta$ -Estradiol. Suspendierte MCF7-Zellen wurden für 1 h gleichzeitig mit DHC AM und E2 bei 37°C inkubiert (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an E2 | Induzierte Fluoreszenzintensität |               |
|---------------------|----------------------------------|---------------|
| 0 pM                | 0                                | $\pm$ 0       |
| 100 pM              | -0,1                             | $\pm$ 0,03485 |
| 1 nM                | -0,16667                         | $\pm$ 0,12583 |
| 10 nM               | -0,13333                         | $\pm$ 0,10408 |
| 100 nM              | -0,35                            | $\pm$ 0,18028 |
| 1 $\mu$ M           | -0,33333                         | $\pm$ 0,07638 |
| 10 $\mu$ M          | -0,35                            | $\pm$ 0,13229 |
| 100 $\mu$ M         | -0,60111                         | $\pm$ 0,07638 |

**Daten zu Abbildung 3.21:** Einfluss von 17 $\beta$ -Estradiol auf t-BHP-induzierte ROS in MCF-7 Zellen. MCF7-Zellen wurden in Suspension für 1 h bei 37°C gleichzeitig mit DHC AM, 50  $\mu$ M t-BHP und E2 inkubiert und im Anschluss durchflußzytometrisch gemessen (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an |            | Induzierte Fluoreszenzintensität |               |
|------------------|------------|----------------------------------|---------------|
| E2               | t-BHP      |                                  |               |
| 0 pM             | 0 $\mu$ M  | 0                                | $\pm$ 0       |
| 0 pM             | 50 $\mu$ M | 3,95                             | $\pm$ 0,555   |
| 100 pM           | 50 $\mu$ M | 3,25                             | $\pm$ 0,50744 |
| 1 nM             | 50 $\mu$ M | 2,05                             | $\pm$ 1,05    |
| 10 nM            | 50 $\mu$ M | 1,96667                          | $\pm$ 0,99289 |
| 100 nM           | 50 $\mu$ M | 1,48333                          | $\pm$ 1,41892 |
| 1 $\mu$ M        | 50 $\mu$ M | 1,75                             | $\pm$ 0,86747 |
| 10 $\mu$ M       | 50 $\mu$ M | 1,48333                          | $\pm$ 1,20035 |
| 100 $\mu$ M      | 50 $\mu$ M | -1,56667                         | $\pm$ 1,60104 |

**Daten zu Abbildung 3.22:** Durchflußzytometrische Bestimmung der Membranintegrität von 17 $\beta$ -Estradiol. Zur Beurteilung der Membranintegrität der Zellen wurden MCF-7 Zellen für 1 h bei 37°C in Suspension mit E2 inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und unmittelbar vor der Messung PI hinzugefügt (Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen  $\pm$  Range/2).

| Konzentration an E2 | Prozentualer Anteil der Zellpopulation mit geschädigter Zellmembran |               |
|---------------------|---|---------------|
| 0 pM                | 3,21938   | $\pm$ 0,29338 |
| 100 pM              | 2,83206   | $\pm$ 0,51877 |
| 1 nM                | 2,81301   | $\pm$ 0,29243 |
| 10 nM               | 2,73012   | $\pm$ 0,26617 |
| 100 nM              | 3,00211   | $\pm$ 0,13569 |
| 1 $\mu$ M           | 2,94032   | $\pm$ 0,33608 |

**Daten zu Abbildung 3.23:** Bestimmung des DNA-strangbrechenden Potentials von 17 $\beta$ -Estradiol in MCF-7 Zellen. Suspendierte MCF-7 BUS127-Zellen wurden bei 37°C für 1 h mit E2 inkubiert und anschließend zur Erfassung der ALS und ESS mittels AFE analysiert (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an E2 | ALS            |         | ESS           |         |
|---------------------|----------------|---------|---------------|---------|
| 0 pM                | --             | --      | 0,39 $\pm$    | 0,24    |
| 100 pM              | -0,02083 $\pm$ | 0,07517 | 0,326 $\pm$   | 0,16453 |
| 1 nM                | -0,02573 $\pm$ | 0,0617  | 0,30566 $\pm$ | 0,12145 |
| 10 nM               | 0,00814 $\pm$  | 0,06529 | 0,29181 $\pm$ | 0,10652 |
| 100 nM              | -0,0326 $\pm$  | 0,08268 | 0,42521 $\pm$ | 0,09599 |
| 1 $\mu$ M           | 0,05148 $\pm$  | 0,05108 | 0,38171 $\pm$ | 0,14002 |

**Daten zu Abbildung 3.24:** Durchflußzytometrische Bestimmung der Esteraseaktivität von Genistein. Zur Überprüfung der Esteraseaktivität wurden MCF-7 Zellen in Suspension für 1 h bei 37°C mit Genistein (GEN) inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und der intrazelluläre Calcein-Gehalt durchflußzytometrisch bestimmt (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 4 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an GEN | Prozentualer Anteil Calcein-positiver Zellen |         |
|----------------------|--|---------|
| 0 nM                 | 100 $\pm$                                    | 0       |
| 1 nM                 | 102,45495 $\pm$                              | 3,19741 |
| 10 nM                | 102,19474 $\pm$                              | 3,70911 |
| 100 nM               | 98,98514 $\pm$                               | 2,65934 |
| 1 $\mu$ M            | 100,86273 $\pm$                              | 4,44641 |
| 10 $\mu$ M           | 96,05635 $\pm$                               | 2,70664 |
| 50 $\mu$ M           | 97,6061 $\pm$                                | 2,465   |
| 100 $\mu$ M          | 98,20131 $\pm$                               | 1,98763 |

**Daten zu Abbildung 3.25:** Durchflußzytometrische Bestimmung des ROS-generierenden Potentials von Genistein. Suspendierte MCF7-Zellen wurden für 1 h bei 37°C gleichzeitig mit DHC AM und GEN inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch gemessen (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 4 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an GEN | Induzierte Fluoreszenzintensität |         |
|----------------------|----------------------------------|---------|
| 0 nM                 | 0 $\pm$                          | 0       |
| 1 nM                 | -0,25 $\pm$                      | 0,12387 |
| 10 nM                | -0,2625 $\pm$                    | 0,09423 |
| 100 nM               | -0,375 $\pm$                     | 0,18252 |
| 1 $\mu$ M            | -0,3625 $\pm$                    | 0,21671 |
| 10 $\mu$ M           | -0,4625 $\pm$                    | 0,13792 |
| 50 $\mu$ M           | -0,9167 $\pm$                    | 0,1     |
| 100 $\mu$ M          | -1,3 $\pm$                       | 0,60663 |

**Daten zu Abbildung 3.26:** Einfluss von Genistein auf t-BHP-induzierte ROS in MCF-7 Zellen. Suspendierte MCF7-Zellen wurden bei 37°C für 1 h gleichzeitig mit DHC AM, 50 µM t-BHP und GEN inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch gemessen (Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an |       | Induzierte Fluoreszenzintensität |
|------------------|-------|----------------------------------|
| GEN              | t-BHP |                                  |
| 0 nM             | 0 µM  | 0 ± 0                            |
| 0 nM             | 50 µM | 3,95 ± 0,555                     |
| 1 nM             | 50 µM | 3,3 ± 0,09241                    |
| 10 nM            | 50 µM | 3,35 ± 0,2843                    |
| 100 nM           | 50 µM | 3,125 ± 0,50852                  |
| 1 µM             | 50 µM | 3,2 ± 0,75208                    |
| 10 µM            | 50 µM | 2,825 ± 0,25891                  |
| 100 µM           | 50 µM | 0,3 ± 0,36377                    |

**Daten zu Abbildung 3.27:** Bestimmung des DNA-strangbrechenden Potentials von Genistein in MCF-7 Zellen. Suspendierte MCF-7 Zellen wurden für 1 h bei 37°C mit GEN inkubiert. Anschließend wurden sie zur Erfassung der ALS und ESS mittels AFE analysiert. Zur Erfassung oxidativer DNA-Schäden wurde ein Teil der Zellen mit FPG-Protein behandelt, der andere nur mit Enzympuffer ohne FPG.

| Konzentration an GEN (µM) | ALS     |           | ESS     |           |
|---------------------------|---------|-----------|---------|-----------|
| 0                         | 0       | ± 0       | 0,3547  | ± 0,132   |
| 10                        | 0,06548 | ± 0,26886 | -0,0066 | ± 0,297   |
| 25                        | 0,317   | ± 0,327   | 0,147   | ± 0,351   |
| 50                        | 0,57274 | ± 0,38438 | 0,76856 | ± 0,52036 |
| 75                        | 1,19009 | ± 0,77388 | 0,0574  | ± 0,577   |
| 100                       | 0,52577 | ± 0,39461 | 0,59965 | ± 0,46217 |

**Daten zu Abbildung 3.28:** Durchflußzytometrische Bestimmung der Esteraseaktivität von Daidzein. Suspendierte MCF-7 Zellen wurden zur Überprüfung der Esteraseaktivität für 1 h bei 37°C mit Daidzein (DAI) inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und der intrazelluläre Calcein-Gehalt durchflußzytometrisch bestimmt (Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an DAI | Prozentualer Anteil Calcein-positiver Zellen |
|----------------------|--|
| 0 nM                 | 100 ± 0                                      |
| 1 nM                 | 95,61374 ± 3,07858                           |
| 10 nM                | 94,50879 ± 2,67684                           |
| 100 nM               | 96,84723 ± 0,85011                           |
| 1 µM                 | 96,03213 ± 2,8118                            |
| 10 µM                | 92,45813 ± 4,55694                           |
| 100 µM               | 94,23908 ± 7,04112                           |

**Daten zu Abbildung 3.29:** Durchflußzytometrische Bestimmung des ROS-generierenden Potentials von Daidzein. MCF7-Zellen wurden in Suspension für 1 h bei 37°C gleichzeitig mit DHC AM und DAI inkubiert und im Anschluss durchflußzytometrisch gemessen (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an DAI |         | Induzierte Fluoreszenzintensität |               |
|----------------------|---------|----------------------------------|---------------|
| 0                    | nM      | 0                                | $\pm$ 0       |
| 1                    | nM      | -0,18333                         | $\pm$ 0,07638 |
| 10                   | nM      | -0,28333                         | $\pm$ 0,02887 |
| 100                  | nM      | -0,38333                         | $\pm$ 0,05774 |
| 1                    | $\mu$ M | -0,41667                         | $\pm$ 0,12583 |
| 10                   | $\mu$ M | -0,56667                         | $\pm$ 0,07638 |
| 100                  | $\mu$ M | -0,6                             | $\pm$ 0,15    |

**Daten zu Abbildung 3.30:** Einfluss von Daidzein auf t-BHP-induzierte ROS in MCF-7 Zellen. MCF7-Zellen wurden bei 37°C für 1 h in Suspension gleichzeitig mit DHC AM, 50  $\mu$ M t-BHP und DAI inkubiert und anschließend durchflußzytometrisch gemessen (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an DAI |         | Konzentration an t-BHP |         | Induzierte Fluoreszenzintensität |               |
|----------------------|---------|------------------------|---------|----------------------------------|---------------|
| 0                    | nM      | 0                      | $\mu$ M | 0                                | $\pm$ 0       |
| 0                    | nM      | 50                     | $\mu$ M | 3,95                             | $\pm$ 0,555   |
| 1                    | nM      | 50                     | $\mu$ M | 3,525                            | $\pm$ 0,79208 |
| 10                   | nM      | 50                     | $\mu$ M | 3,725                            | $\pm$ 0,61894 |
| 100                  | nM      | 50                     | $\mu$ M | 3,4                              | $\pm$ 0,71193 |
| 1                    | $\mu$ M | 50                     | $\mu$ M | 3,425                            | $\pm$ 0,56727 |
| 10                   | $\mu$ M | 50                     | $\mu$ M | 3,825                            | $\pm$ 0,23895 |
| 100                  | $\mu$ M | 50                     | $\mu$ M | 4,3                              | $\pm$ 0,30372 |

**Daten zu Abbildung 3.31:** Bestimmung des DNA-strangbrechenden Potentials von Daidzein in MCF-7 Zellen. MCF-7 BUS127-Zellen wurden in Suspension (660.000 Zellen/ml) bei 37°C für 1 h mit DAI inkubiert. Anschließend wurden sie zur Erfassung der ALS und ESS mittels AFE analysiert (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an DAI ( $\mu$ M) | ALS        |               | ESS     |               |
|---------------------------------|------------|---------------|---------|---------------|
| 0                               | 0          | $\pm$ 0       | 0,4127  | $\pm$ 0,21539 |
| 10                              | -0,0779    | $\pm$ 0,0287  | 0,3723  | $\pm$ 0,26892 |
| 25                              | -8,6292E-4 | $\pm$ 0,0793  | 0,2762  | $\pm$ 0,32557 |
| 50                              | 0,0238     | $\pm$ 0,15585 | 0,29215 | $\pm$ 0,29091 |
| 75                              | -0,00607   | $\pm$ 0,0601  | 0,26311 | $\pm$ 0,3095  |
| 100                             | 0,08986    | $\pm$ 0,20756 | 0,27158 | $\pm$ 0,57008 |

**Daten zu Abbildung 3.32:** Einfluss von Genistein auf die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit E2. MCF7-Zellen wurden in Suspension für 1 h bei 37°C gleichzeitig mit DHC AM, 50 µM GEN und E2 inkubiert und im Anschluss durchflußzytometrisch gemessen (Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an |       | Induzierte Fluoreszenzintensität |
|------------------|-------|----------------------------------|
| E2               | GEN   |                                  |
| 0 nM             | 0 µM  | 0 ± 0                            |
| 0 nM             | 50 µM | -0,9167 ± 0,1                    |
| 1 nM             | 50 µM | -0,98333 ± 0,16022               |
| 10 nM            | 50 µM | -1,1 ± 0,07177                   |
| 100 nM           | 50 µM | -1,11667 ± 0,18504               |
| 1 µM             | 50 µM | -1,16667 ± 0,21324               |
| 10 µM            | 50 µM | -1,18333 ± 0,16055               |
| 100 µM           | 50 µM | -1,76667 ± 0,28559               |
| 100 µM           | 0 µM  | -0,6333 ± 0,12444                |

**Daten zu Abbildung 3.33:** Einfluss von Daidzein auf die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 1-stündige Behandlung mit E2. MCF7-Zellen wurden in Suspension für 1 h bei 37°C gleichzeitig mit DHC AM, 100 µM DAI und E2 inkubiert und im Anschluss durchflußzytometrisch gemessen (Mittelwerte ± Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an |        | Induzierte Fluoreszenzintensität |
|------------------|--------|----------------------------------|
| E2               | DAI    |                                  |
| 0 nM             | 0 µM   | 0 ± 0                            |
| 0 nM             | 100 µM | -0,6 ± 0,15492                   |
| 1 nM             | 100 µM | -0,96667 ± 0,26247               |
| 10 nM            | 100 µM | -0,98333 ± 0,40586               |
| 100 nM           | 100 µM | -1,08333 ± 0,33375               |
| 1 µM             | 100 µM | -1,11667 ± 0,42979               |
| 10 µM            | 100 µM | -1,18333 ± 0,24777               |
| 100 µM           | 100 µM | -2,26667 ± 0,39441               |
| 100 µM           | 0 µM   | -0,6 ± 0,10736                   |

**Daten zu Abbildung 3.34:** Durchflußzytometrische Bestimmung der Esteraseaktivität von 4-Hydroxyestradiol. Um den Einfluss von 4-HO-E2 auf die Esteraseaktivität zu überprüfen, wurden MCF-7 Zellen für 1 h bei 37°C in Suspension mit 4-HO-E2 inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und der intrazelluläre Calcein-Gehalt durchflußzytometrisch bestimmt (Mittelwerte ± Standardabweichung aus 5 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration<br>an 4-HO-E2 | Prozentualer Anteil<br>Calcein-positiver<br>Zellen |
|-----------------------------|--|
| 0 nM                        | 100 ± 0  |
| 1 nM                        | 98,46688 ± 3,23505                                 |
| 10 nM                       | 99,19217 ± 3,48829                                 |
| 100 nM                      | 94,90902 ± 4,69436                                 |
| 1 µM                        | 95,58086 ± 5,00384                                 |
| 2,5 µM                      | 99,7661 ± 6,62165                                  |
| 5 µM                        | 95,98448 ± 5,08326                                 |
| 7,5 µM                      | 72,21983 ± 4,99872                                 |
| 10 µM                       | 66,95026 ± 9,44467                                 |
| 50 µM                       | 12,52719 ± 0,30787                                 |

**Daten zu Abbildung 3.35:** Durchflußzytometrische Bestimmung des ROS-generierenden Potentials von 4-HO-E2. MCF7-Zellen wurden in Suspension für 1 h gleichzeitig mit DHC AM und 4-HO-E2 bei 37°C inkubiert (Mittelwerte ± Standardabweichung aus 5 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration<br>an 4-HO-E2 | Induzierte<br>Fluoreszenzintensität |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| 0 nM                        | 0 ± 0                               |
| 1 nM                        | -0,11667 ± 0,07638                  |
| 10 nM                       | -0,36667 ± 0,22546                  |
| 100 nM                      | -0,41667 ± 0,32532                  |
| 1 µM                        | -0,46571 ± 0,36655                  |
| 2,5 µM                      | -0,605 ± 0,17078                    |
| 5 µM                        | -0,9075 ± 0,16701                   |
| 7,5 µM                      | -1,475 ± 0,20372                    |
| 10 µM                       | -1,93333 ± 0,60059                  |

**Daten zu Abbildung 3.36:** Untersuchung der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in MCF-7 Zellen durch 24-stündige Behandlung mit 4-Hydroxyestradiol. Adhärent wachsende MCF-7 Zellen wurden für 24 h bei 37°C mit 4-HO-E2 behandelt. Nach 24-stündiger Behandlung wurde die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 12 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an 4-HO-E2 | Zellzahl pro Zellkulturflasche |
|--------------------------|--------------------------------|
| 0 $\mu$ M                | 3,74492E6 $\pm$ 870667,39901   |
| 1 $\mu$ M                | 3,79906E6 $\pm$ 631033,64397   |
| 2,5 $\mu$ M              | 3,85144E6 $\pm$ 1,17921E6      |
| 5 $\mu$ M                | 3,89803E6 $\pm$ 763017,20619   |
| 7,5 $\mu$ M              | 3,25671E6 $\pm$ 814096,60392   |
| 10 $\mu$ M               | 2,78433E6 $\pm$ 545065,4395    |
| 15 $\mu$ M               | 2,0566E6 $\pm$ 377439,13417    |
| 20 $\mu$ M               | 1,442E6 $\pm$ 180621,61185     |

**Daten zu Abbildung 3.37:** Durchflußzytometrische Bestimmung der Esteraseaktivität von 4-HO-E2. Zur Überprüfung der Esteraseaktivität wurden MCF-7 Zellen, die für 24 h mit 4-HO-E2 behandelt wurden, für 15 min bei 37°C in Suspension mit Calcein AM inkubiert (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 5 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an 4-HO-E2 | Prozentualer Anteil Calcein-positiver Zellen |
|--------------------------|--|
| 0 $\mu$ M                | 100 $\pm$ 0                                  |
| 1 $\mu$ M                | 93,26214 $\pm$ 7,33106                       |
| 2,5 $\mu$ M              | 89,7734 $\pm$ 3,96381                        |
| 5 $\mu$ M                | 91,08247 $\pm$ 10,7716                       |
| 7,5 $\mu$ M              | 90,48037 $\pm$ 11,7979                       |
| 10 $\mu$ M               | 82,38023 $\pm$ 12,7174                       |
| 15 $\mu$ M               | 66,61959 $\pm$ 9,9831                        |
| 20 $\mu$ M               | 66,70969 $\pm$ 4,20274                       |
| 30 $\mu$ M               | 63,70969 $\pm$ 7,50274                       |
| 30 $\mu$ M               | 38,2572 $\pm$ 1,45256                        |

**Daten zu Abbildung 3.38:** Durchflußzytometrische Bestimmung des ROS-generierenden Potentials von 4-HO-E2. MCF-7 Zellen wurden nach 24-stündiger Behandlung mit 4-HO-E2 1 h in Suspension mit DHC AM inkubiert und die Calcein-Fluoreszenz direkt im Anschluss gemessen (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 5 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an 4-HO-E2 ( $\mu$ M) | Induzierte Fluoreszenzintensität |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| 0                                   | 0 $\pm$ 0                        |
| 1                                   | 0,26 $\pm$ 0,3195                |
| 2,5                                 | 0,02875 $\pm$ 0,25587            |
| 5                                   | -0,06667 $\pm$ 0,32408           |
| 7,5                                 | 0,01667 $\pm$ 0,50361            |
| 10                                  | -0,68 $\pm$ 0,73856              |
| 15                                  | -2,65 $\pm$ 1,74069              |



**Daten zu Abbildung 3.39:** Durchflußzytometrische Bestimmung der Membranintegrität von 4-HO-E2. Um die Membranintegrität zu überprüfen, wurden MCF-7 Zellen für 1 h bei 37°C in Suspension mit 4-HO-E2 inkubiert. 15 min vor Inkubationsende wurde die Suspension mit Calcein AM versetzt und unmittelbar vor der Messung PI hinzugefügt (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 5 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an 4-HO-E2 ( $\mu$ M) | Prozentualer Anteil der Zellpopulation mit geschädigter Zellmembran |
|-------------------------------------|---|
| 0                                   | 2,54213 $\pm$ 0,46587   |
| 1                                   | 3,36434 $\pm$ 1,0104  |
| 2,5                                 | 2,94505 $\pm$ 0,58665   |
| 5                                   | 3,73311 $\pm$ 0,52446   |
| 7,5                                 | 5,16928 $\pm$ 0,91345   |
| 10                                  | 5,91943 $\pm$ 0,87123   |

**Daten zu Abbildung 3.40:** Die Viabilität der Zellen wurde fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension auf Objektträger zentrifugiert und mit PI und dem membranpermeablen DNA-Farbstoff Hoechst 33258 blau angefärbt (Zellkerne) (Mittelwerte  $\pm$  Range/2 der Doppelbestimmung eines Versuches).

| Konzentration an 4-HO-E2 | prozentualen Anteil der Zellen mit geschädigter Zellmembran<br>Fluoreszenzmikroskopische Erfassung |
|--------------------------|--|
| 0 $\mu$ M                | 4 $\pm$ 0,9  |
| 10 $\mu$ M               | 16 $\pm$ 2,3   |
| 50 $\mu$ M               | 31 $\pm$ 4,3   |

**Daten zu Abbildung 3.41:** Bestimmung des DNA-strangbrechenden Potentials von 4-Hydroxyestradol. MCF-7 BUS127-Zellen wurden in Suspension (660.000 Zellen/ml) bei 37°C für 1 h mit 4-HO-E2 inkubiert. Anschließend wurden sie zur Erfassung der ALS und ESS mittels AFE analysiert. Zur Erfassung oxidativer DNA-Schäden wurde ein Teil der Zellen mit FPG-Protein behandelt, der andere nur mit Enzypuffer ohne FPG (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an 4-HO-E2 | ALS     |       |         | ESS     |       |         |
|--------------------------|---------|-------|---------|---------|-------|---------|
| 0 nM                     | 0       | $\pm$ | 0       | 0,37    | $\pm$ | 0,17    |
| 1 nM                     | -0,013  | $\pm$ | 0       | 0,19171 | $\pm$ | 0       |
| 10 nM                    | 0,0855  | $\pm$ | 0,08096 | 0,063   | $\pm$ | 0,11076 |
| 100 nM                   | 0,0227  | $\pm$ | 0,05443 | 0,23197 | $\pm$ | 0,15812 |
| 1 $\mu$ M                | -0,0147 | $\pm$ | 0,00874 | 0,21745 | $\pm$ | 0,0134  |
| 10 $\mu$ M               | -0,0012 | $\pm$ | 0,19351 | 0,3904  | $\pm$ | 0,38037 |
| 15 $\mu$ M               | -0,0154 | $\pm$ | 0       | 0,66807 | $\pm$ | 0       |
| 20 $\mu$ M               | 0,0821  | $\pm$ | 0       | 0,16145 | $\pm$ | 0       |
| 25 $\mu$ M               | 0,08579 | $\pm$ | 0,35436 | 0,80201 | $\pm$ | 0,72097 |
| 50 $\mu$ M               | 0,59213 | $\pm$ | 0,96481 | 1,00541 | $\pm$ | 0,80598 |
| 75 $\mu$ M               | 1,24204 | $\pm$ | 1,22823 | 1,2644  | $\pm$ | 0,42605 |
| 100 $\mu$ M              | 1,95723 | $\pm$ | 0,7466  | 2,29462 | $\pm$ | 0,06309 |

**Daten zu Abbildung 3.42:** Durchflußzytometrische Bestimmung der Membranintegrität von 4-Hydroxyestradiol. Um die Membranintegrität 24-stündig mit 4-HO-E2 behandelter MCF-7 Zellen zu überprüfen, wurde ein Aliquot der Suspension für 15 min bei 37°C mit Calcein AM inkubiert. und unmittelbar vor der Messung am Durchflußzytometer mit PI versetzt (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 5 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an 4-HO-E2 | Prozentualer Anteil der Zellpopulation mit geschädigter Zellmembran |
|--------------------------|---|
| 0 $\mu$ M                | 2,43 $\pm$ 1,1  |
| 1 $\mu$ M                | 3,12 $\pm$ 1,33   |
| 2.5 $\mu$ M              | 2,92 $\pm$ 1  |
| 5 $\mu$ M                | 3,15 $\pm$ 0,7  |
| 7.5 $\mu$ M              | 3,27 $\pm$ 1,36   |
| 10 $\mu$ M               | 3,58 $\pm$ 0,58   |
| 15 $\mu$ M               | 6,23 $\pm$ 2,7  |
| 20 $\mu$ M               | 8,31 $\pm$ 1  |
| 30 $\mu$ M               | 18,8 $\pm$ 1,82   |
| 30 $\mu$ M (Überstand)   | 87,41 $\pm$ 0,77  |

**Daten zu Abbildung 3.43:** Bestimmung des DNA-strangbrechenden Potentials von 4-Hydroxyestradiol. Aus derselben Suspension 24-stündig behandelte MCF-7 Zellen, deren Membranintegrität in parallelen Versuchen untersucht wurde (Kapitel 3.1.4.1), wurden jeweils 1 Mio Zellen zur Bestimmung der ALS und ESS in der AFE verwendet. Zur Überprüfung des Systems wurden stets mit 40  $\mu$ M  $KO_2$  behandelte MCF-7 Zellen als Positivkontrolle mitgeführt (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 12 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an 4-HO-E2 | ALS      |               | ESS     |               |
|--------------------------|----------|---------------|---------|---------------|
| 0 $\mu$ M                | 0        | $\pm$ 0       | 0,31368 | $\pm$ 0,01924 |
| 5 $\mu$ M                | 0,02438  | $\pm$ 0,03918 | 0,05438 | $\pm$ 0,02973 |
| 10 $\mu$ M               | 0,06714  | $\pm$ 0,02692 | 0,39483 | $\pm$ 0,18654 |
| 40 $\mu$ M $KO_2$        | -0,03448 | $\pm$ 0,01965 | 0,2466  | $\pm$ 0,25502 |

**Daten zu Abbildung 3.44:** Bestimmung der Zellzahl nach Behandlung mit 4-Hydroxyestradiol. MCF-7 Zellen wurden für 4 h bei 37°C mit 4-HO-E2 inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen abtrypsiniert und zur Bestimmung der Zellzahl in Medium resuspendiert (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 Bestimmungen aus 2 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an 4-HO-E2 | Prozentualer Anteil der Zellpopulation mit geschädigter Zellmembran |
|--------------------------|---|
| 0 $\mu$ M                | 100 $\pm$ 0   |
| 5 $\mu$ M                | 88,89211 $\pm$ 39,81668   |
| 10 $\mu$ M               | 84,87867 $\pm$ 29,28156   |
| 40 $\mu$ M ( $KO_2$ )    | 89,23948 $\pm$ 15,31119   |

**Daten zu Abbildung 3.45:** Bestimmung des DNA-strangbrechenden Potentials von 4-Hydroxyestradiol. MCF-7 Zellen wurden für 4 h bei 37°C mit 4-HO-E2 inkubiert (Mittelwerte ± Standardabweichung von 3 Bestimmungen aus 2 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an 4-HO-E2 (µM) | ALS     |           | ESS     |           |
|-------------------------------|---------|-----------|---------|-----------|
| 0                             | 0       | ± 0       | 0,39533 | ± 0,24914 |
| 1                             | 0,11182 | ± 0,18112 | 0,4043  | ± 0,24341 |
| 2,5                           | 0,04126 | ± 0,10139 | 0,48554 | ± 0,33334 |
| 5                             | 0,10078 | ± 0,20109 | 0,26869 | ± 0,20783 |
| 7,5                           | 0,04726 | ± 0,09486 | 0,34703 | ± 0,23493 |
| 10                            | 0,19295 | ± 0,0641  | 0,26742 | ± 0,33708 |
| 15                            | 0,16403 | ± 0,07235 | 0,2732  | ± 0,2586  |
| 20                            | 0,25649 | ± 0,00384 | 0,3375  | ± 0,11582 |
| 40 KO <sub>2</sub> (1 h)      | 0,78444 | ± 0,24554 | 4,71666 | ± 2,52471 |
| 40 KO <sub>2</sub> (24 h)     | 0,01724 | ± 0,11298 | 0,25072 | ± 0,19809 |

**Daten zu Abbildung 3.46:** Mikrokerntest in V79-Zellen nach 6-stündiger Behandlung mit 4-Hydroxyestradiol. V79- Zellen wurden für 6 h mit verschiedenen 4-HO-E2-Konzentrationen inkubiert, nach verschiedenen substanzfreien Nachinkubationszeiten fixiert und auf die Induktion von Mikrokerneln hin untersucht (Mittelwerte ± Range/2 der Doppelbestimmung eines Versuches).

| Zeitpunkt | Konzentration an 4-HO-E2 |              |               |      |               |
|-----------|--------------------------|--------------|---------------|------|---------------|
|           | 0 µM                     | 3 µM         | 6 µM          | 9 µM | 12 µM         |
| 0 h       | 4,5 ± 1,5                | 6,25 ± 1,25  | 10 ± 0,5      | 14   | 13,75 ± 0,75  |
| 1 h       | 5,5                      | 10           | 11,5          | 19   | 18,5          |
| 6 h       | 6,5 ± 0,5                | 7,75 ± 0,125 | 14,75 ± 1,625 | 15   | 26,75 ± 2,125 |
| 24 h      | 5,5 ± 0,5                | 11,5 ± 2     | 16,75 ± 2,25  | 38   | 41,5 ± 1      |

**Daten zu Abbildung 3.48:** Anzahl mitotischer und frisch geteilter Zellen/1000 Zellen nach 6-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit 4-HO-E2 (Mittelwerte ± Range/2 der Doppelbestimmung eines Versuches).

| Zeitpunkt | Konzentration an 4-HO-E2 |                   |                  |      |                  |
|-----------|--------------------------|-------------------|------------------|------|------------------|
|           | 0 µM                     | 3 µM              | 6 µM             | 9 µM | 12 µM            |
| 0 h       | 145,5 ± 14,84924         | 124,25 ± 32,17336 | 108,5 ± 42,42641 | 75   | 23,5 ± 4,24264   |
| 1 h       | 104 --                   | 121 --            | 108,5 --         | 82   | 51,5 --          |
| 6 h       | 124,8 ± 14,84924         | 123 ± 26,16295    | 126 ± 13,43503   | 79   | 37,5 ± 3,88909   |
| 24 h      | 127,5 ± 6,36396          | 124,75 ± 22,98097 | 122,5 ± 6,36396  | 70   | 58,75 ± 30,75914 |

**Daten zu Abbildung 3.49:** Induktion von Apoptose nach 6-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit 4-HO-E2 und verschiedenen substanzfreien Nachinkubationszeiten (Mittelwerte  $\pm$  Range/2 der Doppelbestimmung eines Versuches).

| Zeitpunkt | Konzentration an 4-HO-E2 |                 |                 |                 |                   |
|-----------|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
|           | 0 $\mu$ M                | 3 $\mu$ M       | 6 $\mu$ M       | 9 $\mu$ M       | 12 $\mu$ M        |
| 0 h       | 0,25 $\pm$ 0,25          | 0,25 $\pm$ 0,25 | 2 $\pm$ 1       | 3 $\pm$ 3       | 18 $\pm$ 0,5      |
| 1 h       | 0 --                     | 2 --            | 11,5            | 5               | 12,5 --           |
| 6 h       | 0,25 $\pm$ 0,25          | 4,25 $\pm$ 3,75 | 4,5 $\pm$ 0,5   | 4 $\pm$ 4       | 20 $\pm$ 1        |
| 24 h      | 0,5 $\pm$ 0              | 1 $\pm$ 0       | 1,25 $\pm$ 0,75 | 3,75 $\pm$ 3,75 | 31,75 $\pm$ 18,75 |

**Daten zu Abbildung 3.50:** Mikrokerntest in Ishikawa-Zellen nach 72-stündiger Behandlung mit 4-Hydroxyestradol. Ishikawa-Zellen wurden in 24-Lochplatten für 72 h mit 4-HO-E2 inkubiert. Nach dem Abtrypsinieren wurde ein Aliquot der Zellsuspension auf Objektträger aufzentrifugiert, fixiert und auf die Induktion von Mikrokernen hin untersucht (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 4 unabhängigen Versuchen).

| Konzentration an 4-HO-E2 ( $\mu$ M) | Mikrokernelinduktion |
|-------------------------------------|----------------------|
| 0                                   | 5 $\pm$ 2            |
| 1                                   | 7 $\pm$ 2            |
| 5                                   | 7 $\pm$ 0,1          |
| 10                                  | 15 $\pm$ 1           |

**Daten zu Abbildung 3.52:** Überprüfung der CYP-Induktion in MCF-7 Zellen mittels EROD-assay. Bildung von Resorufin in MCF7-Zellen nach Behandlung mit E2 (Tag 7) mit und ohne Vorinkubation mit 10 nM TCDD (Mittelwerte  $\pm$  Range/2 der Doppelbestimmung eines Versuches).

| Konzentration ( $\mu$ M) | EROD-Aktivität          |                            |
|--------------------------|-------------------------|----------------------------|
|                          | DMSO                    | TCDD                       |
| 0                        | 100 $\pm$ 0             | 1604,56969 $\pm$ 692,07013 |
| 10                       | 60,49812 $\pm$ 27,13414 | 1558,7922 $\pm$ 572,44332  |

**Daten zu Abbildung 3.53:** Durchflußzytometrische Bestimmung der Esteraseaktivität von 17 $\beta$ -Estradiol in Cytochrom P450-induzierten MCF-7 Zellen. Zur Überprüfung der Esteraseaktivität wurden MCF-7 Zellen, die mit/ohne 10 nM TCDD, 3  $\mu$ M Ro 41-0960 und 10  $\mu$ M E2 behandelt wurden, für 15 min bei 37°C in Suspension mit Calcein AM inkubiert (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 4 unabhängigen Versuchen).

| Substanz | Calcein positive Zellen |                         |
|----------|-------------------------|-------------------------|
|          | DMSO                    | TCDD                    |
| DMSO     | 100 $\pm$ 0             | 100,72245 $\pm$ 2,12145 |
| E2       | 97,91398 $\pm$ 2,64     | 98,211 $\pm$ 1,85343    |
| Ro       | 100,63441 $\pm$ 2,32    | 101,49052 $\pm$ 1,82037 |
| E2+Ro    | 98,05376 $\pm$ 2,31     | 102,18713 $\pm$ 2,72867 |

**Daten zu Abbildung 3.54:** MCF-7 Zellen wurden nach der Behandlung mit TCDD, E2 und Ro 41-0960 für 1 h in Suspension bei 37°C mit DHC AM inkubiert und die Calcein-Fluoreszenz direkt im Anschluss gemessen (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 unabhängigen Versuchen).

| Substanz | Induzierte Fluoreszenzintensität |               |         |               |
|----------|----------------------------------|---------------|---------|---------------|
|          | DMSO                             |               | TCDD    |               |
| DMSO     | 0                                | $\pm$ 0       | 1,03333 | $\pm$ 0,65211 |
| E2       | -0,78333                         | $\pm$ 0,46099 | 1,48333 | $\pm$ 0,51028 |
| Ro       | -1,53333                         | $\pm$ 0,39479 | 0,75    | $\pm$ 0,64546 |
| E2+Ro    | -1                               | $\pm$ 0,63182 | 0,51667 | $\pm$ 0,29912 |