

## Estragol: Bestimmung von DNA-Addukten in primären Rattenhepatozyten und genotoxisches Potential



Vorgelegt von Ruth Schulte-Hubbert

Fachbereich: Chemie

Fachrichtung: Lebensmittelchemie und Toxikologie

# **Estragol: Bestimmung von DNA-Addukten in primären Rattenhepatozyten und genotoxisches Potential**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern zur Verleihung des  
akademischen Grades “Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte  
Dissertation

D386



vorgelegt von

**Ruth Schulte-Hubbert**

geboren in Kaiserslautern

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 17. Juni 2021



Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2016 bis September 2019 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern in den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dieter Schrenk und Prof. Dr. rer. nat. Elke Richling durchgeführt.

**Prüfungskommission:**

Vorsitzender:	Prof. Dr. rer. nat. Helmut Sitzmann
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dieter Schrenk
2. Berichterstatterin:	Prof. Dr. rer. nat. Elke Richling



## **Inhaltsverzeichnis**

1 Einleitung .....	1
2 Theoretische Grundlagen .....	2
2.1 Phenylpropanoide.....	2
2.1.1 Biosynthese von Phenylpropanoiden .....	4
2.2 Estragol .....	5
2.2.1 Vorkommen und Verwendung von Estragol.....	5
2.2.2 Metabolismus Estragol.....	7
2.2.3 DNA-Addukte/Reaktivität gegenüber DNA.....	10
2.2.4 Toxizität von Estragol in <i>in-vitro</i> -Testsystemen .....	11
2.2.5 Toxizität von Estragol in <i>in-vivo</i> -Versuchen.....	15
2.2.6 Toxikokinetik Estragol.....	23
2.2.7 Aktuelle Risikobewertung .....	24
2.2.8 Vergleich zu anderen Phenylpropanoiden.....	28
2.3 Leber .....	29
2.3.1 Allgemeines Leber .....	29
2.3.2 <i>In-vitro</i> -Testmodelle Leber.....	31
2.4 Fremdstoffmetabolismus.....	33
2.4.1 CYP450 .....	35
2.4.1.1 Einteilung und Vorkommen von CYP450-Enzymen .....	36
2.4.1.2 Katalytischer Zyklus .....	36
2.4.1.3 Beschreibung ausgewählter CYP450-Enzyme .....	37
2.4.2 Alkoholdehydrogenase/Aldehyddehydrogenase.....	38
2.4.3 Sulfotransferasen .....	39
2.4.4 Glutathion-S-Transferase.....	39
2.4.5 UDP-Glucuronosyltransferase .....	40
2.5 Chemische Kanzerogenese .....	40
2.5.1 Schwellenwert.....	42

3	Problemstellung.....	44
4	Ergebnisse.....	45
4.1	Reaktivität von 1'-Acetoxyestragol und ( <i>E</i> )-3'-Acetoxyisoestragol gegenüber DNA-Basen und Synthese der DNA-Addukte <i>N</i> <sup>2</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin und <i>N</i> <sup>6</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin.....	45
4.1.1	Synthesen der reaktiven Vorstufen 1'-Acetoxyestragol und ( <i>E</i> )-3'-Acetoxyisoestragol.....	45
4.1.2	Allgemeines für die Untersuchungen der Reaktivität von 1'-Acetoxyestragol und ( <i>E</i> )-3'-Acetoxyisoestragol mit den DNA-Basen.....	49
4.1.3	Reaktivität von 1'-Acetoxyestragol und ( <i>E</i> )-3'-Acetoxyisoestragol gegenüber 2'-Desoxyguanosin und Synthese von <i>N</i> <sup>2</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin .....	50
4.1.4	Reaktivität von 1'-Acetoxyestragol und ( <i>E</i> )-3'-Acetoxyisoestragol gegenüber 2'-Desoxyadenosin und Synthese von <i>N</i> <sup>6</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-3'-desoxyadenosin.....	53
4.1.5	Reaktivität von 1'-Acetoxyestragol und ( <i>E</i> )-3'-Acetoxyisoestragol gegenüber 2'-Desoxycytidin.....	56
4.1.6	Reaktivität von 1'-Acetoxyestragol und ( <i>E</i> )-3'-Acetoxyisoestragol gegenüber 2'-Desoxythymidin.....	57
4.1.7	Synthese der isotoopenmarkierten Standards <sup>15</sup> N <sub>5</sub> - <i>N</i> <sup>2</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin und <sup>15</sup> N <sub>5</sub> - <i>N</i> <sup>6</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin .....	58
4.2	Entwicklung einer HPLC-ESI-MS/MS-Methode (Sciex QTrap 5500) zur Quantifizierung von E3' <i>N</i> <sup>2</sup> dG und E3' <i>N</i> <sup>6</sup> dA mittels SIVA .....	59
4.3	Bestimmung der Zytotoxizität von Estragol in primären Rattenhepatozyten und verschiedenen Zelllinien.....	62
4.3.1	Bestimmung der Zytotoxizität von Estragol in primären Rattenhepatozyten.....	63
4.3.1.1	Resazurin-Reduktionstest.....	63
4.3.1.2	Lichtmikroskopische Auswertung .....	64
4.3.2	Bestimmung der Zytotoxizität von Estragol in HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen.....	66
4.3.2.1	Resazurin-Reduktionstest.....	66
4.3.2.2	Lichtmikroskopische Auswertung .....	69
4.4	Bestimmung der Genotoxizität von Estragol in HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen .....	72

4.5 Untersuchung der zeit- und konzentrationsabhängigen Bildung von E3'N <sup>2</sup> dG und E3'N <sup>6</sup> dA in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit Estragol.....	73
5 Diskussion .....	77
5.1 Untersuchung der Reaktivität von 1'-Acetoxyestragol und ( <i>E</i> )-3'-Acetoxyisoestragol gegenüber DNA-Basen und Synthese von Standards E3'N <sup>2</sup> dG und E3'N <sup>6</sup> dA sowie der stabilisotopen-markierten Standards <sup>15</sup> N <sub>5</sub> -E3'N <sup>2</sup> dG und <sup>15</sup> N <sub>5</sub> -E3'N <sup>6</sup> dA.....	77
5.2 Entwicklung einer UHPLC-ESI-MS/MS-Methoden zur Quantifizierung von E3'N <sup>2</sup> dG und E3'N <sup>6</sup> dA in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit Estragol mittels SIVA .....	85
5.3 Zytotoxizität von Estragol in primären Rattenhepatozyten und verschiedenen Zelllinien .	86
5.4 Genotoxizität von Estragol in HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen.....	89
5.5 Untersuchung der Bildung von E3'N <sup>2</sup> dG und E3'N <sup>6</sup> dA in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit Estragol.....	91
5.6 Zusammenfassung .....	97
6 Zusammenfassung und Ausblick.....	99
7 Material und Methoden.....	100
7.1 Allgemeines .....	100
7.2 Zellkultur .....	101
7.2.1 Inkubation von Zellen.....	101
7.2.2 HepG2-Zellen .....	102
7.2.3 HepG2-CYP1A2-Zellen .....	103
7.2.4 V79-Zellen.....	105
7.2.5 Primäre Rattenhepatozyten.....	105
7.3 Handling von Zellen.....	107
7.3.1 Auftauen von Zellen.....	107
7.3.2. Kultivierung und Passagieren von Zelllinien .....	108
7.3.3. Einfrieren von Zellen.....	109
7.4 Primäre Rattenhepatozyten.....	110
7.4.1 Isolierung von primären Rattenhepatozyten .....	110
7.4.2 Kultivierung von primären Rattenhepatozyten.....	112
7.5 Resazurin-Reduktionstest.....	112

7.6 Mikrokerntest .....	115
7.7 Chloroform-Phenol-Extraktion .....	118
7.8 Enzymatische DNA-Hydrolyse.....	120
7.9 Analytische Methoden .....	121
7.9.1 HPLC Analytik.....	122
7.9.1.1 Präparative HPLC.....	122
7.9.1.2 Analytische HPLC-HPLC-UV/Vis-Methoden .....	124
7.9.2 HPLC-ESI-MS/MS.....	125
7.9.2.1 Überprüfung der Reaktionsgemische.....	125
7.9.2.2 Quantifizierung der DNA-Addukte.....	127
7.9.2.3 Quantifizierung 2'-Desoxyguanosin-Gehalt.....	129
7.10 Synthesen.....	130
7.10.1 Nomenklatur.....	130
7.10.2 Allgemeine Arbeitstechniken.....	131
7.10.3 Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie .....	131
7.10.4 Aufreinigung von Syntheseprodukten .....	131
7.10.5 Synthese von 1'-Hydroxyestragol.....	132
7.10.6 Synthese von ( <i>E</i> )-3'-Hydroxyisoestragol .....	133
7.10.7 Synthese von 1'-Acetoxyestragol.....	134
7.10.8 Synthese von ( <i>E</i> )-3'-Acetoxyisoestragol.....	135
7.10.9 Synthese von <i>N</i> <sup>2</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin aus 1'-Acetoxyestragol.....	136
7.10.10 Synthese von <i>N</i> <sup>2</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin aus ( <i>E</i> )-3'-Acetoxyisoestragol .....	137
7.10.11 Synthese von <i>N</i> <sup>6</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin aus 1'-Acetoxyestragol....	138
7.10.12 Synthese von <i>N</i> <sup>6</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin aus ( <i>E</i> )-3'-Acetoxyisoestragol .....	139
7.10.13 Synthese von <sup>15</sup> N <sub>5</sub> -E3'N <sup>2</sup> dG aus 1'-Acetoxyestragol.....	140
7.10.14 Synthese von <sup>15</sup> N <sub>5</sub> -E3'N <sup>6</sup> dA aus 1'-Acetoxyestragol.....	141

7.10.15 Untersuchung Reaktivität von 1'-Acetoxyestragol und ( <i>E</i> )-3'-Acetoxyisoestragol mit den DNA-Basen.....	142
8 Literatur .....	143
Lebenslauf .....	152
Publikationen.....	153
Peer-review Artikel:.....	153
Danksagung.....	154
Erklärung.....	156
Anhang.....	157
Inhaltsverzeichnis Anhang.....	157
Inhaltsverzeichnis elektronischer Anhang.....	158
I. Vergleich Zytotoxizität von Estragol in HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h .....	159
II. Zytotoxizität von Estragol in V79-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h bzw. einer Inkubationszeit von 24 h und einer Nachinkubationszeit von 18 h .....	159
III. Zusammenfassung der Werte des Resazurin-Reduktionstest.....	160
IV. I. Einzeldaten der Auszählung des Mikrokerntests .....	161
V. NMRs.....	162
i. 1'-Hydroxyestragol .....	162
ii. ( <i>E</i> )-3'-Hydroxyisoestragol.....	163
iii. 1'-Acetoxyestragol .....	164
iv. ( <i>E</i> )-3'-Acetoxyisoestragol.....	165
v. <i>N</i> <sup>2</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin synthetisiert über 1'-Acetoxyestragol .....	166
vi. <i>N</i> <sup>2</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin synthetisiert über ( <i>E</i> )-3'-Acetoxyisoestragol .....	167
vii. <i>N</i> <sup>6</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin synthetisiert über 1'-Acetoxyestragol.....	168
viii. <i>N</i> <sup>6</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin synthetisiert über ( <i>E</i> )-3'-Acetoxyiso-estragol .....	169

## **Formelverzeichnis/Symbole**

$c$	Stoffmengenkonzentration [mol/l] = [M]
$\delta$	chemische Verschiebung [ppm]
$g$	Erdbeschleunigung ( $\approx 9,81 \text{ m/s}^2$ )
$J$	Kopplungskonstante bei $^1\text{H-NMR}$ [Hz]
$\lambda$	Wellenlänge [nm]
$\lambda_{\text{Ref}}$	Referenzwellenlänge [nm]
$M$	molare Masse [g/mol]
$m/z$	Masse-zu-Ladungsverhältnis
$n$	Stichprobenumfang (Anzahl der unabhängig voneinander durchgeführten Experimente)
$R_f$	Retentionsfaktor bei der Dünnschichtchromatographie
$t_R$	Retentionszeit [min]  Index: UV/Vis entspricht an HPLC-UV/Vis  Index: MS/MS entspricht Messung an HPLC-ESI-MS/MS (QTrap 5500)

## **Einheiten**

%	Prozent
°C	Grad Celsius
d	Tag
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
M	Molarität [mol/l]
min	Minute
mol	Mol
s	Sekunde
V	Volt
$V_{\text{max}}$	maximale apparente Reaktionsgeschwindigkeit [nmol Produkt min <sup>-1</sup> (mg mikrosomales Protein) <sup>-1</sup> ]
Z/ml	Zellen pro Milliliter Kulturmedium

## SI-Präfixe

k	Kilo	$10^3$	Tausend
c	Zenti	$10^{-2}$	Hundertstel
m	Milli	$10^{-3}$	Tausendstel
$\mu$	Mikro	$10^{-6}$	Millionstel
n	Nano	$10^{-9}$	Milliardstel
p	Piko	$10^{-12}$	Billionstel
f	Femto	$10^{-15}$	Billiardstel

## Abkürzungen

Ø	Durchschnitt
$^{15}\text{N}_5\text{-dA}$	$^{15}\text{N}$ -Desoxyadenosin
$^{15}\text{N}_5\text{-dG}$	$^{15}\text{N}_5$ -Desoxyguanosin
$^{15}\text{N}_5\text{-E}3'\text{N}^2\text{dG}$	$^{15}\text{N}_5\text{-N}^2$ -(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin
$^{15}\text{N}_5\text{-E}3'\text{N}^6\text{dA}$	$^{15}\text{N}_5\text{-N}^6$ -(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADI	erlaubte Tagesdosis engl.: <i>acceptable daily intake</i>
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
ALDH	Aldehyddehydrogenase
AOMT	Anol-O-Methyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
B6C3F <sub>1</sub>	1. hybride Filialgeneration des Mäusestamm C57BL/6J (w) und C3H/HeJ (m)
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMDL <sub>10</sub>	engl.: <i>benchmark dose lower confidence</i>
BROD	7-Benzyloxyresorufin-O-dealkylase
BSA	Rinderserumalbumin engl.: <i>bovine serum albumin</i>
C3H/He	Inzucht Mäusestamm
C4H	Zimtsäure-4-hydroxylase
C57BL/6	Inzucht Mäusestamm
CAD	engl.: <i>collisionally activated dissociation</i> (bei Massenspektrometrie)
CADH	Zimtalkohol-Dehydrogenase
CCR	Zimtsäure-CoA-Reduktase
CD-1	Auszucht Mäusestamm
CE	engl.: <i>collision energy</i>
CEP	engl.: <i>collision cell entrance potential</i>

CIP	alkalische Phosphatase
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
COX	Cyclooxygenase
CUR	engl.: <i>curtain gas</i>
CVOMT	Cavicol- <i>O</i> -Methyltransferase
CXP	engl.: <i>cell exit potential</i>
CYP450	Cytochrom P450
d	Dublett (bei NMR-Spektroskopie)
dA	2'-Desoxyadenosin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
dC	2'-Desoxycytidin
dd	Dublett vom Dublett (bei NMR-Spektroskopie)
dG	2'-Desoxyguanosin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	engl.: <i>declustering potential</i>
dt	Dublett vom Triplet (bei NMR-Spektroskopie)
dT	2'-Desoxythymidin
E3'N <sup>2</sup> dG	N <sup>2</sup> -(Isoestracol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin
E3'N <sup>6</sup> dA	N <sup>6</sup> -(Isoestracol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin
E-4-P	Erytrose-4-Phosphat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Em	Emission
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur engl.: <i>European Medicines Agency</i>
EP	engl.: <i>entrance potential</i>
EROD	Ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylase
ESI	Elektrospray-Ionisation
Ex	Extinktion
f	weibliches Geschlecht engl.: <i>female</i> , lat.: <i>feminium</i>
F344	Inzucht-Albino Ratten (Fischer)
FADH	Falvin-Adenin-Dinukleotid
FEMA	engl.: <i>Flavor and Extract Manufacturers Association</i>
FIA	Fließinjektionsanalyse
FKS	fetales Kälberserum
FMNH	Flavinmononukleotid (reduzierte Form)

FMO	flavinabhängige Monooxygenasen
FP	engl.: <i>focusing potential</i>
GRAS	engl.: <i>generally recognized as safe</i>
GS1	engl.: <i>nebulizer gas</i>
GS2	engl.: <i>heater gas</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	bidestilliertes Wasser
HA	Hauptaddukt
HBSS	engl.: Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hg	engl.: <i>high glucose</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>
i. p.	intraperitoneal, in die Bauchhöhle lat.: <i>intra peritoneum</i>
IC <sub>50</sub>	inhibitorische Konzentration 50
IS	engl.: <i>ion spray voltage</i> (bei Massenspektrometrie)
IS	interner Standard
IUPAC	Internationale Union für reine und angewandte Chemie (engl.: <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
kA	keine Angabe
k <sub>cat</sub>	Geschwindigkeitskonstante
KG	Körpergewicht
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LDH	Laktatdehydrogenase
lg	engl.: <i>low glucose</i>
LOD	Nachweisgrenze engl.: <i>limit of detection</i>
LOQ	Bestimmungsgrenze engl.: <i>limit of quantification</i>
m	Multiplett (bei NMR-Spektroskopie)
m	männliches Geschlecht engl.: <i>male</i> , lat.: <i>masculinum</i>
MAO	Monoaminoxidase
MaS	Magensonde
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MMC	Mitomycin C

MN	micrococcale Nuklease
MoE	engl.: <i>Margin of Exposure</i>
MRM	engl.: <i>multiple reaction monitoring</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometer
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MWD	<i>Multi-Wavelength</i> -Detektor
NA	Nebenaddukt
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH/H <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH/H <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NAT	<i>N</i> -Acetyltransferase
nb	nicht bestimmt
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NL	engl.: <i>Neutral Loss</i>
NMR	Kernresonanzspektroskopie engl.: <i>nuclear magnetic resonance</i>
NOAEL	engl.: <i>no observed adverse effect level</i>
ns	nicht signifikant
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PAP	3'-Phosphadenosin-5'-phosphat
PAPS	3'-Phosphadenosin-5'-phosphosulfat
PBBK	physiologisch basiertes biokinetisches Modell engl.: <i>physiologically based biokinetic model</i>
PBPK	physiologisch basiertes pharmakokinetisches Modell engl.: <i>physiologically based pharmacokinetic model</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Lösung
PDE	Phosphodiesterase II
Pen/Strep	Penicillin und Streptomycin
PEP	Phosphoenolpyruvat
PIS	engl.: <i>product ion scan</i>
PoD	engl.: <i>point of departure</i>
PP	Phenylpropanoide
pRH	primäre Rattenhepatozyten
PROD	7-Pentoxyresorufin- <i>O</i> -Depentylierung
qRT-PCR	quantitative Echtzeit polymerase Kettenreaktion engl.: <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>

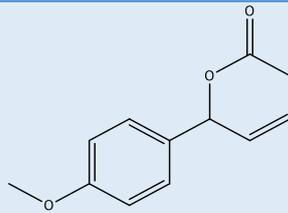
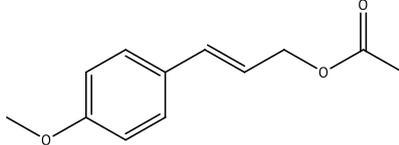
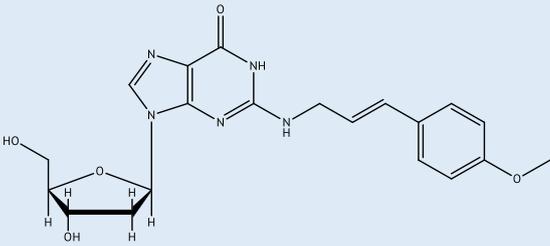
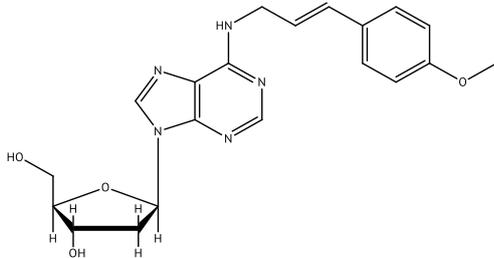
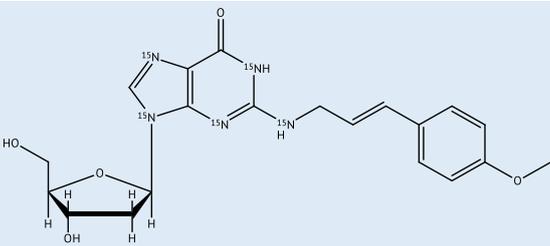
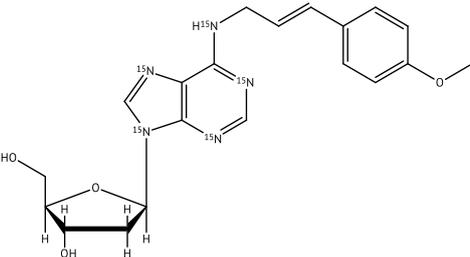
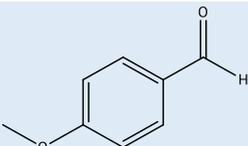
RP	Umkehrphase engl.: <i>reversed phase</i>
s	Singulett (bei NMR-Spektroskopie)
S9	Überstand der Zentrifugation bei 9.000 g engl.: <i>supernatant 9.000</i>
S13	Überstand der Zentrifugation bei 13.000 g engl.: <i>supernatant 13.000</i>
sc	subkutan
SCE	Schwesterchromatidaustausch engl.: <i>sister chromatid exchange</i>
SCF	Wissenschaftlicher Lebensmittelausschuss engl.: <i>Scientific Committee on Food</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl.: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
SIVA	Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse
ST	Salmonella typhimurium
SULT	Sulfotransferasen
SuS	Schlundsonde
t	Triplett (bei NMR-Spektroskopie)
TDI	tolerierbare tägliche Aufnahme engl.: <i>tolerable daily intake</i>
TEM	engl.: <i>ion source temperature</i>
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethane-Hydrochlorid
TTC	engl.: <i>Threshold of Toxicological Concern</i>
UDS	unplanmäßige DNA-Synthese engl.: <i>unscheduled DNA synthesis</i>
UGT	UPD-Glucuronosyltransferase
UHPLC	ultra Hochleistungsflüssigkeitschromatographie engl.: <i>ultra high performance liquid chromatography</i>
UV	Ultraviolett
Vis	sichtbar engl.: <i>visible</i>

## Substanzen

Folgende Tabelle gibt einen Überblick über die, für die in der Arbeit relevanten chemischen Strukturen. Zusätzlich sind häufig in der Literatur verwendeten Trivialnamen mit angegeben. Außerdem ist die Bezugsquelle für die in der Arbeit eingesetzten Chemikalien bzw. Referenzsubstanzen angegeben.

Tabelle 1: Übersicht über wichtige chemische Strukturen

Name	Struktur	Quelle
Estragol (Methylcavicol, <i>p</i> -Allylanisol)		K
Isoestragol (Anethol)		ne
4-Allylphenol ( <i>p</i> -Allylphenol, <i>p</i> -Hydroxyallylbenzen)		ne
1'-Hydroxyestragol		S
( <i>E</i> )-3'-Hydroxyisoestragol (3'-Hydroxyanethol)		S
Estragol-2',3'-epoxid		ne
1'-Oxoestragol		ne
Estragol-2',3'-dihydriol		ne
1'-Hydroxyestragol-2',3'-epoxid		ne
1'-Sulfoxyestragol		ne
1'-Hydroxyestragolglucuronid		ne

Name	Struktur	Quelle
1'-Acetoxyestragol		S
(E)-3'-Acetoxyisoestragol (3'-Acetoxyanethol)		S
N <sup>2</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-2'- desoxyguanosin (E3'N <sup>2</sup> dG; E-3'-N <sup>2</sup> -dG)		S
N <sup>6</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-6'- desoxyadenosin (E3'N <sup>6</sup> dA)		S
<sup>15</sup> N <sub>5</sub> -N <sup>2</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-2'- desoxyguanosin ( <sup>15</sup> N <sub>5</sub> -E3'N <sup>2</sup> dG)		S
<sup>15</sup> N <sub>5</sub> -N <sup>6</sup> -(Isoestragol-3'-yl)-6'- desoxyadenosin ( <sup>15</sup> N <sub>5</sub> -E3'N <sup>6</sup> dA)		S
p-Anisaldehyd		K

K: Kommerziell, ne: nicht als Substanz in dieser Arbeit eingesetzt, S: Synthese

## **Abstract**

Estragole is a secondary plant metabolite, belonging to the group of phenylpropanoids and is a natural constituent in the essential oil of herbs and spices like tarragon, anise or fennel. Due to its natural occurrence in food, estragole is part of the human nutrition. *In vivo* estragole acts as a carcinogen and leads to the development of hepatocellular carcinomas in the liver of rodents. The Ames mutation assay in *Salmonella typhimurium* strain TA100 shows a genotoxic potency for estragole, while the results in other bacteria strains are negative. Different *in-vitro*-studies confirm the genotoxic potency in eukaryotic cells. Because of the genotoxic mode of action and the natural occurrence in food a refine risk assessment for estragole is needed.

The metabolic activation of estragole is attributed to cytochrome-P450-catalyzed hydroxylation to 1'-hydroxyestragole followed by sulfonation to 1'-sulfoxyestragole via sulfotransferases. A spontaneous release of the sulfate group can lead to the formation of a reactive carbeniumion, which can act as a genotoxic carcinogen and can bind to the DNA. Different *in-vivo* and *in-vitro*-studies showed the DNA-adduct formation after treatment with estragole or the reactive metabolite 1'-hydroxyestragole. Using <sup>32</sup>P-postlabeling, three deoxyguanosine-adducts and one deoxyadenosine-adduct were identified. In different studies *N*<sup>2</sup>-(isoestragole-3'-yl)-2'-deoxyguanosin and *N*<sup>6</sup>-(isoestragole-3'-yl)-6'-deoxyadenosin was found to be the main adducts in primary rat hepatocytes.

The aim of this thesis was developing a sensitive method for the quantification of the adducts *N*<sup>2</sup>-(isoestragole-3'-yl)-2'-deoxyguanosin and *N*<sup>6</sup>-(isoestragole-3'-yl)-6'-deoxyadenosin, using an UHPLC-ESI-MS/MS-method and a stable isotope dilution analysis. With this method the DNA-adducts could be detected and quantified in primary rat hepatocytes after incubation with estragole. It was shown that the DNA-adduct formation is time and concentration depended. The highest adduct level was observed after an incubation time of 6 h with a downwards trend for the incubation time of 24 h and 48 h. As the main adduct of estragole *N*<sup>2</sup>-(isoestragole-3'-yl)-2'-deoxyguanosin was detected. Over the whole concentration range a linear concentration-response was observed at all incubation times (1 h, 6 h, 24 h, 48 h). In a concentration range of 0.01–1 µM estragole an indication for a non-linear concentration-response with a possible threshold was observed. Both adducts were quantified after an incubation time of 1 h (at concentrations of *N*<sup>2</sup>-(isoestragole-3'-yl)-2'-deoxyguanosin higher than 1 µM and *N*<sup>6</sup>-(isoestragole-3'-yl)-6'-deoxyadenosin higher than 10 µM), with *N*<sup>2</sup>-(isoestragole-3'-yl)-2'-deoxyguanosin being detectable at all incubation times and concentrations.

In the micronucleus assay no genotoxic potency of estragole in HepG2-cells was found. In HepG2-CYP1A2-cells, which overexpress the enzyme CYP1A2, on the other hand all tested concentrations lead to a significant increase in micronuclei counts. The increase of the micronuclei counts was concentration-dependent, with a 3.2-fold increase at 1 µM estragole and 7.1-fold increase at 300 µM estragole in comparison to the solvent control.

## **Kurzzusammenfassung**

## 1 Einleitung

Estragol gehört zur Gruppe der Phenylpropanoide, bei denen es sich um sekundäre Pflanzenmetaboliten handelt. Estragol ist vor allem im etherischen Öl von Kräutern und Gewürzen zu finden und ist somit Bestandteil der menschlichen Ernährung. In Tierstudien konnte gezeigt werden, dass Estragol ein natürlich vorkommendes Kanzerogen ist und bei Nagern zu hepatozellulären Karzinomen führt. Im Ames-Mutationstest sind Estragol bzw. Phase-I-Metaboliten in den meisten Fällen nicht mutagen, wobei im Stamm TA100 ein mutagenes Potential gezeigt werden konnten. Verschiedene *in-vitro*-Studien in Säugerzellen geben ebenfalls Hinweise auf ein mutagenes Potential von Estragol. Wegen des genotoxischen Wirkmechanismus und dem natürlichen Vorkommen von Estragol in Lebensmitteln ist eine Risikobewertung für Estragol sinnvoll.

Durch 1'-Hydroxylierung über Cytochrom-P450-Enzyme und anschließender Sulfonierung über Sulfotransferasen wird Estragol metabolisch aktiviert. Nach spontaner Abspaltung der Sulfatgruppe entsteht ein ultimates Kanzerogen, welches an die DNA binden kann. Verschiedene *in-vivo*- und *in-vitro*-Studien zeigten die Bildung von DNA-Addukten nach Behandlung mit Estragol bzw. 1'-Hydroxyestragol. Dabei konnten mittels <sup>32</sup>P-Postlabeling drei dG-Addukte und ein dA-Addukt identifiziert werden. In der Literatur wurden *N*<sup>2</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin und *N*<sup>6</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin als Hauptaddukte in primären Rattenhepatozyten (pRH) identifiziert. In verschiedenen Studien wurde in Zelllinien und in der Leber von Versuchstieren vor allem das *N*<sup>2</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin quantifiziert.

In dieser Arbeit konnte eine sensitive Quantifizierungsmethode für die beiden DNA-Addukte *N*<sup>2</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin und *N*<sup>6</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin mittels UHPLC-ESI-MS/MS und Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse entwickelt werden. Mit Hilfe dieser Methode konnten beide Addukte in pRH nach Inkubation mit Estragol quantifiziert werden. Dabei konnte in dieser Arbeit eine konzentrations- und zeitabhängige Bildung beider Addukte gezeigt werden. Zu allen Inkubationszeitpunkten (1 h, 6 h, 24 h und 48 h) wurde über den gesamten Konzentrationsbereich (0,01–300 µM) Estragol eine lineare Konzentrations-Wirkungsbeziehung gezeigt, während für den Konzentrationsbereich von 0,01–1 µM Estragol eine nicht lineare Konzentrations-Wirkungsbeziehung gezeigt werden konnte. Dabei handelte es sich bei *N*<sup>2</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin um das Hauptaddukt. Beide Addukte konnten bereits ab einer Inkubationszeit von 1 h (*N*<sup>2</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin ab 1 µM und *N*<sup>6</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin ab 10 µM) quantifiziert werden.

Die Untersuchung der Genotoxizität mittels Mikrokerntest zeigte in HepG2-Zellen kein genotoxisches Potential im Konzentrationsbereich von 1–300 µM Estragol. In HepG2-CYP1A2-Zellen, die CYP1A2 überexprimieren, zeigte sich ab einer Konzentration von 1 µM ein genotoxischer Effekt, wobei die Mikrokernrate über den kompletten Konzentrationsbereich konzentrationsabhängig ansteigt. Die Erhöhung der Mikrokernrate lag zwischen dem 3,2fachen bei einer Konzentration von 1 µM und dem 7,1fachen bei einer Konzentration von 300 µM im Vergleich zu Lösungsmittelkontrolle.

# 1 EINLEITUNG

---

Phenylpropanoide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die zum Aroma und Geschmack von vielen Gewürzen und Kräutern beitragen. Die Phenylpropanoide sind vor allem im etherisch Öl dieser Pflanzen zu finden. Über Gewürze, Kräuter und Früchte sind sie natürlicher Bestandteil der menschlichen Ernährung. Dabei sind sie toxikologisch relevant. Die allylischen Phenylpropanoide wie Estragol, Methyleugenol und Safrol sind im Tierversuch hepatokanzerogen. Die 1'-propenylischen Phenylpropanoide sind in der Regel nicht oder weniger potent kanzerogen. Eine Ausnahme bilden alpha-Asaron und beta-Asaron. Neben der Position der Doppelbindung spielen auch die weiteren Substituenten des Benzolrings eine entscheidende Rolle für die Toxizität. Der Metabolismus wurde sowohl für allylische als auch 1'-propenylische Phenylpropanoide über mikrosomale Inkubationen aufgeklärt.

Für Estragol konnte nachgewiesen werden, dass es bei Nagern hepatokanzerogen ist. Um als Kanzerogen zu wirken, muss Estragol über eine Cytochrom-P450-katalysierte Oxygenierung an der 1'-Position hydroxyliert werden. 1'-Hydroxyestragol wird anschließend über Sulfotransferasen zu 1'-Sulfoxyestragol sulfoniert. 1'-Sulfoxyestragol ist im wässrigen Milieu instabil und reagiert unter Sulfatabspaltung zu einem reaktiven Carbeniumion, welches als ultimales Kanzerogen wirkt. Das Hauptzielorgan der Toxizität von Estragol ist die Leber.

Die USA und Europa stufen Estragol unterschiedlich ein. Die *Flavor and Extract Manufacturers Association* (FEMA) stuft die über die mit der Nahrung aufgenommene Menge Estragol als nicht relevant für die Kanzerogenität des Menschen ein. Die EFSA dagegen empfiehlt die Aufnahme von Estragol so gering wie möglich zu halten. Außerdem wurden Höchstwerte für Estragol in zusammengesetzten Lebensmitteln festgesetzt.

Für die Risikobewertung ist es wichtig, die Dosis-Wirkungsbeziehung eines Fremdstoffs zu kennen. Daher ist es von großem Interesse die Dosis-Wirkungsbeziehung der Toxizität von Estragol zu untersuchen. Hierbei ist aufgrund des genotoxischen Mechanismus vor allem die DNA-Adduktbildung und Mutagenität von großem Interesse.

## 2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

### 2.1 Phenylpropanoide

Bei Phenylpropanoiden (PP) handelt es sich um sekundäre Pflanzenmetaboliten, die aus einem Benzolring mit einer ungesättigten C<sub>3</sub>-Alkenylseitenkette bestehen. Die Strukturvielfalt der PP beruht zum einen auf der Position der Doppelbindung der C<sub>3</sub>-Seitenkette, zum anderen auf den Substituenten am Benzolring. Je nach Position der Doppelbindung wird in die allylische PP (z. B. Estragol) und 1'-propenylischen PP (z. B. Anethol) unterschieden (siehe Abbildung 1). Typische Substituenten des Benzolrings sind z. B. Hydroxy- oder Methoxygruppen. (Vogt, 2010; Dewick, 2002; Atkinson, 2018; Koeduka et al., 2009; Nath et al., 2019)

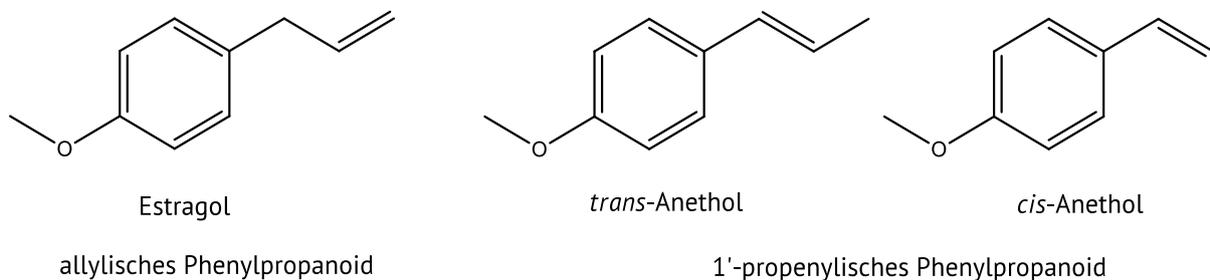


Abbildung 1: Strukturbeispiele für allylische und 1'-propenylische Phenylpropanoide (Koeduka et al., 2009)

PP sind in der Pflanzenwelt weit verbreitet, wobei sie vor allem in den etherischen Ölen von PP-produzierenden Pflanzen zu finden sind. Den Pflanzen dienen PP vermutlich als Schutz gegen oxidativen Stress, sowie gegen verschiedene Pathogene wie z. B. Mikroorganismen. Beispiele für PP-haltige Pflanzen sind Pflanzen der Familien *Apiaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae* und *Rutaceae*. Viele dieser Pflanzen werden als Gewürze zur Aromatisierung von Lebensmitteln und als Tees eingesetzt. Weiterhin werden verschiedene PP-haltige Pflanzen in der traditionellen Medizin verwendet. (Nath et al., 2019)

PP liegen in Pflanzen frei oder glykosidisch gebunden vor und bestimmen das Aroma vieler Gewürze, sowie von Kräutern oder frischen Früchten. Beispielsweise sind hohe Gehalte an Eugenol in Honigmelone zu finden, während das Glykosid von Estragol in Sauerkirschsafft nachgewiesen werden konnte. Estragol ist außerdem eine Schlüsselkomponente im etherischen Öl vieler aromatischer Pflanzen unterschiedlicher Familien. Dazu gehören z. B. Anis (*Pimpinella anisum*; *Apiaceae*), Sternanis (*Illicium verum*; *Magnoliaceae*) Bitterfenchel (*Foeniculum vulgare*; *Apiaceae*) oder Estragon (*Artemisia dracunculus*; *Asteraceae*). (Lewinsohn et al., 2000; Atkinson, 2018)

Viele phenolische Pflanzeninhaltsstoffe sind Derivate der Phenylpropanoide bzw. Phenylpropanoidacetate, weshalb der PP-Stoffwechselweg in Pflanzen eine wichtige Rolle spielt. Dabei sind PP eine Vorstufe für sekundäre Pflanzenmetaboliten wie Flavonoide, Lignin und

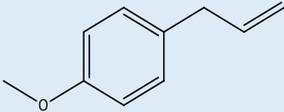
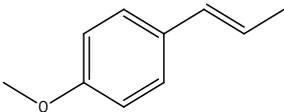
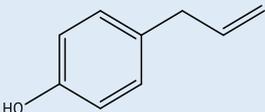
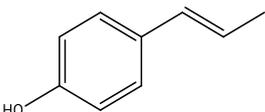
## 2 Theoretische Grundlagen

Lignane. Lignane sind Dimere oder Oligomere von Coniferylalkohol mit anderen Monomeren wie Allylphenolen oder Phenylpropanoiden, die den Pflanzen als Schutz vor Pathogenen oder als Antioxidantien dienen. (Croteau et al., 2000; Winkel, 2004)

Die Toxizität von PP ist zum einen abhängig von der Position der Doppelbindung und zum anderen von den Substituenten am Benzolring. Generell lässt sich der Trend beobachten, dass allylische PP toxischer sind als 1'-propenylische PP. Bei den Substituenten spielt vor allem die Anzahl von Hydroxygruppen und deren Alkylierungen eine Rolle. (Rietjens et al., 2014; Taylor et al., 1964)

Einen Überblick über die Struktur-Wirkungsbeziehung von PP gibt Tabelle 2:

Tabelle 2: Hepatotoxizität, Genotoxizität und Kanzerogenität von PP in Abhängigkeit des Strukturtyps. (Rietjens et al., 2014)

Strukturtyp	Strukturbeispiel	Hepatotoxizität	Genotoxizität	Kanzerogenität
Allylische Alkoxybenzene	<p>Estragol</p> 	positiv	positiv	positiv
Propenylische Alkoxybenzene	<p>Anethol</p> 	positiv	negativ	positiv
Allylische Hydroxybenzene	<p>Chavicol</p> 	negativ	negativ	negativ
Propenylische Hydroxybenzene	<p>Isocavicol</p> 	negativ	negativ	negativ

Allylische Alkoxybenzene werden über Cytochrom-P450-Enzyme (CYP450) zur den 1'-Hydroxymetaboliten metabolisiert. Nach Sulfonierung der 1'-ständigen Hydroxygruppe kommt es zur Bildung eines reaktiven Carbeniumions, welches als ultimales Karzinogen wirkt. Eine Entgiftung des reaktiven 1'-hydroxylierten Metaboliten kann über Oxidation oder Glucuronidierung der Hydroxygruppe erfolgen. 1'-propenylische Alkoxybenzene werden entweder an der Doppelbindung epoxidiert oder an 3'-Position hydroxyliert. Durch die anschließende Oxidation zur Carbonsäure, sowie darauffolgender  $\beta$ -Oxidation und Konjugation findet eine Entgiftung und Exkretion der 1'-propenylischen Alkoxybenzene statt. Der Hauptweg des Metabolismus von allylischen und propenylischen Hydroxybenzenen verläuft über die Konjugation freier Phenolgruppen. (Rietjens et al., 2014)

### **2.1.1 Biosynthese von Phenylpropanoiden**

Der Einstieg in die Biosynthese der PP findet über den Shikimisäureweg statt, welcher nur in Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen zu finden ist. Dabei wird über diesen Pathway aus Erythrose-4-Phosphat und Phosphoenolpyruvat die aromatische Aminosäure L-Phenylalanin gebildet. Weiterhin spielt der Shikimisäureweg eine zentrale Rolle bei der Biosynthese von L-Tyrosin und L-Tryptophan. Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan spielen eine zentrale Rolle im Metabolismus von Pflanzen, wobei Phenylalanin ein wichtiges Substrat für die Biosynthese von Ligninen, Ligananen und Flavonoiden ist. Der Shikimisäureweg ist intrazellulär lokalisiert und die Biosynthese der PP findet in Multienzymkomplexen statt, wodurch Intermediate leichter zu den aktiven Zentren der weiteren Enzyme transportiert werden können. (Vogt, 2010; Dewick, 2002; Winkel, 2004; Koeduka et al., 2008; Fraser und Chapple, 2011; Tzin und Galili, 2010)

Die Biosynthese von PP beginnt mit der, durch das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) katalysierten, Bildung von *trans*-Zimtsäure aus Phenylalanin. Die anschließende Hydroxylierung wird durch Zimtsäure-4-Hydroxylase katalysiert, wobei es sich um eine CYP450-katalysierte Reaktion handelt. Über die Adenosintriphosphat (ATP) abhängige 4-Cumarsäure:CoA Ligase wird aus *p*-Cumarsäure der CoA-Thioester Cumaroyl-CoA gebildet, welches der Startpunkt für die weitere Synthese von PP und anderen sekundären Pflanzenmetaboliten ist. Über die Zimtsäure-CoA-Reduktase werden Cumaroyl-CoA bzw. Cumaroyl-CoA-Derivate in den entsprechenden Aldehyd umgewandelt. Über die NADPH-abhängige Zimtaldehyd-Alkohol-Dehydrogenase werden aus den Aldehyden die entsprechenden Alkohole gebildet. (Fraser und Chapple, 2011) Neben Phenylalanin kann Tyrosin als Vorläufer für die Biosynthese von PP dienen. Dabei wird in einigen Pflanzen Cumarsäure direkt über die Tyrosin-Ammonium-Lyase (TAL) gebildet (Tzin und Galili, 2010). Die wichtigen Reaktionsschritte der Biosynthese von PP sind in Abbildung 2 abgebildet.

Die Modifikation des Aromaten kann an verschiedenen Punkten der PP-Biosynthese erfolgen. Untersuchungen des Phenylpropanoid-*Pathway* in *Arabidopsis* zeigten, dass Cumaroyl-CoA nach einer Veresterung mit Shikimisäure an der 3'-Position des aromatischen Rings hydroxyliert werden kann. Zusätzlich können die Derivate von *p*-Cumarylaldehyd weiter hydroxyliert werden. Die eingeführten Hydroxygruppen können im Verlauf der Biosynthese an verschiedenen Punkten methyliert werden (Fraser und Chapple, 2011). In Bitterfenchel wird z. B. Anol oder Chavicol durch O-Methyltransferasen methyliert, wobei Anethol bzw. Estragol (Methylchavicol) gebildet werden. (Gross et al., 2002)

## 2 Theoretische Grundlagen

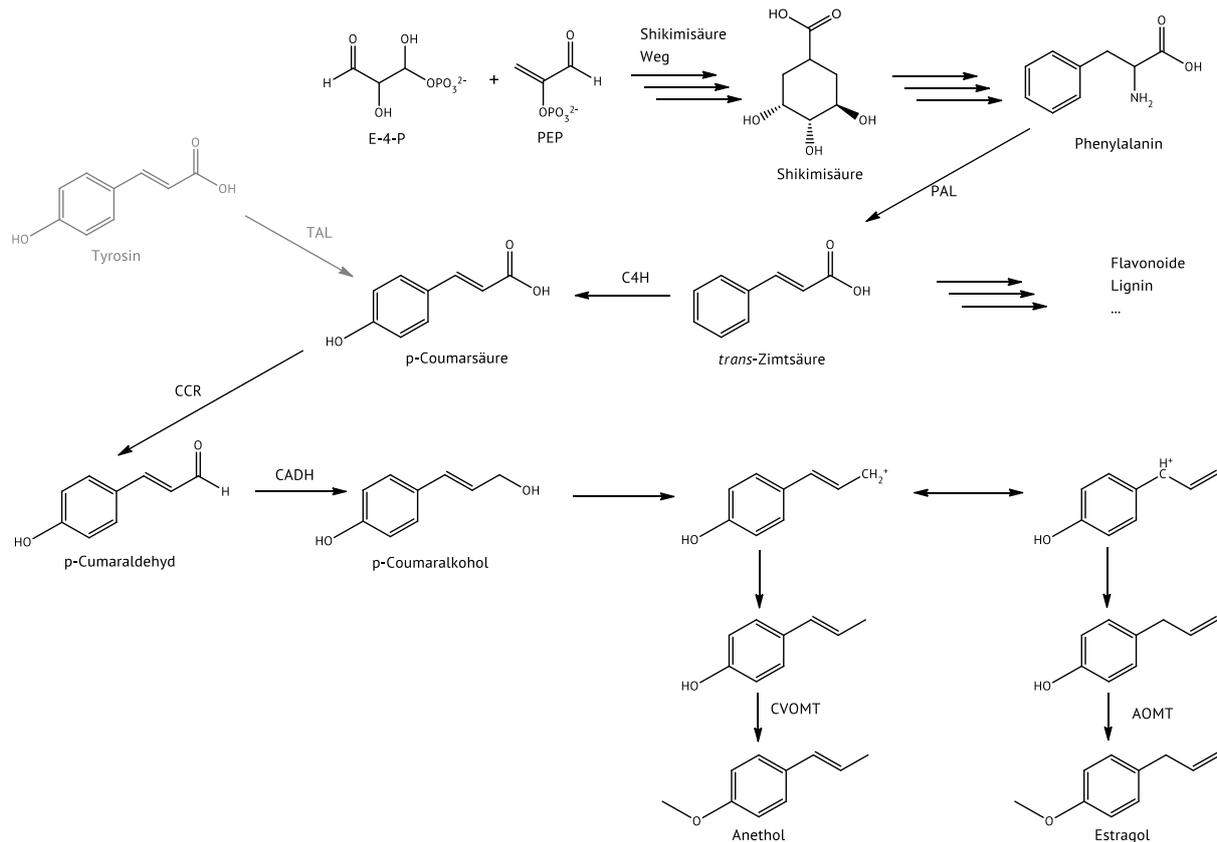


Abbildung 2: Biosynthese von allylischen und 1'-propenylischen PP (E-4-P: Erythrose-4-Phosphat, PEP: Phosphoenolpyruvat, PAL: Phenylalanin-Ammonium-Lyase, TAL: Tyrosin-Ammonium-Lyase, C4H: Zimtsäure-4-hydroxylase, CCR: Zimtsäure-CoA-Reduktase, CADH: Zimtalkohol-Dehydrogenase, CVOMT: Cavicol-O-Methyltransferase, AOMT: Anol-O-Methyltransferase) (Dewick, 2002; Gang et al., 2001; Vogt, 2010; Gross et al., 2002)

## 2.2 Estragol

### 2.2.1 Vorkommen und Verwendung von Estragol

Estragol ist ein natürlicher Bestandteil vieler Gewürzpflanzen, Kräuter und frischer Früchte. Daher ist Estragol im etherischen Öl von Pflanzen sowie pflanzlichen Tees zu finden, wobei Estragol von Pflanzen verschiedener Familien wie *Apiaceae* (z. B. Anis), *Magnoliaceae* (z. B. Sternanis), *Apiaceae* (z. B. Bitterfenchel) und *Asteraceae* (z. B. Estragon) gebildet wird. Die Gehalte von Estragol im etherischen Öl schwanken stark, abhängig von der Pflanze und den Wachstumsbedingungen. Dabei spielen für die Estragolgehalte in Gewürzen und Gewürzpflanzen auch die Erntemethode, der Erntezeitpunkt, die Behandlung der Pflanzen und die Lagerung eine große Rolle (Lewinsohn et al., 2000; Atkinson, 2018; Smith et al., 2002). Auch die Zubereitung beeinflusst den Estragolgehalt im verzehrsfertigen Lebensmittel. So konnte gezeigt werden, dass bei der Zubereitung von Tee aus frischen Fenchelfrüchten der Gehalt an Estragol im fertigen Getränk durch die Zerkleinerung der Früchte stark ansteigt (Mihats et al., 2017). Typische Gehalte an Estragol in verschiedenen Gewürzen und Lebensmitteln sind in Tabelle 3 dargestellt.

## 2 Theoretische Grundlagen

Tabelle 3: Gehalte von Estragol in verschiedenen Lebensmitteln und Gewürzen

Lebensmittel	lat. Bezeichnung	Gehalt	Quelle
Apfel (Gala; frisch)	<i>M. domestica</i>	9–2.016 ng/kg	Atkinson (2018)
Sternanis; essentielles Öl	<i>Illicium verum</i>	5–6 %	SCF (2001)
		0,6–6 %	EMA (2005)
Anis	<i>Pimpinella anisum</i>	0,8–2,3 %	Atkinson (2018)
Fenchel; essentielles Öl	<i>Foeniculum vulgare</i>	3,5–12 %	Villarini et al. (2014)
		5–20 %	SCF (2001)
Estragon; essentielles Öl	kA	60–75 %	SCF (2001)
Basilikum; essentielles Öl	<i>Ocimum basilicum L.</i>	5–85 %	EMA (2005)
	<i>Ocimum basilicum L.</i>	52 %	
	<i>Ocimum nudicaule</i>	98 %	
	<i>Ocimum selloi</i>	51,1 %	
Pesto	kA	Ø 5,26 mg/kg (0,05–19,30 mg/kg)	Siano et al.(2003)
Tomatensoße	kA	Ø 0,81 mg/kg (0,02–2,81 mg/kg)	Siano et al. (2003)
Fencheltee		R 78,0 µg/l–4633,5 µg/l	Mihats et al. (2017)
Frische Früchte		Ø 639 µg/l	
Teebeutel	kA	(104,5 µg/l–4633,5 µg/l)	
		Ø 565 µg/l (78,0 µg/l–1544,1 µg/l)	

Ø: Durchschnitt, kA: keine Angabe, R: Spannweite

Die Verwendung und die Höchstgehalte von Estragol in verarbeiteten Lebensmitteln sind in der Europäischen Union in der Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 geregelt. Danach darf Estragol nach Artikel 6 Absatz 1 in Verbindung mit Anhang III Teil A nicht als solches einem Lebensmittel zugesetzt werden. Nach Artikel 6 Absatz 1 in Verbindung mit Anhang III Teil A der Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 „[...] dürfen die Höchstmengen bestimmter Stoffe, die von Natur aus in Aromen und/oder Lebensmittelzutaten mit Aromaeigenschaften vorkommen, in den in Anhang III Teil B aufgeführten zusammengesetzten Lebensmitteln nicht infolge der Verwendung von Aromen und/oder Lebensmittelzutaten mit Aromaeigenschaften in diesen Lebensmitteln überschritten werden. [...]“. Anhang III Teil B schreibt für Estragol die in Tabelle 4 aufgeführten Höchstmenge vor.

Nach der Verordnung über Tabakerzeugnisse und verwandte Erzeugnisse darf Estragol Tabakerzeugnissen (§ 4 in Verbindung mit Anlage 1) sowie elektronischen Zigaretten und Nachfüllbehältern (§ 28 in Verbindung mit Anlage 2) aufgrund der kanzerogenen Wirkung nicht zugesetzt werden.

## 2 Theoretische Grundlagen

Tabelle 4: Nach Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 (Artikel 6, Absatz 1 in Verbindung mit Anhang III Teil A) vorgeschriebene Höchstgehalte für Estragol in zusammengesetzten Lebensmitteln

Lebensmittel	Höchstmenge [mg/kg]
Milcherzeugnisse	50
verarbeitetes Obst und Gemüse (einschließlich Pilze, Wurzelgemüse, Knollen, Hülsenfrüchte, Leguminosen)	50
verarbeitete Nüsse und Samen	50
Fischerzeugnisse	50
Alkoholische Getränke	10

Die FEMA stufte 1965 Estragol als *generally recognized as safe* (GRAS) ein und erlaubte die Nutzung von Estragol zu Aromatisierung von Lebensmitteln. Nach einer Reevaluierung 1979 wurde der GRAS Status bestätigt. Eine erneute Bewertung 2001 kam zu dem Schluss, dass die in natürlichen Lebensmitteln vorkommenden Gehalte kein Gesundheitsrisiko für den Verbraucher darstellen. (Smith et al., 2002)

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) gab die Empfehlung das Vorkommen von Estragol in Lebensmitteln auf ein Minimum zu reduzieren. In Aufgüssen teeähnlicher Erzeugnisse sollte Estragol nicht nachweisbar sein. Das BfR begründet die Empfehlung damit, dass die karzinogene Wirkung von Estragol für den Menschen nicht ausgeschlossen werden kann und Estragol-haltige Produkte regelmäßig, über einen längeren Zeitraum und in größeren Mengen konsumiert werden. Die Ableitung eines Zahlenwerts für eine tolerierbare Höchstmenge kann auf der zugrundeliegenden Risikobewertung nicht durchgeführt werden. (BgVV, 2000, 2001)

Die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) bewertete das Vorkommen von Estragol in pflanzlichen Medizinprodukten. Die EMA empfiehlt die Aufnahme von Estragol über pflanzliche Medizinprodukte so gering wie möglich zu halten. Zudem sollte bei der Beurteilung pflanzliche Medizinprodukte die Aufnahme von Estragol über Lebensmittel in einem Bereich von 0,5–5 mg/Tag berücksichtigt werden, da diese nicht vermieden werden kann. Deshalb konnte kein exakter Höchstgehalt für Estragol in pflanzlichen Arzneimitteln definiert werden. Es wird empfohlen Estragol-haltige pflanzliche Arzneimittel auf eine kurzzeitige Behandlung von maximal zwei Wochen zu beschränken. Für Schwangere und Stillende sollte die tägliche Aufnahme von Estragol über pflanzliche Arzneimittel von 0,05 mg/Person/Tag und für Kinder von 1,0 µg/kg KG nicht überschreiten. (EMA, 2020)

### **2.2.2 Metabolismus Estragol**

Untersuchungen des mikrosomalen Metabolismus (siehe Abbildung 3) an Mikrosomen aus F344-Ratten und CD-1-Mäusen zeigten, dass Estragol an der 1'-Position zu 1'-Hydroxyestragol und an der Doppelbindung der Seitenkette zu Estragol-2',3'-epoxid metabolisiert wird. Im weiteren Verlauf wird sowohl das Epoxid als auch die 1'-Hydroxyverbindung weiter zu 1'-Hydroxyestragol-2',3'-epoxid oxidiert. Mikrosomale Inkubationen von Estragol-2',3'-epoxid führen zu einer schnellen Hydrolyse des Epoxides zu Estragol-2',3'-dihydrodiol (Swanson et al., 1981). Die

## 2 Theoretische Grundlagen

Metaboliten Estragol-2',3'-epoxid und Estragol-2',3'-dihydrodiol können nach intraperitoneal (i. p.) Gabe von 200 mg Estragol/kg KG im Urin von männlichen Wistar-Ratten nachgewiesen werden. Beide Metaboliten sind auch nach der Inkubation von Lebermikrosomen und Leberzellen detektiert worden. (Delaforge et al., 1980)

Die Bioaktivierung von Estragol erfolgt durch eine CYP450-katalysierte 1'-Hydroxylierung. Das daraus entstehende 1'-Hydroxyestragol, wird durch SULT zu 1'-Sulfoxyestragol sulfoniert. 1'-Sulfoxyestragol ist in wässriger Umgebung instabil, wobei durch spontane Abspaltung der Sulfatgruppe ein reaktives Carbeniumion entsteht, welches mit der DNA oder anderen nucleophilen Zellbestandteilen reagieren kann. 1'-Hydroxyestragol kann außerdem zu 1'-Hydroxyestragolglucuronid glucuronidiert oder zu 1'-Oxoestragol oxidiert werden. Die Glucuronidierung und Oxidation von 1'-Hydroxyestragol werden meist als Detoxifizierung beschrieben. Bei 1'-Oxoestragol handelt es sich allerdings um einen elektrophilen Metaboliten, der *in vivo* ein schwaches Hepatokarzinogen ist. (Punt et al., 2016; Wiseman et al., 1987) Weiterhin zeigt der Metabolit eine Reaktivität gegenüber [<sup>14</sup>C]Guanosin (Phillips et al., 1981).

Die Detoxifizierung von der Muttersubstanz Estragol erfolgt über O-Demethylierung zu 4-Allylphenol, Epoxidierung zu Estragol-2',3'-epoxid oder 3'-Hydroxylierung zu 3'-Hydroxyisoestragol. (Punt et al., 2016; Wiseman et al., 1987) 4-Allylphenol kann, wie die Muttersubstanz epoxidiert werden. 4-Allylphenolepoxid wurde im Urin von Ratten sowie in mikrosomalen Inkubationen nachgewiesen, während das Dihydrodihydroxyallylphenol zusätzlich auch nach der Inkubation von Leberzellen detektiert werden konnte. (Delaforge et al., 1980)

Jeurissen et al. (2007) untersuchten durch Inkubationen von Estragol mit Supersomes welche humanen CYP450-Enzyme an der Bioaktivierung von Estragol zu 1'-Hydroxyestragol beteiligt sind. Die CYP450-Enzyme CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP2E1 waren in der Lage, die Umwandlung von Estragol zu 1'-Hydroxyestragol zu katalysieren. Untersuchungen der Enzymkinetik zeigten, dass CYP2A6 sowohl die höchste Substrataffinität ( $K_m = 0,008 \pm 0,002$  mM) als auch eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit ( $k_{cat} = 2,73 \pm 0,12$  nmol min<sup>-1</sup> nmol(CYP450)<sup>-1</sup>) aufweist. Dadurch zeigte CYP2A6 die höchste Enzymeffizienz. Für CYP1A2 wurde die zweithöchste Enzymeffizienz berechnet, obwohl CYP1A2 mit der Reaktionsgeschwindigkeit von  $k_{cat} = 0,65 \pm 0,03$  nmol min<sup>-1</sup> nmol(CYP450)<sup>-1</sup>, neben der Isoform CYP2E1 ( $k_{cat} = 0,40 \pm 0,02$  nmol min<sup>-1</sup> nmol(CYP450)<sup>-1</sup>), die geringste Reaktionsgeschwindigkeit aufwies. Allerdings zeigt CYP1A2 eine sehr hohe Substrataffinität ( $K_m = 0,011 \pm 0,002$  mM) zu Estragol. (Jeurissen et al., 2007)

Ein Vergleich von Mikrosomen, isoliert aus der Leber, Lunge und Niere von Ratten, zeigt, dass im Überstand der Lebermikrosomen die Metaboliten 4-Allylphenol, 3'-Hydroxyisoestragol, 1'-Hydroxyestragol und Estragol-2',3'-diol nachgewiesen werden konnten. Bei Estragol-2',3'-diol handelte es sich um den mengenmäßig am häufigsten gebildeten Metaboliten, gefolgt von 1'-Hydroxyestragol und 3'-Hydroxyisoestragol. Im Überstand von Mikrosomen aus Lunge und Niere wurden nur 1'-Hydroxyestragol und 4-Allylphenol detektiert (Punt et al., 2008). Inkubationen von humanen Mikrosomen aus Leber, Lunge und Niere zeigten, dass in den Mikrosomen, hergestellt

## 2 Theoretische Grundlagen

aus Lunge und Niere, keine Metabolisierung von Estragol stattfand. In Überständen der Lebermikrosomen wurden 4-Allylphenol, 3'-Hydroxyestragol, 1'-Hydroxyestragol und Estragol-2',3'-diol nachgewiesen. 1'-Hydroxyestragol wurde mit der höchsten katalytischen Effizienz gebildet. (Punt et al., 2009)

Untersuchungen des humanen mikrosomalen Metabolismus von 1'-Hydroxyestragol zeigen, dass 1'-Hydroxyestragol durch UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) glucuronidiert wird. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Isoformen UGT2B7 und UGT1A9 hauptverantwortlich für die Glucuronidierung von 1'-Hydroxyestragol sind. Die Isoform UGT2B15 trägt ebenfalls zu einem geringen Teil zur Entgiftung des Metaboliten bei, während andere Isoformen nicht in der Lage sind 1'-Hydroxyestragol zu glucuronidieren. (Iyer et al., 2003)

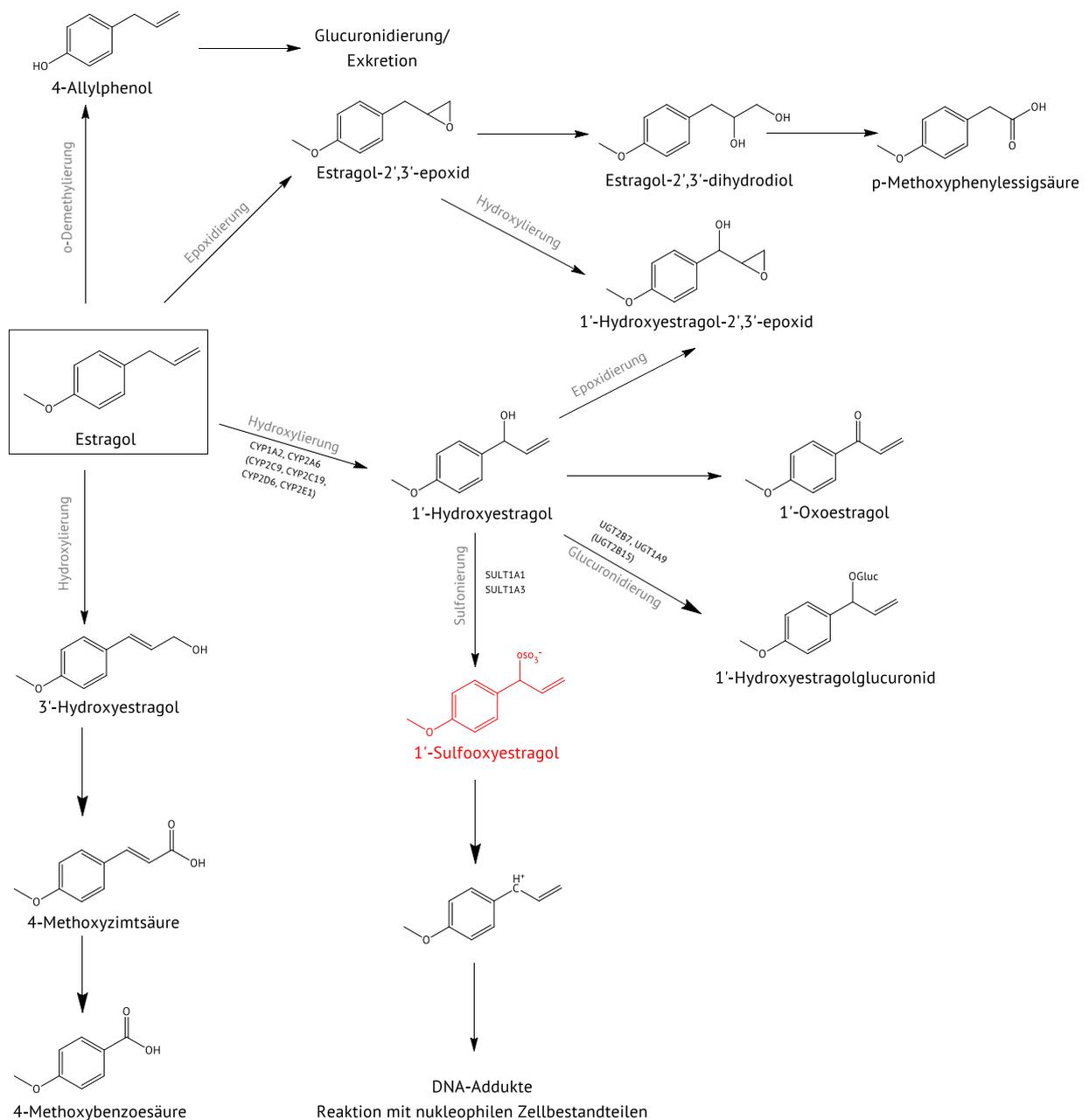


Abbildung 3: Metabolismus von Estragol (Smith et al., 2002; Jeurissen et al., 2007; Punt et al., 2016; Rietjens et al., 2014; Rietjens et al., 2010; Iyer et al., 2003)

## 2 Theoretische Grundlagen

Im Ames-Test zeigte sich ein Anstieg des genotoxischen Potentials von 1'-Hydroxyestragol in Bakterienstämmen, die humane SULT1A3 exprimieren (Oda et al., 2012). *In-vitro*-Untersuchungen an transfizierten Zelllinien geben Hinweise darauf, dass bei Ratten vor allem SULT2B1 an der Sulfonierung von 1'-Hydroxyestragol beteiligt ist (Probert et al., 2016). Studien an transgenen Mäusen weisen darauf hin, dass an der Sulfonierung von 1'-Hydroxyestragol unter anderem SULT1A1 beteiligt ist (Suzuki et al., 2012b).

Studien zur Mutagenität von 1'-Hydroxymethyleugenol zeigen, dass die Sulfonierung vor allem durch SULT1A1 und SULT1C2 katalysiert wird. SULT1A1 ist die am häufigsten vorkommende humane Form, während SULT1C2 nur in wenigen Geweben vorkommt (Herrmann et al., 2012). Aufgrund der ähnlichen Struktur von 1'-Hydroxymethyleugenol und 1'-Hydroxyestragol könnte an der Sulfonierung von 1'-Hydroxyestragol ebenfalls SULT1C2 beteiligt sein.

### **2.2.3 DNA-Addukte/Reaktivität gegenüber DNA**

Bei neutralem pH-Wert zeigen weder Estragol noch 1'-Hydroxyestragol eine Reaktivität gegenüber Guanosin. Nach Inkubation von Guanosin mit Estragol-2',3'-epoxid und 1'-Hydroxyestragol-2',3'-epoxid konnten Hinweise auf die Bildung von verschiedenen Addukten mit Guanosin beobachtet werden. (Swanson et al., 1981)

Phillips et al. (1981) untersuchten die Reaktivität von 1'-Hydroxyestragolderivaten in wässriger Lösung (50 mM Natriumphosphatpuffer, pH-Wert 7), wobei die 1'-Hydroxyestragolderivate in Acetonitril gelöst wurden. 1'-Acetoxyestragol und 1'-Oxoestragol reagiert bei neutralem pH-Wert schnell mit [<sup>14</sup>C]Guanosin. Dabei verursachten ca. 90 % des 1'-Oxoestragols Modifikationen der Base während maximal 25 % des 1'-Acetoxyestragols mit [<sup>14</sup>C]Guanosin reagierte. Die vergleichsweise geringe Reaktivität von 1'-Acetoxyestragol gegenüber der DNA-Base ist auf die geringe Halbwertszeit von 1'-Acetoxyestragol in wässriger Lösung zurückzuführen. Das Derivat 1'-Hydroxyestragol-2',3'-epoxid reagiert dagegen nur sehr langsam mit [<sup>14</sup>C]Guanosin. Die Reaktion von 2'-Desoxyguanosin (dG) mit 1'-Acetoxyestragol führte zu *N*<sup>2</sup>-(*trans*-isoestragol-3'-yl)-desoxyguanosin als Hauptaddukt. Neben dem Hauptaddukt wurden auch das *cis*-Isomer sowie *N*<sup>2</sup>-(*trans*-Estragol-1'-yl)-desoxyguanosin als Nebenaddukte identifiziert. Inkubationen in einer neutralen wässrigen Lösung von 2'-Desoxyadenosin (dA) mit 1'-Acetoxyestragol führte zu dem DNA-Addukt *N*<sup>6</sup>-(*trans*-isoestragol-3'-yl)-desoxyadenosin. Dabei kommt es zu einem Shift der Doppelbindung von der 2'-Position zur 1'-Position. (Phillips et al., 1981) Eine andere Studie bestätigte, dass *N*<sup>2</sup>-(*trans*-isoestragol-3'-yl)-desoxyguanosin das Hauptaddukt bei der Reaktion zwischen dG und 1'-Acetoxyestragol ist. Zusätzlich wurden noch Addukte an der C8-Position sowie der N7-Position der Base identifiziert (Wiseman et al., 1985).

In Inkubationen von 1'-Hydroxyestragol mit S9-Mix (Donor: Ratte, Maus, Mensch) in Anwesenheit von 3'-Phosphadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) und 2'-Desoxyguanosin konnte *N*<sup>2</sup>-(*trans*-isoestragol-3'-yl)-desoxyguanosin als Hauptaddukt identifiziert werden, wobei noch zwei Nebenaddukte gebildet wurden (Punt et al., 2007). Einen Überblick über die in der Literatur identifizierten DNA-Addukte ist in Abbildung 4 gegeben.

## 2 Theoretische Grundlagen

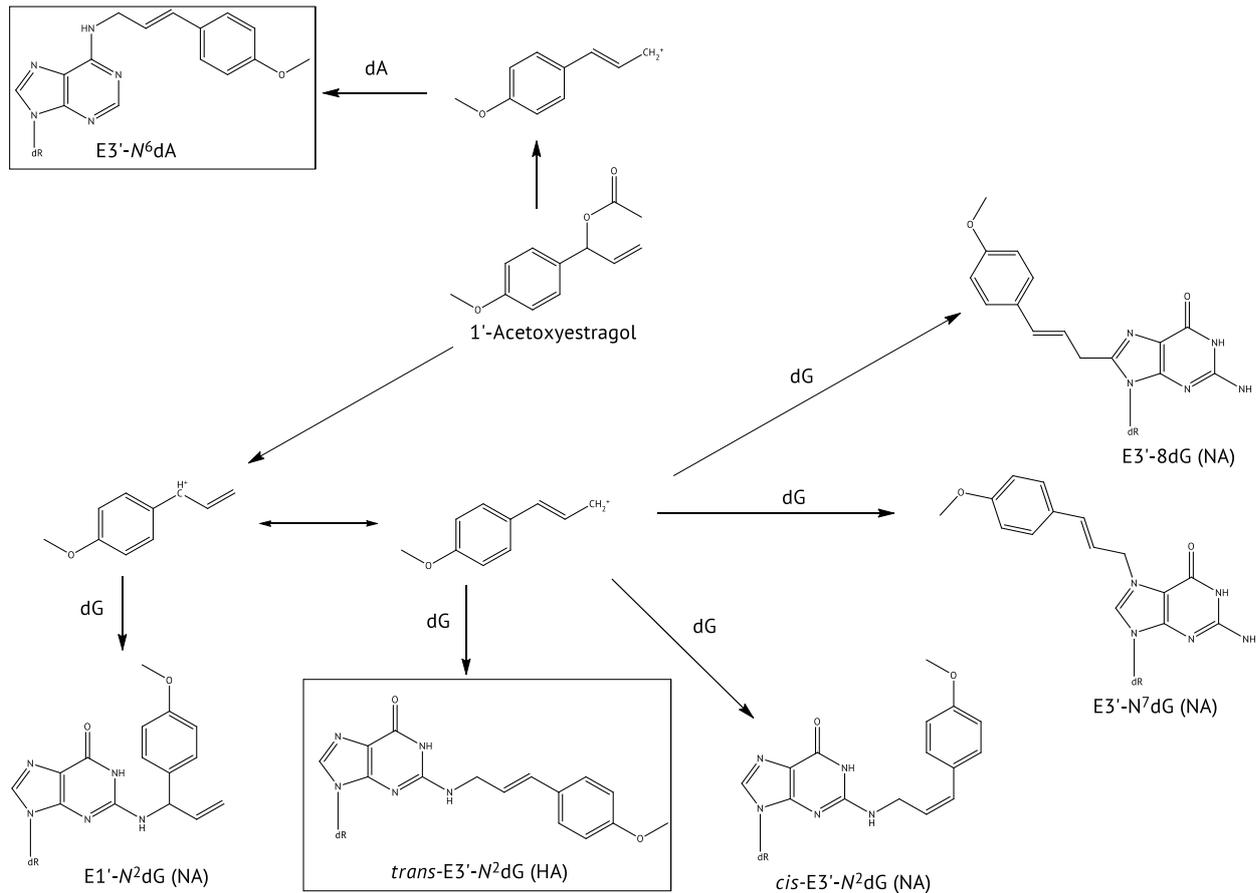


Abbildung 4: Bildung von DNA-Addukten aus 1'-Acetoxyestragol bei neutralem pH-Wert (dA: 2'-Desoxyadenosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, E3'-N<sup>6</sup>dA: N<sup>6</sup>-(*trans*-isoestragol-3'-yl)-desoxyadenosin, E1'-N<sup>2</sup>dG: N<sup>2</sup>-(*ep*-estragol-1'-yl)-desoxyguanosin, *trans*-E3'-N<sup>2</sup>dG: N<sup>2</sup>-(*trans*-isoestragol-3'-yl)-desoxyguanosin, *cis*-E3'-N<sup>2</sup>dG: N<sup>2</sup>-(*cis*-isoestragol-3'-yl)-desoxyguanosin, E3'-N<sup>7</sup>dG: N<sup>7</sup>-(*trans*-isoestragol-3'-yl)-desoxyguanosin, E3'-8dG: 8-(*trans*-isoestragol-3'-yl)-desoxyguanosin, NA: Nebenaddukt, HP: Hauptaddukt) nach (Phillips et al., 1981; Wiseman et al., 1985)

### 2.2.4 Toxizität von Estragol in *in-vitro*-Testsystemen

#### DNA-Addukte *in vitro*

In B-13-Zellen, bei denen es sich um eine Hepatozyten-ähnliche Zelllinie handelt, bzw. transfizierten B-13/H-Zellen konnte nach Inkubation mit Estragol kein N<sup>2</sup>-(*trans*-isoestragol-3'-yl)-desoxyguanosin detektiert werden. Nach Inkubation mit 1'-Hydroxyestragol konnte dieses Addukt in B-13/H-Zellen detektiert werden (Probert et al., 2016). Inkubationen von HepG2-Zellen, HepaRG-Zellen und primären Rattenhepatozyten (pRH) mit 50 µM Estragol und einer Inkubationszeit von 2 h zeigten, dass in den HepG2-Zellen das Addukt E3'N<sup>2</sup>dG nicht mittels LC-MS/MS detektiert werden konnten. In HepaRG-Zellen sowie pRH konnte E3'N<sup>2</sup>dG detektiert werden, wobei die Adduktlevel in pRH höher waren als in HepaRG-Zellen. Nach Inkubation mit 1'-Hydroxyestragol wurde in allen Zellsystemen das Addukt detektiert, wobei die Adduktlevel von HepG2-Zellen über HepaRG-Zellen zu pRH zunahmen. Nach dem Entfernen des Estragol aus dem Kulturmedium wurde in HepaRG-Zellen die Adduktlevel über einen Zeitraum von 72 h beobachtet. Dabei kam es zur Abnahme der DNA-Addukte, wobei ca. 23 % der Addukte repariert

wurden. Um den Effekt der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) auf die Adduktlevel zu untersuchen wurden COH-Zellen, sowie transfizierte CHO-Zellen, die eine defekte NER aufweisen, mit 1'-Hydroxyestragol inkubiert. In COH-Zellen war nach 4 h Nachinkubation ohne 1'-Hydroxyestragol eine Abnahme der Addukte zu beobachten, welche in den transfizierten Zellen mit defekter NER nicht stattfand. (Yang et al., 2020a)

### **Zytotoxizität**

Villarini et al. (2014) untersuchte die Zytotoxizität von Estragol in HepG2-Zellen in einem Konzentrationsbereich von 0,66 µg/ml bis 84,55 µg/ml (entspricht 4–570 µM). Im MTT-Assay konnte nach einer Inkubationszeit von 4 h kein zytotoxischer Effekt beobachtet werden. Mittels Trypanblaufärbung und Doppelfärbung mit Acridinorange/DAPI konnte bestätigt werden, dass die Zellvitalität nach vierstündiger Inkubation mit Estragol auch bei der höchsten Konzentration über 90 % lag (Villarini et al., 2014). Nach 24 h Inkubation von HepaRG-Zellen mit Estragol (Konzentrationsbereich 0,1–75 mM) konnte ab einer Konzentration von 12,5 mM eine Reduktion der Zellvitalität beobachtet werden. Bei der höchsten Inkubationskonzentration konnte keine Zellvitalität detektiert werden. (Paini et al., 2017)

Nach 24 h Inkubationszeit mit Estragol in einem Konzentrationsbereich von 78,3–5.000 µg/ml (entspricht 528–33.738 µM) konnten in HepG2-Zellen und HeLa-Zellen zytotoxische Effekte beobachtet werden. Es wurde eine inhibitorische Konzentration 50 (IC<sub>50</sub>) für Estragol von 2280 µg/ml (15.385 µM) in HepG2-Zellen und 268 µg/ml (18.111 µM) für HeLa-Zellen bestimmt. Murine peritoneale Makrophagen reagiert wesentlich empfindlicher, wobei ein IC<sub>50</sub>-Wert von 267 µg/ml (1802 µM) ermittelt wurde. (Oliveira et al., 2016) In V79-Zellen zeigt sich ebenfalls im hohen Konzentrationsbereich eine geringe Zytotoxizität (Martins et al., 2012).

Nach vierstündiger Inkubationen von primären Rattenhepatozyten mit Estragol und einer Kultivierung von 16 h ohne Substanz wurde mittels LDH-Assay ein starker Anstieg der Zytotoxizität ab einer Konzentration von 5 mM beobachtet (Howes et al., 1990). Wird die Nachinkubationszeit auf 17 h verlängert ist ebenfalls nach Inkubation mit Konzentrationen höher als 5 mM Estragol ein Anstieg der LDH-*Leakage* von mehr als 45 % zu beobachten. Eine Inkubation für 4 h mit 1'-Hydroxyestragol und Nachinkubation für 17 h führt ab einer Konzentration von 0,1 mM zu einer LDH-*Leakage* von mehr als 45 %. Ein Vergleich der Daten zeigt, dass 1'-Hydroxyestragol in niedrigeren Konzentrationen zytotoxisch ist. Zudem wird die Zellvitalität durch 1'-Hydroxyestragol wesentlich stärker reduziert als durch die Muttersubstanz. (Chan und Caldwell, 1992)

### **Gentoxizität /Mutagenität**

Mittels alkalischem Comet-Assay wurde das genotoxische Potential in HepG2-Zellen untersucht. Nach einer Inkubationszeit vom 4 h mit Estragol (Konzentration 84,55 µg/ml; 42,28 µg/ml; 21,14 µg/ml) konnte keine Erhöhung der Doppelstrangbrüche im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden (Villarini et al., 2014). Nach einer Inkubationszeit von 1 h konnte in V79-Zellen im Comet-Assay ein signifikanter und konzentrationsabhängiger Anstieg der DNA-Schäden gezeigt werden. Nach einer zweistündigen Erholungszeit ist eine Reduktion der DNA-Läsionen zu beobachten (Martins et al., 2012). Durch die Inkubation mit SULT-Inhibitoren kann *in vitro* die Bildung von DNA-Schäden im Comet-Assay reduziert werden. (Probert et al., 2016)

Inkubationen mit Estragol führten nach einer Inkubationszeit von 24 h in V79-Zellen zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des Schwesterchromatidaustausch (SCE). Nach metabolischer Aktivierung des Estragol durch S9-Mix ist ein Anstieg von SCE im Vergleich zur nicht metabolischen Aktivierung zu beobachten (Martins et al., 2012). Nach 18 h Inkubation von V79-Zellen mit Estragol konnte keine Chromosomenaberration beobachtet werden. Dabei spielte es keine Rolle, ob eine metabolische Aktivierung (S9-Mix oder Co-Kultur mit pRH) stattfand oder nicht. (Müller et al., 1994)

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Ergebnisse des Ames-Testes für Estragol und verschiedener relevanter Metaboliten.

Sowohl Estragol als auch 1'-Hydroxyestragol sind im Ames-Test in den meisten *Salmonella typhimurium* Stämmen negativ. Dabei spielt es keine Rolle, ob der Assay mit oder ohne metabolische Aktivierung durchgeführt wurde. Eine Ausnahme bildet der Stamm TA100, in dem Estragol sowohl ohne als auch mit metabolischer Aktivierung positiv ist. Dabei konnte ein Anstieg der Revertanten nach metabolischer Aktivierung im Vergleich zum Assay ohne Aktivierung beobachtet werden. Das gleiche Bild zeigt sich für den reaktiven Metaboliten 1'-Hydroxyestragol, wobei ein Vergleich zu Estragol zeigt, dass 1'-Hydroxyestragol ein höheres mutagenes Potential aufweist (Swanson et al., 1979; Sekizawa und Shibamoto, 1982). Bei dem Stamm TA100 handelt es sich um einen Stamm der die Mutationen *hisG46*, *rfa*, *uvrB* und R-Faktor trägt (Ames et al., 1975). Durch die Mutationen kommt es zu einem Verlust der Lipopolysaccharid-Barriere der Zellmembranen (*rfa*), einem Defekt der Nukleotid-Exzisionsreparatur (*uvrB*) und der Stamm weist durch den R-Faktor eine höhere Sensitivität für mutagen Effekte auf. TA100 eignet sich vor allem zur Detektion von Basenpaarmutationen (Maron und Ames, 1983). In transfizierten Bakterienstämmen basierend auf TA1583, die humane SULT1A3 exprimieren, konnte nach metabolischer Aktivierung ein mutagenes Potential von Estragol gezeigt werden, während bei den Stämmen die SULT1A1 und SULT1A2 exprimieren Estragol der Ames-Test negativ war (Oda et al., 2012). Die im mikrosomalen Metabolismus gebildeten Metaboliten Estragol-2',3'-epoxid und 1'-Hydroxyestragol-2',3'-epoxid waren im Ames-Test ebenfalls positiv, während 1'-Oxoestragol nicht mutagen im Ames-Test war. (Swanson et al., 1979; Levorato et al., 2018)

## 2 Theoretische Grundlagen

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse des Ames-Test von Estragol und verschiedenen Metaboliten in verschiedenen *Salmonella typhimurium* Stämmen

Substanz	<i>Salmonella typhimurium</i> Stamm	Metabolische Aktivierung	Ergebnis	Quelle
Estragol	TA98	Nein	-	1, 2, 5
		S13 <sup>a)</sup>	-	1
		S9 <sup>b)</sup>	-	2, 5
	TA100	Nein	+/-	1, 2, 5
		S13 <sup>a)</sup>	+	1
		S9 <sup>b)</sup>	-	2, 5
	TA1535	Nein	+/-	2, 5
		S9 <sup>b)</sup>	-	2, 5
		Nein + PAPS	-	5
	TA 1538	S13 + PAPS	+	5
		Nein	-	2, 5
	TA1537	S9 <sup>b)</sup>	-	2, 5
		S9 <sup>b)</sup>	-	2, 5
TA1538/SULT1A1	S9	-	4	
TA1538/SULT1A2	S9	-	4	
TA1538/SULT1A3	S9	+	4	
1'-Hydroxyestragol	TA98	Nein	-	1, 3
		S13 <sup>a)</sup>	-	1, 3
	TA100	Nein	+	1, 3
		S13 <sup>a)</sup>	+	1, 3
3'-Hydroxyisoestragol	TA100	Nein	+	1
		S13 <sup>a)</sup>	+	1
	TA98	Nein	-	1
		S13 <sup>a)</sup>	-	1
Estragol-2',3'-epoxid	TA100	S13 <sup>a)</sup>	+	1
	TA1535	S13 <sup>a)</sup>	+	1
1'-Hydroxyestragol-2',3'-epoxid	TA100	Nein	+	5
		S13 <sup>a)</sup>	+	1
		S13 <sup>a)</sup>	+	1
1'-Oxoestragol	TA100	nein	-	5
1'-Acetoxyestragol	TA98	Nein	+	3
	TA100	Nein	+	3, 6

a) Aroclor induzierte Mikrosomen mit NADPH generierendem System, b) S9-Mix aus Leber von PCB-behandelten Sprague-Dawley-Ratten, + positiv, - negativ, 1) Swanson et al. (1979) 2) Sekizawa und Shibamoto, (1982) 3) Drinkwater et al. (1976) 4) Oda et al. (2012) 5) To et al. (1982) 6) Phillips et al., 1981

Im UDS-Test in pRH konnte nach 4 h Inkubation mit Estragol und einer Nachinkubation von 16 h ein Anstieg der DNA-Reparatur um dem Faktor 2,7 gezeigt werden. Der Anstieg der DNA-Reparatur ist konzentrationsabhängig. Ab einer Konzentration von 5 mM Estragol im Kulturmedium war keine erhöhte Respons der Zelle zu beobachten, was auf die Zytotoxizität in diesem Konzentrationsbereich zurückzuführen ist (Howes et al., 1990). Diese Ergebnisse wurden im UDS-Test mit einer Nachinkubation von 17 h bestätigt, wobei es auch hier zu einem 2,7fachen Anstieg der DNA-Reparatur im Vergleich zur Kontrolle kam und ab 5 mM keine DNA-Reparatur mehr beobachtet wurde. Im UDS-Test in pRH mit einer Inkubationszeit von 4 h mit 1'-Hydroxyestragol und einer Nachinkubation für 17 h wurde im Vergleich zur Inkubation mit Estragol eine höhere UDS-Respons beobachtet, wobei es zu einem 3,4fachen Anstieg kam. Das Maximum der UDS-Respons lag bei 0,1 mM, bei höheren Konzentrationen wurde aufgrund der Zytotoxizität keine Respons detektiert (Chan und Caldwell, 1992). *Ex-Vivo*-Untersuchungen bestätigen, dass 4 h bzw. 12 h nach oraler Behandlung von Wistar-Ratten mit Estragol der Anteil UDS positiver Zellen in der Leber ansteigt (Müller et al., 1994).

### **2.2.5 Toxizität von Estragol in *in-vivo*-Versuchen**

Einen Gesamtüberblick über die Datenlage der *in-vivo*-Studien gibt Tabelle 6 für Estragol und Tabelle 7 für 1'-Hydroxyestragol. Alle Angaben zur Spezies, Dosis, Applikationsart und Behandlungszeitpunkte können aus den Tabellen entnommen werden. Im Folgenden wird nochmals auf ausgewählte Studien eingegangen.

#### **DNA-Addukte *in vivo***

Mittels  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling wurde die Bildung von DNA-Addukten nach i. p. Injektion von Estragol 24 h nach Behandlung in der Leber von Mäusen untersucht. Als Hauptaddukt wurde  $N^2$ -(*trans*-Isoestragol-3'-yl)-desoxyguanosin bzw.  $N^2$ -(*trans*-Estragol-1'-yl)-desoxyguanosin identifiziert, wobei  $N^2$ -(*trans*-Isoestragol-3'-yl)-desoxyguanosin ein höheres Signal ergab. Als Nebenaddukt wurde das  $N^6$ -Adenosinaddukt identifiziert, welches einen Anteil von 2–3 % der Addukte ausmachte (Randerath et al., 1984). In der Leber von B6C3F<sub>1</sub>-Mäusen, denen über vier Zeitpunkte eine Gesamtdosis von 4,75  $\mu\text{mol}$  Estragol verabreicht wurde, konnte durch  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling die Bildung von DNA-Addukten nachgewiesen werden. Im Zeitverlauf zeigte sich, dass 24 h nach der letzten Behandlung die Adduktlevel am höchsten waren und über die Zeit abnahmen. Als Hauptaddukte wurden  $N^2$ -(*trans*-Isoestragol-3'-yl)-desoxyguanosin und  $N^2$ -(*trans*-Estragol-1'-yl)-desoxyguanosin, als Nebenaddukte  $N^2$ -(*cis*-Isoestragol-3'-yl)-desoxyguanosin und  $N^6$ -(*trans*-Isoestragol-3'-yl)-desoxyadenosin identifiziert. (Phillips et al., 1984)

Mittels Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse und LC-ESI-MS/MS wurde die Bildung von DNA-Addukten in der Leber von F344-Ratten nach Behandlung mit Estragol untersucht. Es konnte das C8-dG Addukt (ES-3'-C8-dG), das  $N^2$ -dG Addukt (ES-3'- $N^2$ -dG) und das  $N^6$ -dA (ES-3'- $N^6$ -dA) Addukt identifiziert werden. Als Hauptaddukt wurde ES-3'- $N^6$ -dA identifiziert, wobei es sich bei den dG-Addukten um die Nebenaddukte handelt. (Ishii et al., 2011)

## 2 Theoretische Grundlagen

Tabelle 6: Übersicht über *in-vivo*-Studien zu Estragol (Fortsetzung auf folgenden Seiten)

Quelle	Endpunkt	Spezies	Dosis/Applikation	Ergebnis
Caujolle und Meynier (1958)	LD <sub>50</sub>	Ratte Maus	0,29 – 4,81 g/kg; i. p. 0,19 – 4,81 g/kg; i. p.	LD <sub>50</sub> : 1,03 g/kg KG LD <sub>50</sub> : 1,23g/kg KG
Taylor et al. (1964)	LD <sub>50</sub>	Osborne-Mendel (m) Stamm/Sherman-Ratte (m)	MaS	LD <sub>50</sub> : 1820 mg/kg KG
Müller et al. (1994)	DNA-Reparatur (UDS)	Wistar-Ratten (m)	0,5, 1,2 g/kg KG; ScS, Isolierung der Hepatozyten 4/12 h nach Behandlung	konzentrationsabhängige Zunahme der UDS
Nesslany et al. (2010)	DNA-Reparatur (UDS)	F344-Ratten (m)	0,25, 0,8, 2 g/kg KG, ScS für 2 – 4 h oder 12 – 16 h	konzentrationsabhängige Zunahme der UDS in Hepatozyten
Phillips et al. (1984)	DNA-Adduktbildung ( <sup>32</sup> P-Postlabeling)	B6C3F <sub>1</sub> -Mäuse (m)	0,25, 0,5, 1, 3 µmol an Tag 1, 8, 15, 22 nach Geburt; i. p.; Leberentnahme an Tag 23, 28, 43 nach Geburt	Bildung von vier DNA-Addukten ab Tag 23 nach Geburt; höchste Addukt Gehalte an Tag 23, mit Abnahme über Zeit
Randerath et al. (1984)	DNA-Adduktbildung ( <sup>32</sup> P-Postlabeling)	CD-1-Mäuse (f)	2, 10 mg/Maus, i. p.; Organentnahme 24 h nach Behandlung	Bildung von drei DNA-Addukten in der Leber
Wakazono et al. (1998)	Proteinaddukte	F344-Ratten (m)	100, 300, 500 mg/kg KG, ScS, Leberentnahme nach 3, 12, 24 h nach Behandlung	zeitabhängige Bildung von Proteinaddukte in der Leber
Ishii et al. (2011)	DNA-Addukte (LC-MS/MS)	F344-Ratten (m)	600 mg/kg KG, 5 Tage/Woche SuS über 4 Wochen	Detektion von drei DNA-Addukten in der Leber

Fortsetzung Tabelle 6

Quelle	Endpunkt	Spezies	Dosis/Applikation	Ergebnis
Paini et al. (2012)	DNA-Adduktbildung (LC-MS/MS)	Sprague-Dawley-Ratten (m)	300 mg/kg KG; SuS; Behandlung für 2,6,24 und 48 h bzw. 0, 5, 30, 75, 150, 300 mg/kg KG, ScS; Behandlung 48 h	zeit- und dosisabhängige DNA-Addukt Bildung in der Leber, sowie Bildung von DNA-Addukten in der Niere und Lung
Suzuki et al. (2012a)	DNA-Addukte	F344-Ratten (m)	0, 22, 66, 200, 600 mg/kg KG, SuS über 4 Wochen/5 Tage die Woche	dosisabhängige Zunahme von DNA-Addukten in der Leber
Suzuki et al. (2012b)	DNA Addukte, Mutagenität	C3H/He (m) B6C3F <sub>1</sub> gpt del1 Mäuse (f)	37,5, 75, 150, 300/250 mg/kg KG, SuS, 5 Tage die Woche über 13 Wochen	erhöhte Bildung von DNA-Addukte und erhöhte Mutationsfrequenz bei Tieren mit erhöhter SULT1A1 Aktivität
Alhusainy et al. (2013)	DNA-Addukte	Sprague-Dawley-Ratten (m)	150 mg/kg KG Estragol allein, mit Neovadesin oder Pentachlorphenol (PCP), ScS, Behandlungsdauer 24 h	Bildung von DNA-Addukten in der Leber, wobei durch Neovadesin und PCP (SULT-Hemmstoff) Adduktlevel reduziert wurden
Ding et al. (2015)	DNA-Adduktbildung ( <sup>32</sup> P-Postlabeling /Mikrokerntest)	F344-Ratten (m)	300, 6000, 1.000 mg/kg KG, SuS, Behandlungsdauer 3 Monate	konzentrationsabhängige Bildung von drei DNA-Addukten in der Leber, Erhöhung der Mikrokernarte in Reticulocytes, Läsionen in der Leber
Nesslany et al. (2010)	Mikrokerntest	F344-Ratten (m/f)	250, 500, 1.000 mg/kg KG/Tag x 2, SuS, Entnahme Knochenmarkszellen nach 24/48 h	keine statistische Zunahme der Mikrokernrate

## 2 Theoretische Grundlagen

Fortsetzung Tabelle 6

Quelle	Endpunkt	Spezies	Dosis/Applikation	Ergebnis
Drinkwater et al. (1976)	Hepato-kanzerogenität	CD-1-Mäuse (m/f)	0,35, 0,69, 1,38, 2,77 µmol/Tier bzw. 0,35, 0,69, 1,38, 2,77 µmol/Tier, sc, an Tag 1,8,15,22, getötet nach 15 Monaten,	Erhöhung der Tumorzinzidenz in beiden Dosisgruppen. Bildung von hepatozellulären Karzinomen
Miller et al. (1983)	Kanzerogenität	CD-1-Mäuse (m/f)	2,5 µmol/g KG, 2 mal die Woche über 5 Wochen, MaS	Bildung von Lebertumoren bei den männlichen Tieren, weibliche Tiere nicht so sensitiv
Miller et al. (1983)	Kanzerogenität	CD-1-Mäuse (m)	9,45 µmol verteilt auf Tag 1, 8, 15, und 22, i. p.	Bildung von Lebertumoren
Miller et al. (1983)	Kanzerogenität	B6C3F <sub>1</sub> -Mäuse (m)	9,45 µmol verteilt auf Tag 1, 8, 15, und 22, i. p.	Bildung von Lebertumoren (Hepatome) bei 83% der Tiere
Miller et al. (1983)	Kanzerogenität	CD-1-Mäuse (f)	0,23, 0,46 % Estragol im Futter über 12 Monate drei mal die Woche	Erhöhung der Tumorzinzidenz in der Leber und Bildung von Hepatomen bei 56 % bzw. 72 der Tiere
Wiseman et al. (1987)	Kanzerogenität	B6C3F <sub>1</sub> -Mäuse	0,75 µmol/g KG Estragol an Tag 12 mit und ohne Pentachlorophenol; (PCP) i. p.	ohne PCP 95 % (Kontrolle 17 %) der Tiere mit Hepatomen, mit PCP 18 % (Kontrolle 9%)
Suzuki et al. (2012a)	Kanzerogenität	F344-Ratten (m)	600 mg/kg KG 5 Tage die Woche, ScS, Tiere getötet nach 4, 8, 16 Wochen	morphologische Veränderungen in der Leber inklusive von Lymphozytenaggregation, Hepatozytenhyperreophie, allgemeiner Zellproliferation, Gallengangproliferation und Cholangiofibrose 16 Wochen nach der Behandlung

m: männlich, f: weiblich, i. p. interperitoneal, MaS: oral über Magensonde, ScS: oral über Schlundsonde

## 2 Theoretische Grundlagen

Tabelle 7: Übersicht über *in-vivo*-Studien zu 1'-Hydroxyestragol

Quelle	Endpunkt	Spezies	Dosis/Applikation	Ergebnis
Wiseman et al. (1987)	Hepatokanzerogenität	C3H/He-Mäuse (m/f) C57BL/6-Mäuse (m/f)	Gesamtdosis 1,5 µmol/g KG verabreichte an Tag 1, 8, 15 und 22 nach Geburt, Organentnahme nach 14 Monaten	76% Hepatoma-transgene Tiere des Stamm C3H/He (m) 14 % Hepatoma-transgene Tiere Stamm C57BL/He, weibliche Tiere nicht so sensitiv
Wiseman et al. (1987)	Hepatokanzerogenität	B6C3F <sub>1</sub> -Mäuse (m)	0,05, 0,1,0,15 µmol/g KG, Einfachdosis an Tag 1 bzw. 12, Organentnahme 10 Monte; i. p.	akute Toxizität ab 0,15 µmol/g KG, signifikante Erhöhung der Tumor-tragenden Tiere, sowie der Anzahl der Tumore
Drinkwater et al. (1976)	Hepatokanzerogenität	CD-1-Mäuse (m/f)	0,35, 0,69, 1,38, 2,77 µmol/Tier sc, an Tag 1,8,15,22, Getötet nach 15 Monaten,	Erhöhung der Tumorinzidenz; Bildung von hepatozellulären Karzinomen
Miller et al. (1983)	Kanzerogenität	B6C3F <sub>1</sub> -Mäuse (m)	1,87, 2,85, 4,65 µmol verteilt auf Tag 1, 8, 15, und 22, i. p.	Erhöhung der Tumorinzidenz in der Leber und Bildung von Hepatomen bei 96-100% der Tiere in allen Dosisgruppen
Miller et al. (1983)	Kanzerogenität	CD-1-Mäuse (m/f)	0,25 % Estragol im Futter über 12 Monte drei mal die Woche	Erhöhung der Tumorinzidenz in der Leber und Bildung von Hepatomen bei 56 % der Tiere

m: männlich, f: weiblich, i. p. interperitoneal, sc: subkutan MaS: oral über Magensonde, ScS: oral über Schlundsonde

## 2 Theoretische Grundlagen

An Sprague-Dawley-Ratten wurde die zeitabhängige Bildung von  $N^2$ -(*trans*-Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin über 48 h in der Leber untersucht. Dabei nahm die Bildung der DNA-Addukte über den kompletten Beobachtungszeitraum zu, wobei es zu einem signifikanten Anstieg der DNA-Addukte zwischen 24 h und 48 h kam. Im Anschluss wurde die dosisabhängige DNA-Adduktbildung in der Leber, der Niere und der Lunge 48 h nach der Verabreichung von Estragol bestimmt. In der Leber wurde eine dosisabhängige Zunahme der Bildung von  $N^2$ -(*trans*-Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin beobachtet. Bei hohen Dosen von 150 bzw. 300 mg/kg KG konnten ebenfalls Addukte in der Niere und der Lunge detektiert werden, wobei keine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet wurde (Paini et al., 2012). Untersuchungen an F344-Ratten mit verschiedenen Dosen Estragol zeigten, dass die Addukte ES-3'-8-dG, ES-3'- $N^2$ -dG und ES-3'- $N^6$ -dA gebildet wurden. Für alle Addukte wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme der Adduktlevel gezeigt. Als Hauptaddukt wurde ES-3'- $N^6$ -dA identifiziert. (Suzuki et al., 2012a)

Untersuchungen an transgenen Mäusen, die SULT1A1 überexprimieren, sollten die Rolle von SULT1A1 bei der Kanzerogenese zeigen. Dabei zeigten die weiblichen Tiere eine höhere SULT1A1 Expression im Vergleich zu den Männchen, während die CYP1A2-Expression vergleichbar war. Sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen kam es zu einem dosisabhängigen linearen Anstieg der DNA-Addukte, wobei die Adduktlevel der weiblichen Tiere in allen Konzentrationen höher waren. Auch die Anzahl der Mutationen in der Leber war bei den weiblichen Tieren höher (Suzuki et al., 2012b). An Sprague-Dawley-Ratten konnte gezeigt werden, dass durch die gleichzeitige Gabe eines SULT-Hemmstoffes (Nevadensin) und Estragol die Bildung des DNA-Adduktes  $N^2$ -(*trans*-isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin im Vergleich zur Gabe von Estragol verringert wird (Alhusainy et al., 2013). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Sulfonierung von 1'-Hydroxyestragol ein essentieller Schritt in der Kanzerogenese von Estragol ist.

### **Genotoxizität**

An F344-Ratten konnte gezeigt werden, dass durch Estragol DNA-Schäden verursacht werden. Im alkalischen Comet-Assay wurde eine dosisabhängige Zunahme von Doppelstrangbrüchen und alkalilabilen Stellen in der Leber beobachtet. Ebenso konnte mittels  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling die Bildung von drei unterschiedlichen DNA-Addukten in der Leber nachgewiesen werden. Die DNA-Adduktbildung war ebenfalls dosisabhängig. Weiterhin wurde der Anteil mikrokerntragender Retikulozyten im Blut der Tiere leicht erhöht (Ding et al., 2015). An männlichen F344-Ratten wurde die ungeplante DNA-Reparatur (UDS) nach einer Expositionszeit von 2–4 h und 12–16 h untersucht. Über den gesamten Dosisbereich von 250 bis 2.000 mg/kg KG konnte ein dosisabhängiger Anstieg der DNA-Reparatur sowohl nach einer Expositionsdauer von 2–4 h als auch nach 12–16 h gezeigt werden. Zusätzlich wurde in der Studie getrockneter Estragon (Dosis 2.000 bzw. 6250 mg/kg KG) untersucht. Die Dosis Estragol betrug 8 bzw. 25 mg/kg KG. Dabei wurde keine erhöhte DNA-Reparatur beobachtet. Wird der getrocknete Estragon zusätzlich mit

Estragol versetzt (Dosis 800 bzw. 2.000 mg/kg KG) ist, wie bei der Behandlung mit Estragol allein, eine dosisabhängige Steigerung der DNA-Reparatur zu beobachten. (Nesslany et al., 2010)

### **Akute/subakute Toxizität**

Nach oraler Gabe von Estragol wurde eine letale Dosis 50 ( $LD_{50}$ ) für die Maus von 1250 mg/kg bzw. für die Ratte von 1820 mg/kg bestimmt (Jenner et al., 1964). Ab einer Dosis von 605 mg Estragol/kg KG über vier Tage waren bei Ratten makroskopische Leberläsionen zu beobachten (Taylor et al., 1964). In einer weiteren Studie lag der  $LD_{50}$  nach i. p. Injektion für Mäuse bei 1260 mg/kg bzw. bei 1970 mg/kg für Ratten. (Caujolle und Meynier, 1958)

Eine Studie untersuchte die subakute Toxizität von Estragol in männlichen und weiblichen Ratten, wobei den Tieren über drei Monate fünf Tage die Woche Estragol mittels Schlundsonde verabreicht wurde. Es konnten in der hohen Dosisgruppe morphologische Veränderungen der Leber und Entzündungsreaktionen beobachtet werden. Bei weiblichen Tieren kam es zudem zu einer Erhöhung der CYP1A1- und CYP1A2-Aktivität in der Leber. Bei einigen Tieren wurden Gallengangkarzinome oder hepatozelluläre Adenome beobachtet. (Bristol, 2011)

Bei einer subakuten Studie an Mäusen starben nach neun Wochen ein männliches Tier der höchsten Dosisgruppe und in der ersten Woche alle weiblichen Tiere der höchsten Dosisgruppe an einer Lebernekrose. Die Inzidenz von hepatozellulären Hypertrophie und Degeneration war bei weiblichen Tieren ab 150 mg Estragol/kg KG und bei männlichen Tieren ab 300 mg Estragol/kg KG signifikant erhöht. (Bristol, 2011)

### **Kanzerogenität**

In einer Studie an CD-1-Mäusen, denen Estragol bzw. 1'-Hydroxyestragol subkutan (sc) verabreicht wurde, wurde die Kanzerogenität der Muttersubstanz und des potentiell kanzerogenen Metaboliten untersucht. Bei 23 % der männlichen Tiere der niedrigeren Dosisgruppe von 4,43  $\mu\text{mol}$  (0,66 mg) Estragol und 41 % der hohen Dosisgruppe von 5,19  $\mu\text{mol}$  (0,77 mg) Estragol wurden nach Behandlung mit Estragol ein oder mehrere hepatozellulärer Karzinome beobachtet. Nach Behandlung mit 4,43  $\mu\text{mol}$  (0,73 mg) 1'-Hydroxyestragol entwickelten 70 % der Tiere Tumore. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Estragol hepatokanzerogen für Nagetiere ist. Der Metabolit 1'-Hydroxyestragol wirkt als potenteres Kanzerogen in Nagetieren, was einen Hinweis darauf gibt, dass 1'-Hydroxyestragol eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Karzinomen spielt. (Drinkwater et al., 1976)

Wird Estragol CD-1-Mäusen verabreicht konnte nach 14 Monaten (Magensonde) bzw. 12 Monaten (i. p. Injektion) bei männlichen Tieren die Bildung von Lebertumoren beobachtet werden. Nach der Verabreichung von Estragol mittels Magensonde entwickelten 73 % der Tiere Lebertumore, nach i. p. Injektion 67 %. Bei weiblichen Tieren wurde keine erhöhte Tumorzinzenz beobachtet. Nach 13 Monaten Behandlung mit 1'-Hydroxyestragol zeigte sich eine erhöhte Tumorzinzenz bereits ab einer Dosis von 1,90  $\mu\text{mol}$  (0,31 mg)/Tier, wobei 95 % der Tiere Tumore entwickelten.

## 2 Theoretische Grundlagen

Bei einer Verlängerung des Beobachtungszeitraums entwickelten in allen Dosisgruppen 98–100 % der Tiere Tumore. (Miller et al., 1983)

In einer Fütterungsstudie mit weiblichen CD-1-Mäusen wurden die Tiere mit verschiedenen Dosen Estragol und einer Dosis 1'-Hydroxyestragol behandelt. In der niedrigen Dosisgruppe (0,23 % Estragol im Futter) entwickelten 56 % der Tiere Lebertumore, während in der Dosisgruppe mit 0,46 % Estragol im Futter 71 % der Tiere Tumore entwickelten. 1'-Hydroxyestragol zeigte in dieser Studie keine erhöhte Tumorzinzidenz für Lebertumore im Vergleich zu Estragol. Allerdings ist auffällig, dass alle 50 Versuchstiere vor Ablauf der 20 Monate verstarben. 30 Tiere entwickelten Angiosarkome, welche bei der Behandlung mit Estragol nicht beobachtet wurden. Ebenso konnte eine erhöhte Tumorzinzidenz nach der i. p. Gabe von 1'-Hydroxy-2',3'-dehydroestragol bei B6C3F<sub>1</sub>-Mäusen gezeigt werden, während 1'-Hydroxyestragol-2',3'-epoxid die Tumorzinzidenz in CD-1-Mäusen erhöht. (Miller et al., 1983)

Wiseman et al. (1987) untersuchte die Kanzerogenität von Estragol und 1'-Hydroxyestragol in verschiedenen Mäuse-Stämmen (C3H/He, C57BL/6, B6C3F<sub>1</sub>). Nach der Verabreichung einer Gesamtdosis von 1,5 µmol/g KG 1'-Hydroxyestragol konnte bei männlichem C57BL/6-Mäusen und C3H/He-Mäusen nach 14 Monaten eine erhöhte Inzidenz für Hepatokarzinome beobachtet werden. Dabei zeigt der C3H/He-Stamm eine höhere Empfindlichkeit. Bei beiden Stämmen waren die Weibchen resistenter gegenüber der Tumorzinzidenz, wobei durch 1'-Hydroxyestragol bei weiblichen C57BL/6-Mäusen keine Tumore induziert wurden. Ebenso konnte in B6C3F<sub>1</sub>-Mäusen nachgewiesen werden, dass Estragol hepatokanzerogen ist. Durch die Gabe des SULT-Hemmstoff Pentachlorphenol konnte die Entstehung von Tumoren verhindert werden.

Neben 1'-Hydroxyestragol wurde in B6C3F<sub>1</sub>-Mäusen die Kanzerogenität von 1'-Hydroxy-2',3'-dehydroestragol, 1'-Oxo-2',3'-Dehydroestragol und 1'-Actoxyestragol untersucht. Bei einmaliger i. p. Gabe am 12ten Tag nach der Geburt der Metaboliten kommt es durch 1'-Hydroxyestragol (0,01, 0,1 µmol/g KG), 1'-Hydroxy-2',3'-dehydroestragol (0,01, 0,05, 0,1 µmol/g KG), und 1'-Actoxyestragol (0,1 µmol/g KG) zu einer signifikant erhöhten Tumorzinzidenz in der Leber. Dabei war die Erhöhung der Tumorzinzidenz durch 1'-Hydroxyestragol erst ab einer Dosis von 0,1 µmol/g KG zu beobachten, während bei den anderen Metaboliten bei allen Dosen eine erhöhte Tumorzinzidenz beobachtet wurde. 1'-Oxo-2',3'-Dehydroestragol führte nicht zu einer Erhöhung der Tumorzinzidenz. Wird die Dosis auf verschiedene Tage aufgeteilt kann bestätigt werden, dass 1'-Hydroxy-2',3'-dehydroestragol ein stärkeres kanzerogene Potential aufweist als 1'-Hydroxyestragol. 1'-Oxoestragol führt zu einem Anstieg der Tiere die Karzinome tragen, welcher allerdings nicht signifikant ist. (Wiseman et al., 1987)

## Exposition

Die Exposition mit Estragol erfolgt vor allem über Gewürze und Gewürzpflanzen (Smith et al., 2002). Das *Scientific Committee on Food* (SCF) schätze die Exposition mit Estragol anhand von Daten aus Frankreich und Großbritannien ab. Als Grundlage für die Expositionsabschätzung wurden folgende Gehalte in Lebensmitteln aus industrieller Herstellung angenommen: 10 mg Estragol/kg Lebensmittel allgemein, 50 mg Estragol/kg Lebensmittel für Lebensmittel die Kräuter und Gewürze enthalten, 100 mg/kg für alkoholische Getränke, 50 mg/kg für Dosenfische und 250 mg/kg für Fette und Öle. Aufgrund dieser Daten und Verzehrsstudien wurde eine durchschnittliche tägliche Aufnahme von 4,3 mg Estragol und für das 97,5te Perzentil eine Aufnahme von 8,7 mg Estragol/Tag abgeschätzt. (SCF, 2001)

Weiterhin wurden für Europa und die USA verschiedene Abschätzungen der Exposition durch Lebensmittel durchgeführt. Einen Überblick über die abgeschätzte durchschnittliche Exposition gibt folgende Tabelle:

Tabelle 8: Abschätzung der Exposition von Estragol durch Lebensmittel in Europa und der USA

Lebensmittel	Exposition [µg/d] bzw. [µg/kg KG/d]	Land/ Region	Quelle
Lebensmittel	4.300 bzw. kA.	Europa	SCF (2001)
Lebensmittel	37,6 bzw. 0,63		
Essentielles Öl	16,41 bzw. 0,27	USA	Smith et al. (2002)
Aroma	5,79 bzw. 0,10		
Gesamtexposition	kA bzw. 10,00		
Lebensmittel	kA bzw. 8,78	Europa	Martins et al. (2018)
Gewürze und essentielle Öle	166,2 bzw. kA	USA	WHO (2009)
Fencheltee	kA bzw. 20–6.420	Österreich	Mihats et al. (2017)

kA: keine Angabe

### 2.2.6 Toxikokinetik Estragol

Eine Studie zum Metabolismus an männlichen CD-1-Mäusen, denen [<sup>14</sup>C]Estragol i. p. verabreicht wurde, zeigte, dass die Ausscheidung von <sup>14</sup>C innerhalb von 24 h stattfand. Bei weiblichen Wistar-Ratten, denen die Substanz per Schlundsonde verabreicht wurde, konnte bei hohen Dosen (ab 500 mg/kg) auch im Zeitraum von 24–48 h eine Exkretion von <sup>14</sup>C detektiert werden. Die Elimination findet in beiden Spezies hauptsächlich über Urin und Exhalation statt, während nur ein geringer Prozentsatz über die Fäzes ausgeschieden wird. Bei geringen Dosen bis 50 mg [<sup>14</sup>C]Estragol/kg KG ist die Hauptexkretionsroute über die Lunge, während die Exkretion über die Niere eine Nebenrolle spielt. Die Exkretion über CO<sub>2</sub> mit der Atemluft erfolgt nach O-Demethylierung des Estragol oder Oxidation der Seitenkette an C1'-Position oder der Doppelbindung. Mit steigender Dosis nimmt die Exkretion über den Urin prozentual zu. Der prozentuale Anteil von 1'-Hydroxyestragol im Metabolitenspektrum nimmt ebenfalls mit

## 2 Theoretische Grundlagen

steigender Dosis zu. Bei einer Dosis von 0,05 mg/kg KG werden bei Ratten und Mäusen 1,3 % als 1'-Hydroxyestragol, bei einer Dosis von 1.000 mg/kg KG werden bei Ratten 13,7 % und bei Mäusen 9,4 % als 1'-Hydroxyestragol ausgeschieden. Die Ausscheidung von 1'-Hydroxyestragol erfolgt als Glucuronide. (Anthony et al., 1987; Zangouras et al., 1981)

Untersuchungen an männlichen Albinoratten zeigten, dass das Metabolitenspektrum nach oraler Gabe mittels Schlundsonde und Applikation mittels i. p. von Estragol ähnlich ist. Der Hauptmetabolit im Urin war nach einer Dosis von 100 mg bzw. 400 mg Estragol/kg KG 4-Allylphenol. (Solheim und Scheline, 1973)

Um den humanen Metabolismus sowie die Exkretion zu untersuchen nahmen zwei Freiwillige 100 µg <sup>14</sup>C-Estragol zu sich. Im Anschluss wurde die Exkretion über Urin, Faces und die Atemwege untersucht. Der Großteil der Eliminierung der Radioaktivität fand über den Urin und die Atemluft innerhalb der ersten 8 h statt. Mit 58 % der aufgenommenen Radioaktivität handelt es sich bei der Ausscheidung über den Urin um den wichtigsten Ausscheidungsweg. Die Elimination über den Urin war nach ca. 12 h abgeschlossen, während über den Faces keine Ausscheidung von <sup>14</sup>C detektiert wurde. Es wurden 0,2 % bzw. 0,4 % der verabreichten Dosis als 1'-Hydroxyestragol ausgeschieden. Insgesamt war nach 48 h 72,6 % bzw. 66,9 % der Dosis ausgeschieden. (Sangster et al., 1987)

Nach dem Konsum von 3,5 mg Estragol über Fencheltee konnte im Blut von Probanden 45 min nach dem Konsum des Tees kein Estragol nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine schnelle Verteilung im Körper und eine schnelle Metabolisierung hin. Allerdings konnte im Blut einer Probandin sowohl freies als auch konjugiertes 1'-Hydroxyestragol detektiert werden, wobei nach 45 min weniger als 0,1 % der Dosis im Plasma detektiert werden konnte. Über den Urin wurde in den ersten 10 h nach der Verabreichung des Estragol 0,27 % der Dosis als 1'-Hydroxyestragolglucuronidid ausgeschieden, wobei insgesamt 0,39 % der Dosis zu 1'-Hydroxyestragol metabolisiert wurden. Bei dem Vergleich verschiedener Probanden konnte bestätigt werden, dass mit steigender Dosis ein höherer prozentualer Anteil zu 1'-Hydroxyestragol metabolisiert wird. Die Untersuchung der Ausscheidung von konjugiertem 4-Allylphenol über den Urin bestätigte, dass Estragol schnell metabolisiert und ausgeschieden wird. Nach 1,5 h war 17 % der Dosis über den Urin ausgeschieden, nach 8 h war die Ausscheidung des Metaboliten (20 % der Gesamtdosis) abgeschlossen. (Zeller et al., 2009)

### **2.2.7 Aktuelle Risikobewertung**

Estragol wurde von dem SCF als natürlich vorkommendes genotoxisches Kanzerogen eingestuft. Es konnte kein toxikologischer Schwellenwert bestimmt werden, weshalb kein Limit für eine sichere Exposition bestimmt werden kann. Daher wurde empfohlen die Exposition zu reduzieren und Regelungen zur Verwendung von Estragol in Lebensmitteln zu erlassen (SCF, 2001). Im Gegensatz dazu kam die FEMA zu dem Schluss, dass die durch Lebensmittel aufgenommene Menge Estragol nicht zu einem erhöhten Gesundheitsrisiko führt. Diese Einschätzung bezieht die Detoxifizierung über die *O*-Demethylierung und die geringere Bildung von 1'-Hydroxyestragol im

## 2 Theoretische Grundlagen

niedrigen Dosisbereiche mit ein. Dadurch besteht möglicherweise ein nicht linearer Zusammenhang zwischen der Dosis und dem Metabolitenspektrum (Smith et al., 2002). Aufgrund der unterschiedlichen Ansätze zur Risikobewertung durch die offiziellen Gremien der EU und USA wird im Folgenden auf einige Studien zu Risikoabschätzung von Estragol eingegangen.

Die *benchmark dose lower confidence* (BMDL<sub>10</sub>) wurde aufgrund einer Fütterungsstudie von Miller et al. (1983) an CD-1-Mäusen, die eine Dosis von 54 mg/kg KG/d bzw. 107 mg/kg KG/d bekamen, kalkuliert. Für die Bildung von hepatozellulären Karzinomen wurde für Estragol eine BMDL<sub>10</sub> von 3,3–6,5 mg/kg KG/d berechnet. Die Kalkulation des *Margin of Exposure* (MoE) für pflanzliche Lebensmittel ergab einen MoE von 1–2.000 für Estragol. (van den Berg et al., 2011)

Mihats et al. (2017) modellierte aufgrund der gleichen Studie einen BMDL<sub>10</sub> von 9–33 mg/kg KG/Tag. Zusätzlich wurde die Exposition mit Estragol über den Konsum von Fencheltee in Österreich bestimmt. Für die Bestimmung des Konsums von Fencheltee wurde der Austrian Nutrition Report 2008 herangezogen. Für die Ableitung des MoE wurde für Tee aus Teebeuteln ein Estragolgehalt von 565 µg/l bis 2.477 µg/l und Tee aus frischen Früchten ein Gehalt von 639 µg/l bis 4.644 µg/l angenommen. Bei den getesteten Instand Tees konnte in einigen Proben Estragol detektiert aber nicht quantifiziert werden. Daraus ergaben sich die in Tabelle 9 dargestellten Werte für die Exposition und den MoE. Bei vielen der untersuchten Fencheltees, lag bei der durchschnittlichen Aufnahme der MoE für Estragol unter 10.000. (Mihats et al., 2017) Liegt der MoE unter 10.000 handelt es sich um eine Substanz von „*high concern*“ für die Risikobewertung. Sowohl die Studie von van den Berg et al. (2011) als auch die Studie von Mihats et al. (2017) kamen zu dem Schluss, dass es sich bei Estragol um eine Substanz von *high concern* handelt. Eine Untersuchung von verschiedenen kommerziell erhältlichen Fencheltees in den Niederlanden, Belgien und Deutschland bestätigten, dass die Estragolgehalte in Fencheltees relevant für die Risikobewertung sind. Dabei machte es keinen Unterschied ob bitterer oder süßer Fenchel verwendet wurde. (van den Berg et al., 2014)

Nesslany et al. (2010) führte eine Risikobewertung für die Aufnahme von Estragol über Estragon durch. In der Studie wurde das genotoxische Potential von Estragol *in vivo* und *in vitro* bestätigt. *In vitro* konnte auch ein genotoxischer Effekt für Estragonpulver bestätigt werden, wobei der Effekt bei gleicher Estragolkonzentration signifikant geringer war. Unter Einbeziehung des Verzehr von Estragon in Europa, kam die Studie zu dem Schluss, dass durch den Verzehr von Estragon aufgenommenes Estragol nicht zu einem erhöhten Krebsrisiko führt. (Nesslany et al., 2010)

## 2 Theoretische Grundlagen

Tabelle 9: Exposition mit Estragol durch Fencheltee und Berechnung des MoE nach Mihats et al. (2017)

	Gruppe	KG [kg]	Konsum [ml]		Exposition mg/kg KG/Tag	MoE Mittelwert	Konsum [ml]		Exposition mg/kg KG/Tag	MoE 95th Perzentil
			Mittelwert	95th Perzentil			Mittelwert	95th Perzentil		
Instanttee	Säuglinge (0–12 Monate)	5*	100		0,2	45.000–165.000	kA		nb	nb
	Kleinkinder (1–3 Jahre)	12*	100		0,08	108.000–369.000	kA		nb	nb
Teebeutel	Säuglinge (0–12 Monate)	5*	100		1,53 8,31	5.800–21.200 1.100–4.400	kA		nb	nb
	Kleinkinder (1–3 Jahre)	12*	100		0,65 3,46	2.600–9.500 13.800–50.800	kA		nb	nb
	Kinder (6–5 Jahre)	39,7	95,4		0,41 4,02	21.900–802.000 2.200–8.200	363		1,57 15,31	5.700–21.100 600–2.200
	Frauen (19–65 Jahre)	63,6	194,7		0,52 5,13	17.200–62.900 1.800–6.400	1000		2,69 26,33	300–1.300 1.800–6.500
	Männer (19–65 Jahre)	81,5	114		0,15 2,93	61.600–225.800 3.100–11.200	600		0,77 15,43	37.600–137.700 3.800–14.100
	Kinder (6–5 Jahre)	39,7	95,4		0,25 5,04	35.800–131.400 1.800–6.500	363		0,96 19,18	9.400–34.500 500–1.700
Frische Fenchel-früchte	Frauen (19–65 Jahre)	63,6	194,7		0,32 6,42	28.100–103.200 1.400–5.100	1000		1,64 32,98	5.500–20.100 300–1.000
	Männer (19–65 Jahre)	81,5	114		0,24 2,34 <sup>c</sup>	11.700–42.900 600–2.100	600		1,26 12,32 <sup>c</sup>	7.100–26.200 700–2.700

nb: nicht bestimmt, kA: keine Angabe, Expositionsangaben sind Angaben von bis, \* Gewicht aufgrund von EFSA Guideline bestimmt

## 2 Theoretische Grundlagen

Mittels PBBK-Modeling wurde der Effekt unterschiedlicher Dosen Estragol unter Einbeziehung des Metabolismus in der Leber, Lunge, und Niere für Ratten abgeschätzt. Im Vorfeld konnte gezeigt werden, dass alle drei Organe am Metabolismus beteiligt sind, wobei 95–97 % des reaktiven Metaboliten 1'-Hydroxyestragol in der Leber gebildet wird. Zusätzlich wurde vorhergesagt, dass die Glucuronidierung von 1'-Hydroxyestragol bei einer hohen Dosis im Verhältnis zunimmt, während die O-Demethylierung von Estragol abnimmt. Bei einer geringen Dosis (0,05 mg/kg KG) ist bei männlichen Ratten Estragol nach 5 h komplett metabolisiert, wobei 0,08 % der Dosis zu 1'-Sulfoxyestragol und 14 % zu 1'-Hydroxyestragolglucuronidid metabolisiert wird. Bei einer hohen Dosis von 300 mg/kg KG geht man von einer Sättigung der O-Demethylierung aus. Estragol und 1'-Hydroxyestragol ist nach dieser Vorhersage erst nach 15 h metabolisiert, wobei 0,16 % der Dosis zu 1'-Sulfoxyestragol und 27 % zu 1'-Hydroxyestragolglucuronidid metabolisiert werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es mit steigender Dosis zu einem Shift des Phase-I-Metabolismus kommt und mit steigender Dosis ein höherer Anteil 1'-hydroxyliert statt O-demethyliert wird (Punt et al., 2008). Mit Hilfe dieses Modells und *in-vitro*-Daten von humanem Gewebe wurde ein PBBK-Modeling für den Menschen nach einer oral aufgenommenen Dosis von 0,07 mg/kg KG durchgeführt. Es wird vorhergesagt, dass Estragol und 1'-Hydroxyestragol innerhalb von 24 h komplett metabolisiert sind. Dabei werden 64,4 % der Dosis zu 1'-Hydroxyestragol metabolisiert, welche zum größten Teil zu 1'-Oxoestragol umgewandelt wird. Insgesamt 0,19 % der aufgenommenen Dosis wird zu 1'-Sulfoxyestragol metabolisiert. Bei einer zehnfach höheren Dosis wird prozentual ein ähnlicher Anteil zu 1'-Hydroxyestragol (63,9 %) metabolisiert. Wird die Dosis weiter erhöht (10 mg/kg KG) kommt es im humanen Modell zu einer im Verhältnis verminderten Bildung von 1'-Hydroxyestragol (56,9 % der Dosis). Diese Daten widersprechen allerdings der *in vivo* beobachteten Ausscheidung von 1'-Hydroxyestragol nach Aufnahme von <sup>14</sup>C-Estragol. Ein Vergleich zwischen Mensch und Ratte zeigt, dass die Entgiftung in Niere und Lunge beim Menschen nicht stattfindet, während dieser Weg in der Ratte eine große Rolle spielt. Allerdings besitzen die humanen Enzyme eine wesentlich höhere Effizienz zur Bildung von 1'-Oxoestragol (Punt et al., 2009). Zudem spielt im humanen Metabolismus die Epoxidierung eine große Rolle, die im Metabolismus der Ratte kaum eine Rolle spielt (Rietjens et al., 2010).

Neben der Vorhersage des Metabolismus wurde mittels PBBK-Modeling auch die Bildung von DNA-Addukten in der Ratte und im Menschen nach Exposition mit Estragol vorhergesagt. Dabei wurde die Bildung des N<sup>2</sup>-dG-Addukt untersucht. Durch Anpassungen des Modells konnte eine gute Übereinstimmung der Vorhersage für die Ratte mit der *in vivo* beobachteten DNA-Adduktbildung erzielt werden (Paini et al., 2012). Dieses Modell wurde als Grundlage für die Vorhersage der DNA-Adduktbildung beim Menschen verwendet. Bei dem Modeling für den Menschen wurde zusätzlich die Kinetik der PAPS abhängigen Sulfonierung von 1'-Hydroxyestragol sowie die Oxidation zu 1'-Oxoestragol verschiedener Personen berücksichtigt. Dieses Modell sagt bei einer Dosis von 0,01 µg/kg KG/d eine DNA-Adduktbildung von 1,6–8,8 Addukten/10<sup>8</sup> Nukleotiden (50th–95th Perzentil) voraus. Nimmt man eine Dosis von 0,07 µg/kg

## 2 Theoretische Grundlagen

KG/d an wird eine Bildung von 11–63 Addukte/ $10^8$  Nukleotiden vorausgesagt. Bei Nagern wird eine erhöhte Tumorzinzidenz ab 188–500 Addukte/ $10^8$  Nukleotiden in der Leber beobachtet. Somit liegen die Adduktlevel bei einer erwarteten täglichen Aufnahme von Estragol von 0,01  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG/d deutlich unter der Anzahl von Addukten, die mit der Bildung von Tumoren bei Nagern in Verbindung gebracht werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Estragol im Bezug auf die Kanzerogenität durch Umweltfaktoren eine geringere Rolle spielen könnte. (Punt et al., 2016) Die zuvor beschriebenen humanen Modelle waren auf Kaukasier ausgelegt. Da es in verschiedenen ethnischen Gruppen zu Unterschieden in der Aktivität Fremdstoff-metabolisierender Enzyme kommt, wurde ein Vergleich von Kaukasier und Chinesen mittels PBBK-Modeling durchgeführt. In beiden Gruppen wurde als Hauptweg für den Metabolismus die Epoxidierung identifiziert. Bei der Metabolisierung von 1'-Hydroxyestragol ist ebenfalls in beiden Gruppen die Entgiftung über die Bildung von 1'-Oxoestragol der Hauptweg, wobei in beiden Populationen auch die Sulfonierung eine Rolle spielt. Das Modell sagte bei einer Dosis von 0,01 mg/kg KG voraus, dass bei Chinesen 43 % der Dosis zu 1'-Hydroxyestragol metabolisiert wird, was vergleichbar mit der Vorhersage für Kaukasier ist. Bei einer hohen Dosis von 300 mg/kg KG sagt das Modell eine um die Hälfte reduzierte Bildung von 1'-Hydroxyestragol für Chinesen (13 %) im Vergleich zu Kaukasier (25 %) voraus. Bei der Bildung von 1'-Sulfoxyestragol konnte bereits bei einer geringen Dosis von 0,01 mg/kg KG in der chinesischen Population eine 4,5fache niedrigere Bildung vorhergesagt werden, wobei in der Chinesen Population 0,02 % der Dosis und in der kaukasischen Population 0,09 % der Dosis zu 1'-Sulfoxyestragol metabolisiert werden. Mit steigender Dosis wird dieser Unterschied zwischen den beiden ethnischen Gruppen noch deutlicher. Der Effekt wird auf einen Polymorphismus von SULT1A1 zurückgeführt. (Ning et al., 2017)

### **2.2.8 Vergleich zu anderen Phenylpropanoiden**

In HepG2-Zellen konnte mittels  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling im Vergleich zu anderen PP für Estragol das stärkste DNA-Bindungsvermögen gezeigt werden. Die Adduktlevel nahmen von Estragol über Methyleugenol, Safrol/Myristicin zu verschiedenen Apiolderivaten ab. Auffällig war, dass bei der niedrigsten Testkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  die DNA-Adduktlevel von Methyleugenol höher waren als von Estragol. Bei höheren Konzentrationen zeigt Estragol das stärker DNA-Bindungsvermögen. (Zhou et al., 2007)

Nach 24stündiger Behandlung von CD-1-Mäusen mit verschiedenen PP konnte mittels  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling gezeigt werden, dass Estragol, Safrol und Methyleugenol ein stärkeres DNA-Bindungsvermögen aufwiesen als andere PP wie z. B. Myristicin, Dillapiol, Petersiliencampfer, Elemicin, Anethol, Allylbenzen oder Isosafrol. Bei der Behandlung mit Eugenol konnten keine Addukte nachgewiesen werden (Randerath et al., 1984). Dabei lässt sich die Tendenz erkennen, dass 1'-propenylische PP stärker an die DNA binden als allylische PP.

Nach Behandlung von Mäusen konnte mittels  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling gezeigt werden, dass neben Estragol auch Safrol und Methyleugenol vier DNA-Addukte in der Leber bildeten. Myristicin

## 2 Theoretische Grundlagen

bildet unter den gleichen Bedingungen zwei DNA-Addukte in der Leber von Mäusen, während Anethol, Elemicin und zwei Apiolderivate jeweils ein DNA-Addukt bildeten. Methyleugenol ( $72,7 \pm 10,7$  Addukte/mg DNA nach 23 Tagen) bildete, gefolgt von Estragol ( $30,0 \pm 4,2$  Addukte/mg DNA nach 23 Tagen) und Safrol ( $14,7 \pm 2,8$  Addukte/mg DNA nach 23 Tagen) die meisten DNA-Addukte. (Phillips et al., 1984)

Eine Studie untersuchte die Kanzerogenität verschiedener PP in Mäusen. Es konnte gezeigt werden, dass Methyleugenol, Estragol und Safrol ein ähnliches kanzerogenes Potential in Mäusen haben. Im Vergleich dazu zeigen Apiolderivate, Myristicin, Elemicin und Eugenol keine Kanzerogenität in männlichen Mäusen. Dieser Effekt scheint vor allem auf die Anzahl und Position von Methoxy- und Methylenedioxy-Gruppen zurückzuführen zu sein. (Miller und Miller, 1983)

Untersuchungen von embryonalen Truthahnlebern nach der Inkubation mit verschiedenen PP mittels Comet-Assay zeigten, dass alle getesteten 1'-propenylischen PP (Anethol, Methyleugenol, Isoeugenol) nicht zu einer Erhöhung der *Tail*-Intensität führten. Zusätzlich wurden die allylischen PP Safrol, Methylisoeugenol, Estragol, Myristicin, Elemicin, und Eugenol getestet. Von den allylischen PP waren Estragol und Elemicin positiv im Comet-Assay, während die anderen PP nicht zu einer Erhöhung der *Tail*-Intensität. Durch  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling konnte gezeigt werden, dass alle allylischen PP, mit Ausnahme von Eugenol, DNA-Addukte bildeten. Dabei unterscheiden sich die Anzahl der gebildeten Addukte, wobei Estragol mit vier verschiedenen Addukten die meisten Addukte bildete. Von den getesteten 1'-propenylischen PP konnten für Anethol zwei DNA-Addukte nachgewiesen werden, während Methylisoeugenol und Isoeugenol keine Addukte bildeten. (Kobets et al., 2016)

### **2.3 Leber**

#### **2.3.1 Allgemeines Leber**

Die Leber ist als Hauptorgan für den Metabolismus von Fremdstoffen verantwortlich. Fremdstoff-metabolisierende Enzyme sind neben der Leber auch in anderen Organen wie der Niere, Lunge und dem Darm zu finden. Der Anteil dieser Organe am Metabolismus ist im Vergleich zu Leber gering, kann allerdings abhängig von der Absorptionsroute variieren. (Efferth, 2006; Hengstler, 2017)

Die menschliche Leber wird in den rechten Leberlappen (*Lobus dexter*), linken Leberlappen (*Lobus sinister*), *Lobus caudatus* und *Lobus quadratus* unterteilt, die weiter in Segmente unterteilt werden können. Dabei weist die menschliche Leber eine nicht gelappte Struktur auf. Versorgt wird die Leber zu 75–80 % durch die Pfortader (*Vena portae*) und zu 20–25 % durch die Leberarterie (*Arteria hepatica*). Das Blut der *Vena portae* transportiert die aus dem Magen, Dünndarm, Dickdarm und oberen Teil des Mastdarms aufgenommenen Nährstoffe und Fremdstoffe in die Leber, während die *Arteria hepatica* für die Sauerstoffversorgung der Leber verantwortlich ist. Durch Kapillaren gelangt das Blut in die Sinusoide und wird über die Lebervene (*Vena hepatica*) und die Hohlvene abgeführt. (Vaupel et al., 2015; Kogure et al., 1999; Kruepunga et al., 2019) Die

## 2 Theoretische Grundlagen

Sinusoide besitzen ein fenestriertes Endothel, durch das ein Stoffaustausch von Molekülen ( $< 250$  Da) in dem interstitiellen Raum zwischen Endothel und Hepatozyten möglich ist (Wätjen und Kahl, 2013). Das sinusoidale Gefäßsystem ist eng mit den Gallencanaliculi assoziiert. Eine Betrachtung der räumlichen Verhältnisse zeigt, dass 25 % der Oberflächen der Hepatozyten Kontakt zum Sinusoid und 9 % Kontakt zum Gallencanaliculus haben. (Hengstler, 2017)

Abbildung 5 gibt einen vereinfachten Überblick über die Feinstruktur der menschlichen Leber.

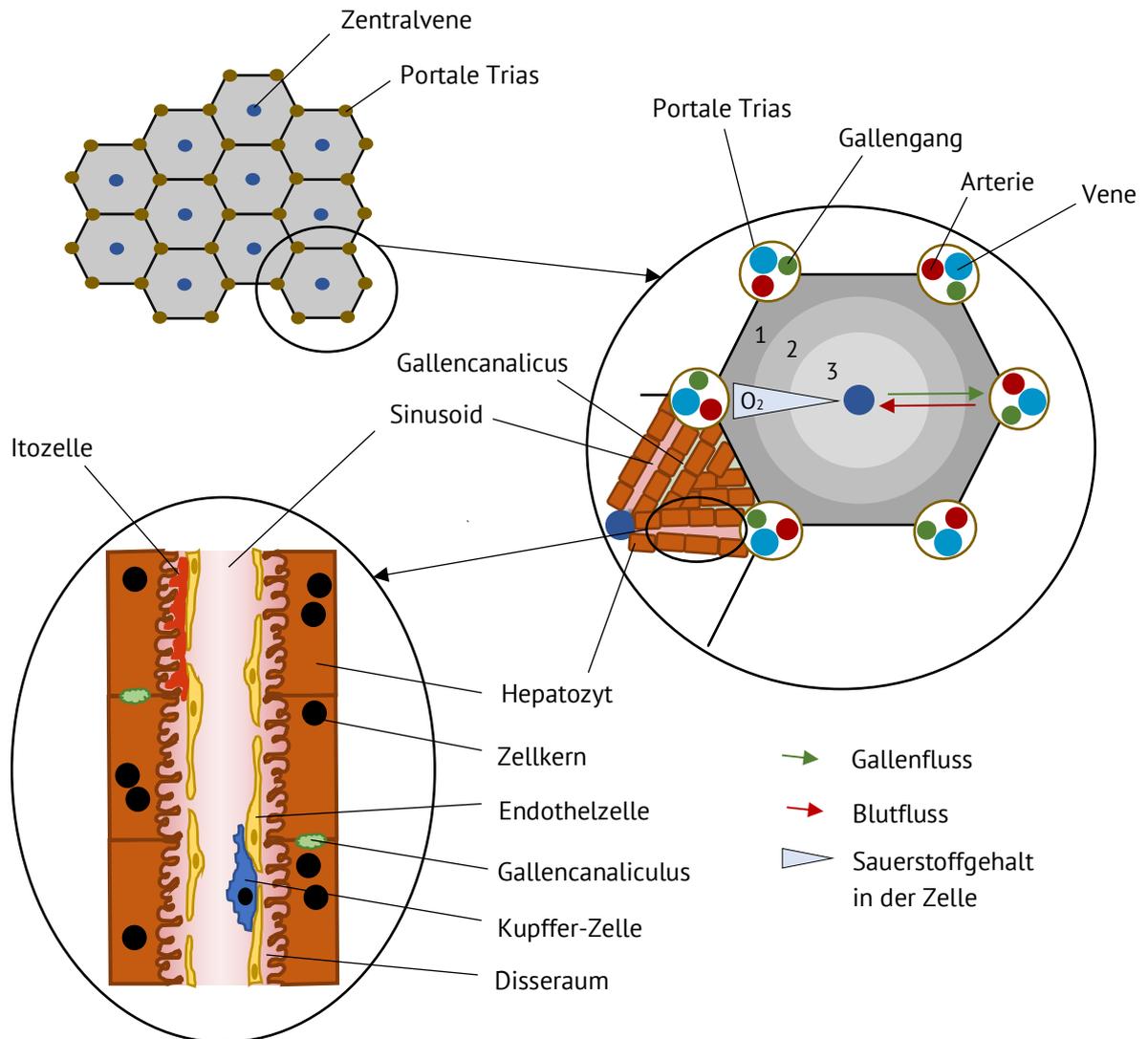


Abbildung 5: Feinstruktur der Leber nach (Hengstler, 2017; Wätjen und Kahl, 2013)

Nach dem mikrozirkulatorischen Konzept des Leber-Acinus sind die Hepatozyten beerenförmig um die Zentralvene angeordnet. Je nach Nähe zu den Blutgefäßen wird das Parenchym bezüglich der Sauerstoffkonzentration und Konzentration verschiedener Enzyme in Zonen eingeteilt. Die höchste Aktivität an Cytochrom-P450-Enzymen, die unter anderem am Fremdstoffmetabolismus beteiligt sind, ist in der sauerstoffarmen zentrallobulären Region (Zone 3) zu finden. Dieser Bereich ist außerdem arm an Glutathion, welches eine wichtige Rolle bei Entgiftungsreaktionen spielt. (Wätjen und Kahl, 2013)

## 2 Theoretische Grundlagen

Neben den Hepatozyten spielen in der Leber auch Itozellen und Kupferzellen eine wichtige Rolle. Itozellen fungieren in der gesunden Leber als Vitamin A Speicher. Nach Leberschädigungen sind sie an der Regeneration sowie Bildung von Fibrosen beteiligt. (Hengstler, 2017)

Bei der Rattenleber handelt es sich um eine gelappte Leber, bei der im Gegensatz zur Humanleber die einzelnen Leberlappen klar voneinander getrennt sind. Es wird in den rechten und linken lateralen Leberlappen, den rechten und linken medialen Leberlappen und den caudalen Leberlappen unterschieden. Im Gegensatz zum Menschen besitzt die Ratte allerdings keine Gallenblase. (Kruepunga et al., 2019; Kogure et al., 1999)

### **2.3.2 In-vitro-Testmodelle Leber**

Um die Lebertoxizität von Substanzen vorherzusagen, sowie deren Metabolismus zu untersuchen können verschiedene *in-vitro*-Modelle eingesetzt werden. Die Spannweite reicht von isolierten Enzymen bis zu perfundierten Organen. Dabei unterscheiden sich die Modelle im Hinblick auf die Komplexität und die Übertragbarkeit auf die *in-vivo*-Situation. Tabelle 10 gibt einen Überblick über die wichtigsten *in-vitro*-Modelle. (Brandon et al., 2003)

Tabelle 10: Vor und Nachteile verschiedener *in-vitro*-Testmodelle für die Lebertoxizität nach Brandon et al. (2003)

	Supersomes/isolierte Enzyme	Mikrosomen	S9-Mix	(transfizierte) Zelllinien	primäre Hepatozyten	Leberschnitte	perfundierte Leber
Verfügbarkeit	sehr gut						schwierig
Komplexität	gering						hoch
Handhabung	leicht						kompliziert
ethische Akzeptanz	hoch						gering
Vergleichbarkeit mit <i>in vivo</i>	gering						niedrig

Bei **Supersomes** handelt es sich um rekombinante Enzyme, die in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen produziert werden können. Supersomes können vor allem für die Untersuchung der Rolle spezifischer CYP450-Enzyme im Fremdstoffmetabolismus eingesetzt werden (Gonzalez und Korzekwa, 1995). **Mikrosomen** sind Membranvesikel, die sich beim Homogenisieren von Zellen aus den Membranen des endoplasmatischen Retikulums, an welches viele Enzyme des Phase-I-Metabolismus gebunden sind, bilden. Die Mikrosomen können durch Zentrifugation sedimentiert und so von sonstigen Zellbestandteilen abgetrennt werden. Durch Zugabe entsprechender Kofaktoren besitzen Mikrosomen Fremdstoff-metabolisierende

## 2 Theoretische Grundlagen

Eigenschaften. Daher können Mikrosomen in *in-vitro*-Systemen zur Simulierung des Fremdstoffmetabolismus eingesetzt werden. Neben dem Einsatz von Mikrosomen in Cokultur mit Zellsystemen können Mikrosomen alleine auch zur Untersuchung des Metabolismus herangezogen werden. (Fuhrmann, 2006; Dekant, 2017)

Bei der **S9-Fraktion** handelt es sich um die Leberzellfraktion, die den Überstand einer Zentrifugation bei 9.000 g bildet. Die S9-Fraktion enthält die Membranen des endoplasmatischen Retikulums und die zytosolischen Bestandteile der Zellen. Diese enthalten unter anderem CYP450 und wichtige Enzyme des Phase-II-Metabolismus. Der S9-Mix wird aus der S9-Fraktion, NADP<sup>+</sup> und Isocitrat bzw. Glucose-6-phosphat zusammengesetzt. CYP450 benötigt NADPH als Cofaktor, welches aus NADP<sup>+</sup> und Isocitrat bzw. Glucose-6-phosphat (Substrat für Enzyme) durch in der S9-Fraktion enthaltenen Enzyme generiert wird. Problematisch an der Verwendung des S9-Mix ist, dass die metabolische Aktivierung außerhalb der Zelle stattfindet. Reaktive und kurzlebige Metaboliten gelangen daher nicht in die Zelle, wodurch Wechselwirkungen in der Zelle nicht erfasst werden können. Zudem wirkt der S9-Mix oft zytotoxisch auf Säugerzellen und das Zellsystem kann nur einen begrenzten Zeitraum mit S9-Mix inkubiert werden. (Andrae und Martus, 2017)

Gängige immortalisierte **Zelllinien** sind HepG2-Zellen oder HepaRG-Zellen, wobei es sich in beiden Fällen um humane Zelllinien handelt. HepG2-Zellen exprimieren viele leberspezifische Gene, wobei die Expression von Phase-I- und Phase-II-Enzymen abhängig von der Passage und den Kulturbedingungen stark variieren kann (Soldatow et al., 2013). Im Vergleich zu primären human Hepatozyten ist die Aktivität von CYP450-Enzymen verringert und Phase-II-Enzyme werden überexprimiert (Knasmüller et al., 1998; Gerets et al., 2012). HepaRG-Zellen exprimieren ebenfalls viele leberspezifische Enzyme, darunter auch Phase-I- und Phase-II-Enzyme, Kernrezeptoren und verschiedene Transporter. Die Expression dieser Enzyme ist geringer als in primären humanen Hepatozyten. Außerdem können die Zellen in Hepatozyten oder Gallengangzellen differenzieren. (Soldatow et al., 2013)

**Primäre Hepatozyten** können in unterschiedlichen Kulturbedingungen (z. B. Suspensionskultur, Monolayer, mehrdimensionale Kultursysteme) eingesetzt werden. Je nach Kultursystem unterscheiden sich die Anwendungen bei der Untersuchung von toxischen Effekten (Soldatow et al., 2013). Primäre Hepatozyten werden vor allem für die Testung kurzzeitiger Effekte eingesetzt, da sie schnell die leberspezifischen Eigenschaften verlieren (Zurlo und Arterburn, 1996). Die Isolation der Zellen führt zur Schädigung verschiedener Zellstrukturen, wobei die Kollagenaseisolation unter anderem zu oxidativem Stress führt. In Monolayerkulturen von primären Hepatozyten können die Hauptfunktionen der Leberzellen für 24–72 h erhalten werden, während in einer Suspensionskultur die CYP450-Aktivität innerhalb von 4–8 h stark abnimmt. Monolayerkulturen können unter anderem für die Induktion und Inhibition von Enzymen genutzt werden und finden Anwendung bei der Untersuchung von Unterschieden im Metabolismus sowohl zwischen verschiedenen Spezies als auch verschiedenen Individuen einer Spezies. Es kommt allerdings zu einer Veränderung der Zellmorphologie, Genexpression und

Dedifferenzierung der Zellen (Soldatow et al., 2013). Verschiedene Studien zeigen, dass die EROD- und die BROD-Aktivität primärer Rattenhepatozyten innerhalb der ersten 48 h in der Kultur sehr stark abnimmt, was auf eine schnelle Verminderung der CYP450-Aktivität hindeutet (Zurlo und Arterburn, 1996; Gao et al., 2020). Durch 2D- oder 3D-Kultursysteme können die leberspezifischen Eigenschaften über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden (Soldatow et al., 2013).

Bei **Leberschnitten** handelt es sich um ein *ex-vivo*-Testsystem, das alle Zelltypen der Leber und die den lebertypischen Aufbau wiedergibt (Palma et al., 2019). Dadurch sind Leberschnitte gut geeignet für die Untersuchung von Zelltoxizität aber auch der zonalen Toxizität und der Untersuchung von Mechanismen. Die *in-vitro/in-vivo*-Korrelation dieses Testmodells ist in den ersten 24 h besser als die von Zelllinien oder primären Zellen. Allerdings ist nach 48–72 h eine Nekrose der Zellen zu beobachten. Außerdem kommt es zu einer Abnahme der Enzymaktivität von Phase-II-Enzymen. Die metabolische Aktivität sowie die intrinsische Clearance sind geringer als die in primären Hepatozyten. (Soldatow et al., 2013)

### **2.4 Fremdstoffmetabolismus**

In der Toxikokinetik unterliegen die Fremdstoffe dem (L)ADME- (*Liberation, Adsorption, Distribution, Metabolism, Excretion*) Konzept. Je nach Art der Exposition muss der Fremdstoff erst freigesetzt werden (*Liberation*) und wird dann von Körper aufgenommen (*Adsorption*). Nach der Aufnahme in die Blutbahn wird der Fremdstoff in den verschiedenen Geweben verteilt (*Distribution*), wobei die Verteilung im Gewebe abhängig von der Hydrophilie bzw. Lipophilie des Fremdstoffes ist. Im Gewebe werden die Fremdstoffe bei Bedarf metabolisiert und über die Lunge, den Urin bzw. die Fäzes ausgeschieden (*Excretion*). Dabei bestimmen die Liberation und Adsorption die Bioverfügbarkeit einer Substanz, während der Metabolismus und die Exkretion die Clearance darstellen. (Arand und Oesch, 2013; Greim, 2017)

Die metabolische Clearance, auch Biotransformation beschreibt die Umwandlung lipophiler Fremdstoffe sowie körpereigener lipophiler Substanzen in meist hydrophilere und somit wasserlösliche Metaboliten. Die Umwandlung lipophiler Fremdstoffe in wasserlösliche Metaboliten ist essentiell für die renale und biliäre Elimination, da es sonst zur Anreicherung der Fremdstoffe im Körper kommen würde. Die Metabolisierung von Fremdstoffen wird in Phase I und Phase II eingeteilt. In der Phase I findet eine Funktionalisierung z. B. durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse der Fremdstoffe statt, wobei funktionelle Gruppen in das Molekül eingeführt bzw. freigesetzt werden. Dieser Schritt ist nötig, da zur späteren Konjugation mit hydrophilen endogenen Bausteinen eine entsprechende funktionelle Gruppe vorhanden sein muss. Die Phase-I-Metaboliten können nach ihrer funktionellen Gruppe in elektrophile (z. B. Epoxid,  $\alpha$ - $\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindungen) und nukleophile Verbindungen (z. B. Hydroxyl-, Sulfhydryl-, Carboxylgruppen) unterschieden werden. Elektrophile Verbindungen können unter anderem mit Proteinen, RNA oder DNA reagieren, wodurch ein zytotoxisches oder mutagenes Potential entstehen kann. Nukleophile Metaboliten reagieren nicht mit elektronenreichen Strukturen der Zelle, können aber zu Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen führen und verursachen dadurch

## 2 Theoretische Grundlagen

rezeptorabhängige toxikologische Wirkungen. Zu den wichtigsten Enzymen des Phase-I-Metabolismus gehören CYP450-Enzyme, die die Übertragung von Sauerstoff auf das Substrat katalysieren. Daneben spielen auch flavinabhängige Monooxygenasen, Dehydrogenasen, Hydrolasen, Reduktasen und Esterasen eine Rolle. (Arand und Oesch, 2013; Dekant, 2017)

Bei Phase-II-Reaktionen handelt es sich um Konjugationsreaktionen, bei denen die in Phase I entstandenen funktionellen Gruppen mit stark polaren Verbindungen konjugiert werden. Zu den wichtigsten Phase-II-Reaktionen gehören Glucuronidierungen, Sulfonierungen, Acetylierungen oder die Konjugationen mit Glutathion bzw. Aminosäuren. Dadurch kommt es meist zu einer Inaktivierung und einer verbesserten Ausscheidung des Fremdstoffes. (Arand und Oesch, 2013; Efferth, 2006; Freissmuth, 2016)

Zum Teil wird die Ausscheidung der Metaboliten, welche teilweise über aktive Transportprozesse stattfindet, als Phase III des Fremdstoffmetabolismus bezeichnet (Efferth, 2006). Einen Überblick über die Toxikokinetik und die am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Enzyme gibt folgende Abbildung:

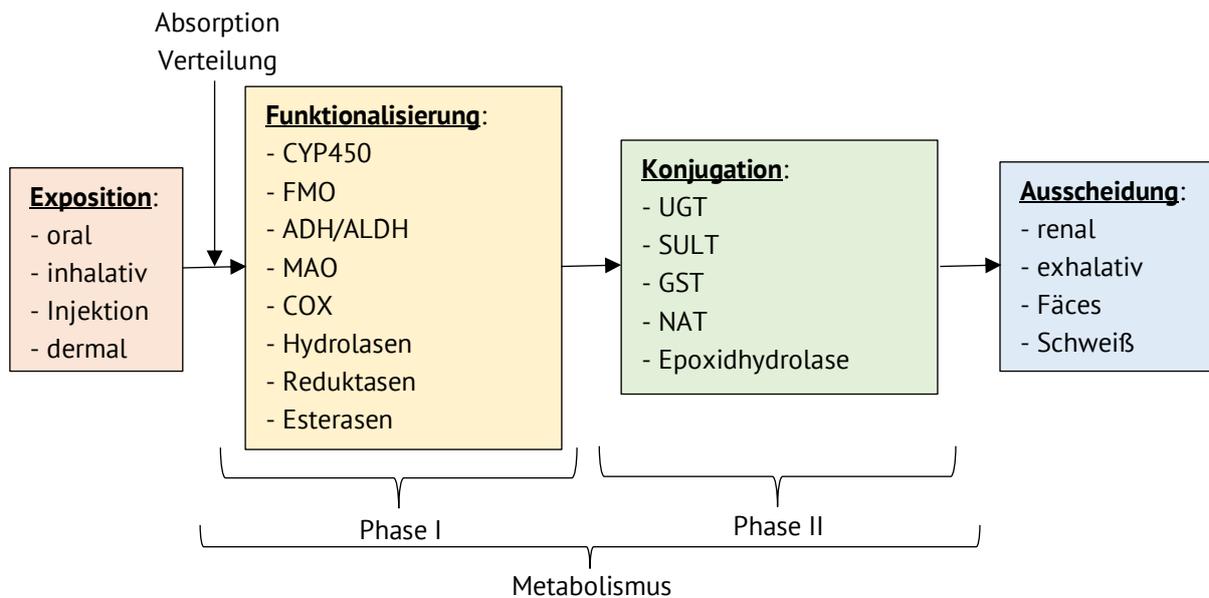


Abbildung 6: Übersicht über Fremdstoffmetabolismus und beteiligte Enzyme) CYP450: Cytochrom P450, FMO: Flavinabhängige Monooxygenasen, ADH: Alkoholdehydrogenase, ALDH: Aldehyddehydrogenase, MAO: Monoaminoxidase, COX: Cyclooxygenase, UGT: UDP-Glycosyltransferase, SULT: Sulfotransferase, GST: Glutation-S-Transferase, NAT: *N*-Acetyltransferase)

Der Großteil des Fremdstoffmetabolismus findet in der Leber statt. Organe wie der Darm, die Niere und die Lunge exprimieren ebenfalls typische Fremdstoff-metabolisierende Enzyme und tragen dadurch zu einem geringen Teil zum Metabolismus bei. Da nach oraler Absorption die Fremdstoffe erst die Leber passieren, kann es der *frist-pass*-Effekt auftreten. Dabei werden Fremdstoffe metabolisiert, bevor es zu einer Verteilung im Körper kommt. (Arand und Oesch, 2013; Efferth, 2006)

Neben der Erhöhung der Wasserlöslichkeit ist die Aufgabe des Metabolismus reaktive Fremdstoffe und Metaboliten zu Inaktivieren (Detoxifizierung). Neben der Detoxifizierung kann es durch

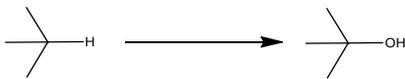
Reaktionen des Fremdstoffmetabolismus auch zur Aktivierung von Fremdstoffen kommen. Dies ist im Fall von *prodrugs* erwünscht, kann allerdings auch zur Toxifizierung von Fremdstoffen führen. (Arand und Oesch, 2013; Efferth, 2006)

### 2.4.1 CYP450

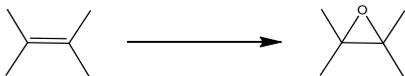
Bei Cytochrom-P450-Enzymen handelt es sich um eine Subfamilie von Häm-Proteinen, die als Monooxygenasen fungieren. Von den ubiquitär vorkommenden Enzymen sind über 8.000 Isoformen bekannt, die meist ein Molekulargewicht von 45–60 kDa aufweisen. Damit stellen sie die größte Genfamilie bei Tieren, Pflanzen und Mikroben dar. Im menschlichen Genom sind 57 funktionelle CYP450-Enzyme codiert, die in 15 Familien eingeteilt werden. Daneben gibt es weitere funktionslose Pseudogene. Namensgebungen für die Enzyme ist das charakteristische Absorptionsmaximum von 450 nm, wenn das Eisenatom im aktiven Zentrum mit Kohlenmonoxid koordiniert wird. (Sono et al., 1996; Arand und Oesch, 2013; Efferth, 2006; Freissmuth, 2016)

Einen Überblick über die wichtigsten CYP450-katalysierten Reaktionen gibt folgende Übersicht:

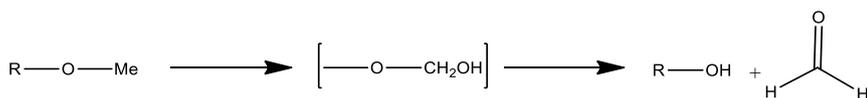
1. Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffen



2. Epoxidierung von Alkanen



3. O-Desalkylierung



4. Oxidation von Alkoholen

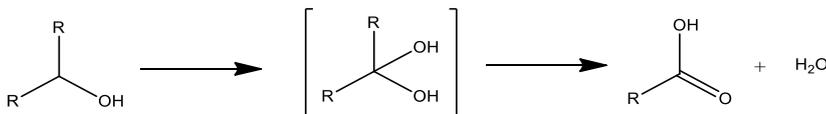


Abbildung 7: ausgewählte, für den Fremdstoffmetabolismus relevante durch CYP450-katalysierte Reaktionen (Sono et al., 1996)

Lokalisiert sind die Enzyme in der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Dort transferiert CYP450 in der Regel ein Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff auf das Akzeptormolekül. Das zweite Sauerstoffatom wird unter NADPH-Verbrauch zu Wasser reduziert. Im Körper spielen CYP450-Enzyme bei der Oxidation von Fremdstoffen eine große Rolle. Andere CYP450-Enzyme sind an der Biosynthese von Steroidhormonen, Vitaminen, Prostaglandinen oder Leukotrienen beteiligt. (Denisov et al., 2009; Arand und Oesch, 2013)

### 2.4.1.1 Einteilung und Vorkommen von CYP450-Enzymen

CYP450-Enzyme werden in 18 Familien (36 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenz) und weiter in Unterfamilien (mehr als 68 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenz) unterteilt. Die am Fremdstoffmetabolismus beteiligten CYP450-Enzymen gehören vor allem den CYP-Familien 1–3 an. (Nebert und Gonzalez, 1987; Arand und Oesch, 2013).

Tabelle 11 gibt einen Überblick über das Vorkommen und die Substratspezifität der wichtigsten am Fremdstoffmetabolismus beteiligten CYP450.

Tabelle 11: Vorkommen verschiedener CYP450-Enzyme (Arand und Oesch, 2013; Dekant, 2017)

Enzym	Organ	Substrat
CYP1A2	viele (nach Induktion)	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)
CYP1A2	Leber	aromatische Amine, heterozyklische Amine, PAK, Coffein
CYP2A6	Leber/viele	Nitrosamine
CYP2B6	Leber	Cyclophosphamid, Nikotin
CYP2C8	Leber/Dickdarm	Tolbutamid, Retinoide
CYP2C9	Leber/Niere	Diclofenac, Ibuprofen, Tolbutamid
CYP2C19	Leber	(s)-Mephenytoin, Omeprazol
CYP2D6	Leber/Dickdarm/Niere	Bufuralol, Debrisoquin, Spartein
CYP2E1	Leber/Dickdarm/Leukozyten	kleine Moleküle wie Tetrachlorkohlenstoff, Ethanol, Dimethylnitrosamin
CYP3A4	Darm/Leber	Aflatoxine, PAK

### 2.4.1.2 Katalytischer Zyklus

Der katalytische Zyklus der Monooxygenierung durch CYP450-Enzyme ist in Abbildung 8 dargestellt. Zu Beginn des Zyklus wird das Wassermolekül, welches in der inaktiven Form als Ligand des Eisen(III)-Atom dient, durch ein hydrophobes Substrat verdrängt. Dadurch kommt es zu einem Übergang der Koordination von *low-spin* zu einem *high-spin*-Zustand des Eisenatoms. Durch Ferredoxin wird das Eisen(III) zu Eisen(II) reduziert, an welches sich im *high-spin*-Zustand ein Sauerstoffmolekül anlagert. Dabei bildet sich entweder ein Eisen-O<sub>2</sub>-Komplex (nicht dargestellt) oder ein Eisen-Superoxid-Komplex. Im Anschluss werden zwei Protonen eingeführt, wobei erst ein Hydroperoxid-Ligand entsteht. Nach Anlagerung eines weiteren Protons wird Wasser abgespalten, wodurch ein Eisen(IV)-Oxo-Intermediat entsteht. Durch dieses Intermediat wird das Substrat monooxygeniert. (Sono et al., 1996; Herres-Pawlis und Klüfers, 2017)

## 2 Theoretische Grundlagen

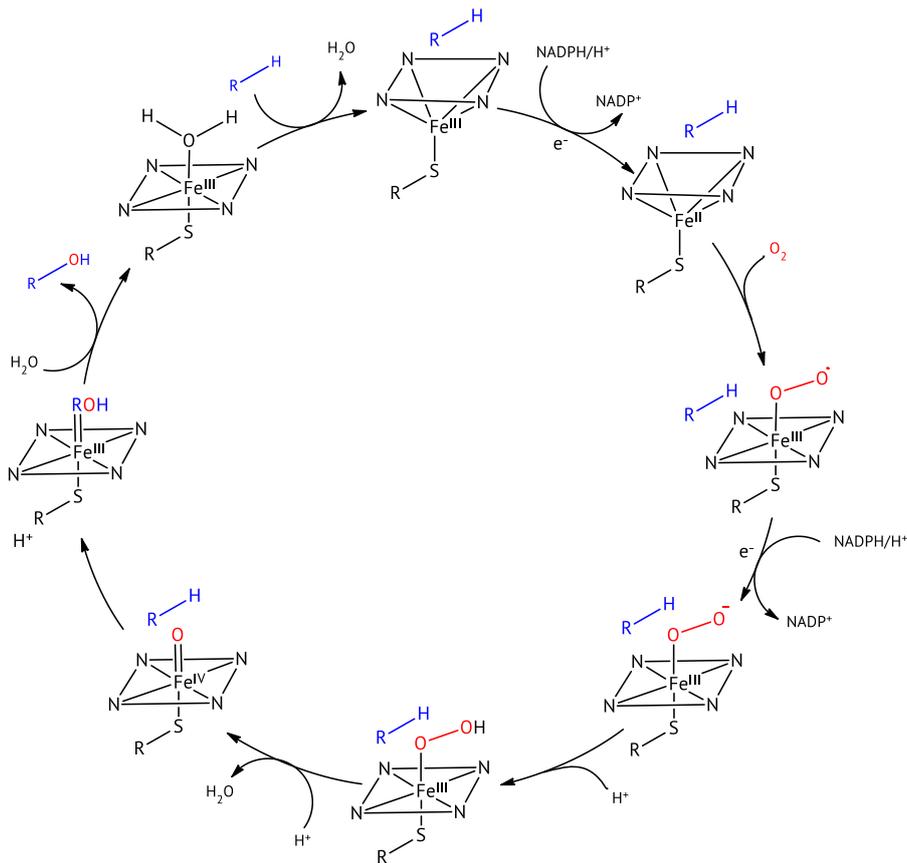


Abbildung 8: Katalytischer Zyklus der Monooxygenierung durch CYP450 (Sono et al., 1996; Lewis und Pratt, 1998; Arand und Oesch, 2013; Herres-Pawlis und Klüfers, 2017)

### 2.4.1.3 Beschreibung ausgewählter CYP450-Enzyme

Die CYP1A-Familie umfasst CYP1A1, welche vor allem extrahepatisch exprimiert wird, und CYP1A2, welches vor allem in der Leber zu finden ist. **CYP1A2** macht in der Leber ca. 4–16 % des CYP450-Pools aus und spielt eine große Rolle bei der metabolischen Aktivierung von Prokanzerogenen wie heterozyklischen aromatischen Arminen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. Ca. 9 % aller Arzneimittel werden über CYP1A2 metabolisiert. Auch eine große Anzahl endogener Substrate wie Retinoide, Melanoidine und Steroide werden durch CYP1A2 metabolisiert. Durch Xenobiotika, die als Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR)-Liganden fungieren, kann CYP1A2 induziert werden. Zusätzlich kann die Induktion auch über AhR unabhängige Wege z. B. durch Omeprazol erfolgen. (Murray et al., 1993; Zanger und Schwab, 2013; Ito et al., 2015; Al-Ahmad et al., 2017)

**CYP2A6** wird hauptsächlich in der Leber exprimiert und macht dort ca. 4 % der CYP450-Enzyme aus. Im Vergleich zu Kaukasiern sind bei japanischen Probanden in der Leber geringer CYP2A6-Proteinlevel und Proteinaktivitäten zu beobachten. Sowohl die Variation der Genexpression als auch der Enzymaktivität sind auf Polymorphismen des CYP2A6-Gens zurückzuführen. Dabei ist eine geringe Enzymaktivität vor allem bei Asiaten (ca. 50 %) zu finden während Kaukasier zu 9 % eine geringe Enzymaktivität aufweisen. (Zanger und Schwab, 2013)

Von der **CYP2C-Subfamilie** spielen vor allem CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 und CYP2C19 eine Rolle im humanen hepatischen Fremdstoffmetabolismus. CYP2C9 und CYP2C19 metabolisieren bis zu 15 % der Arzneimittel. Die andern beiden Enzyme spielen eine eher untergeordnete Rolle (Zangouras et al., 1981; Botton et al., 2019). Neben der Leber werden diese Enzyme auch in anderen Organen wie der Niere, dem Darm oder der Lunge exprimiert. Durch Polymorphismen und Unterschiede in der Induzierbarkeit kann es bei dieser CYP450-Familie zu großen intra-individuellen Unterschieden kommen. (Chen und Goldstein, 2009)

Das einzige aktive Enzym der CYP2D-Familie ist **CYP2D6**, wobei die Expression des Enzyms vor allem in der Leber stattfindet. CYP2D6 ist an dem Metabolismus einer Vielzahl von Fremdstoffen beteiligt (Zanger und Schwab, 2013). Moleküle mit einem basischen Stickstoff zählen zu den bevorzugten Substraten von CYP2D6. Durch Polymorphismen kann man Personen in *poor* und *rapid/ultra rapid metabolizer* unterscheiden, wobei ca. 7 % der Bevölkerung eine geringe Enzymaktivität aufweisen, was bei Arzneistoffen zu einer höheren Halbwertszeit führen kann. (Arand und Oesch, 2013)

Bevorzugte Substrate von **CYP2E1** sind kleine und hydrophobe Moleküle. Die Expression findet vor allem in der Leber statt, aber CYP2E1 ist auch in anderen Organen, unter anderem im Gehirn zu finden. Mögliche endogene Substrate sind Aceton oder Fettsäuren, während aus toxikologischer Sicht vor allem Substrate wie Ethanol, Tetrachlorkohlenstoffe, Benzene oder Paracetamol von Bedeutung sind. (Zanger und Schwab, 2013; Lu und Cederbaum, 2008; Arand und Oesch, 2013) Einige Prokanzerogene wie Nitrosamine können durch CYP2E1 aktiviert werden. Die CYP2E1-Expression kann durch Ethanol induziert werden und ist vermutlich am hepatotoxischen Effekt des Ethanols beteiligt. (Lu und Cederbaum, 2008)

### **2.4.2 Alkoholdehydrogenase/Aldehyddehydrogenase**

Bei der Oxidation von Alkoholen und Aldehyden spielen Dehydrogenasen eine wichtige Rolle. Alkohole werden durch **Alkoholdehydrogenasen** (ADH) zu dem entsprechenden Aldehyd oxidiert. In der Leber werden vor allem ADH der Klasse-1-Gene *ADH1-3* exprimiert. Im Gegensatz zu CYP450 liegen ADH im Zytosol vor. (Efferth, 2006; Dekant, 2017)

Aldehyde werden durch die **Aldehyddehydrogenase** (ALDH) zu Carbonsäuren oxidiert. ALDH werden in 9 Familien mit insgesamt 16 Mitgliedern eingeteilt. Sie können sowohl im Zytosol als auch an Membranen gebunden vorliegen (Dekant, 2017). Für den Metabolismus ist die mitochondriale ALDH2 verantwortlich. Durch einen Polymorphismus kann die Aktivität der ALDH2 verringert sein, was unter anderem zu einer geringen Alkoholverträglichkeit führt. (Freissmuth, 2016)

### 2.4.3 Sulfotransferasen

Sulfotransferasen übertragen Sulfogruppen ( $-SO_3^-$ ) auf nukleophile Akzeptormoleküle. Als Cosubstrat fungiert 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS). SULTs werden in die membrangebundenen SULTs und die löslichen SULTs eingeteilt. Membrangebundene SULTs sind im Golgi-Apparat lokalisiert und katalysieren die Sulfonierung von endogenen Molekülen. Für den Fremdstoffmetabolismus sind hauptsächlich lösliche SULTs verantwortlich (Arand und Oesch, 2013). Als Akzeptorgruppen fungieren z. B. Hydroxyl-, Amino-, und Carboxylgruppen. In den meisten Fällen führt die Sulfonierung zu einer Detoxifizierung des Substrates. Dabei wurden phenolische Hydroxylgruppen bevorzugt sulfoniert. (Arand und Oesch, 2013; Freissmuth, 2016)

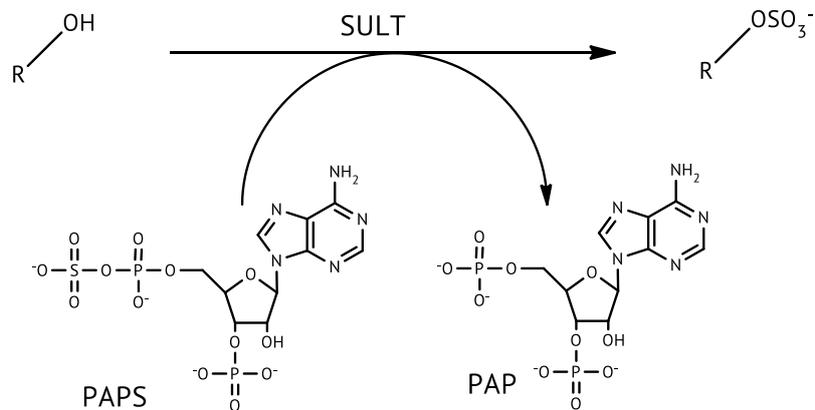


Abbildung 9: Mechanismus der Sulfonierung von Alkoholen durch SULT (PAPS: 3'-Phosphadenosin-5'-phosphosulfat, PAP: 3'-Phosphadenosin-5'-phosphat (Banoglu, 2000))

Einige der gebildeten Schwefelsäureester bilden nach Abspaltung der Sulfatgruppe toxische Metaboliten, die als Mutagene oder ultimale Kanzerogene wirken können. Dazu zählen unter anderem polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, *N*-Hydroxyarylamine oder allylische Alkohole. In die letzte Substanzklasse fallen auch PP wie Safrol oder Estragol. Die entstandenen reaktiven Verbindungen können mit der DNA und anderen nukleophilen Molekülen der Zelle reagieren. (Banoglu, 2000; Efferth, 2006)

### 2.4.4 Glutathion-S-Transferase

Glutathion-S-Transferasen (GST), die ca. 5 % des löslichen Proteins in der Leber ausmachen, konjugieren vor allem elektrophile Verbindungen mit dem Tripeptid Glutathion, welches in allen Zellen vorliegt. Dadurch werden potenziell genotoxische Verbindungen, die mit nukleophilen Strukturen der Zelle reagieren können, entgiftet. Der Mensch besitzt sechs Familien GST, wobei sich die Substratspezifität überlappt. (Arand und Oesch, 2013; Fuhrmann, 2006)

Durch die Konjugation mit Glutathion wird die Wasserlöslichkeit des Metaboliten deutlich erhöht. Nach Abspaltung von Glutaminsäure, Glycin und einer Aminogruppe (siehe Abbildung 10) entstehen Mercaptursäuren, die nach aktivem Transport renal ausgeschieden werden. (Töpfer et al., 2013; Arand und Oesch, 2013; Fuhrmann, 2006)

## 2 Theoretische Grundlagen

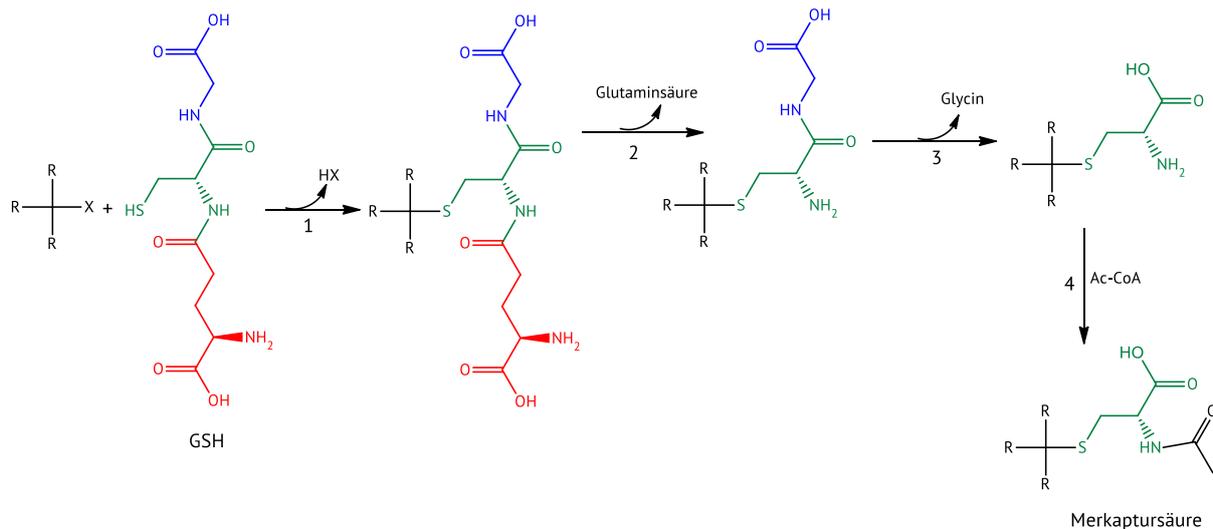


Abbildung 10: Reaktionsmechanismus der Bildung von Mercaptursäuren. (GSH: Glutathion/ $\gamma$ -Glutamyl-cysteinyl-glycin, 1: Glutathion-S-Transferase, 2:  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase, 3: Cysteinylglycylase, 4: N-Acetyltransferase (Fuhrmann, 2006; Freissmuth, 2016)

### 2.4.5 UDP-Glucuronosyltransferase

Bei der Glucuronidierung handelt es sich um die quantitativ wichtigste Phase-II-Reaktion des Fremdstoffmetabolismus, die durch UDP-Glucuronosyltransferasen katalysiert wird. UGTs werden in vielen Geweben exprimiert, wobei die meisten Isoformen sowie die höchsten Enzymkonzentrationen von UGTs in der Leber zu finden sind. Es handelt sich um membrangebundene Enzyme, die Glucuronsäure aus  $\alpha$ -D-UDP-Glucuronsäure auf das Akzeptormolekül übertragen. Als funktionelle Gruppe im Akzeptormolekül fungieren vor allem Hydroxyl- und Carboxylgruppen, in geringerem Umfang aber auch Thiol-, Amino- oder Hydroxylaminogruppen. Bei der Konjugation von Hydroxyl- und Carboxylgruppen entstehen Glucuronide des Ethertyp bzw. Estertyp. Letztere sind chemisch reaktiv, was zur Aktivierung von Fremdstoffen führen kann. (Arand und Oesch, 2013; Efferth, 2006; Dekant, 2017)

Humane UGTs werden in zwei Familien eingeteilt. UGTs besitzen zum einen wichtige endogene Funktion und sind zum anderen am Fremdstoffmetabolismus beteiligt. UGT und SULT weisen eine ähnliche Substratspezifität auf. Dabei zeigt SULT eine höhere Substrataffinität bei gleichzeitig geringer Umsetzungsrate. Mit zunehmender Substratkonzentration steigt daher der Anteil der Glucuronidierungen im Vergleich zur Sulfonierung. (Arand und Oesch, 2013)

### 2.5 Chemische Kanzerogenese

Als chemische Kanzerogene sind Substanzen definiert, die Tumore induzieren, die Tumorzinzidenz erhöhen, zu einer früheren Entwicklung von Tumoren oder einer erhöhten Multiplizität von Tumoren führen. Die chemische Kanzerogenese unterliegt einem mehrstufigen Prozess, der in die Initiation, Promotion und Progression unterteilt wird (Schwarz et al., 2013). Einen Überblick über die einzelnen Stufen der Kanzerogenese gibt Abbildung 11.

## 2 Theoretische Grundlagen

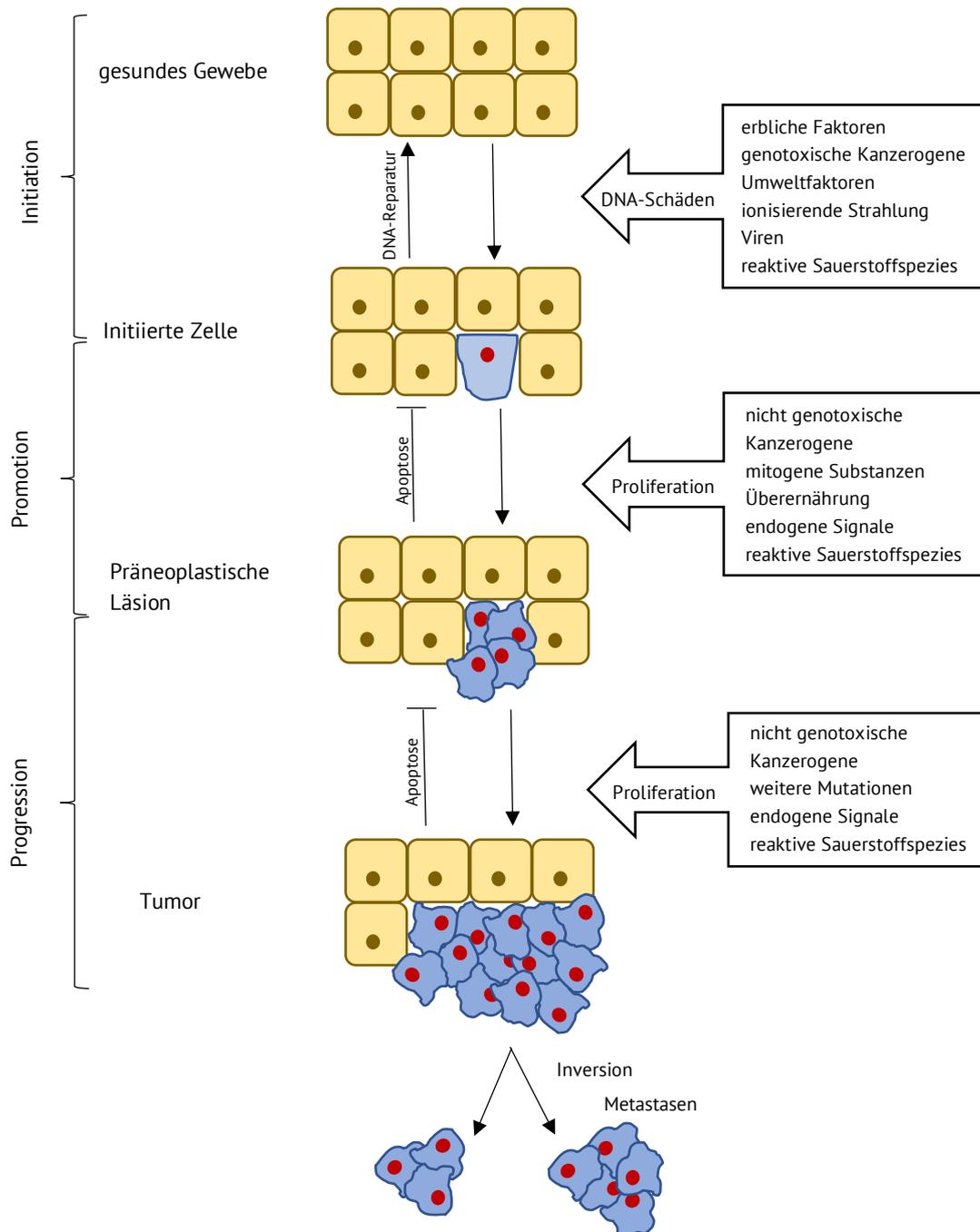


Abbildung 11: Mehrstufenmodell der chemischen Kanzerogenese. (Schwarz et al., 2013; Radford et al., 2013)

Bei der Initiation kommt es, z. B. durch genotoxische Substanzen, zu einer Mutation wachstumsregulierender Gene einer Zelle. Für die Initiation kann die einmalige Gabe der Substanz ausreichen, wobei der Mechanismus auf der Reaktivität einer Substanz bzw. deren Metaboliten mit der DNA beruht. Durch die Proliferation der betroffenen Zelle kommt es zu einer genetischen Fixierung der Mutation, welche irreversibel ist. Durch selektive Wachstumsstimulation mittels Tumorpromotoren bilden sich präneoplastische Läsionen. Die Exposition mit dem Tumorpromotor muss über einen längeren Zeitraum stattfinden. Die Tumorpromotion ist zum Teil durch apoptotische Prozesse reversibel. Dabei besitzen die initiierten Zellen durch die Anwesenheit eines Tumorpromoters einen Proliferationsvorteil, der

## 2 Theoretische Grundlagen

zur Entstehung von Präneoplasien und gutartigen Tumoren führt. Tumorpromotoren müssen selbst nicht kanzerogen sein und besitzen im Gegensatz zu Initiatoren eine Wirkungsschwelle. Durch die Progression entstehen aus Präneoplasien bzw. gutartigen Tumoren maligne Tumore, wobei es zu einer Vielzahl genetischer und phänotypischer Veränderungen der Zellen kommt. Durch eine defekte DNA-Reparatur der Tumorzellen werden Mutationen und deren Akkumulation begünstigt. Der maligne Tumor wächst autonom, wobei das gesunde Gewebe verdrängt wird. Die Tumorzellen verlieren ihre Differenzierung und können metastasieren. Durch die Aktivierung von Protoonkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen kann die Entstehung von Karzinomen in allen Stufen beschleunigt werden. (Schwarz et al., 2013; Dekant, 2017)

Chemische Kanzerogene werden in genotoxische Substanzen, die mit der DNA reagieren, und nicht-genotoxische Substanzen eingeteilt. Genotoxische Kanzerogene können entweder direkt mit der DNA reagieren oder erst nach metabolischer Aktivierung. Es kommt zur Bildung von stabilen DNA-Addukten, durch die kovalente Bindung des Kanzerogens an die DNA-Basen. Die Adduktbildung kann zu einer Vielzahl von Prozessen wie der Induktion der DNA-Reparatur, Hemmung der DNA-Synthese, dem Zelltod, aber auch zu klastogenen, mutagenen oder teratogenen Effekten führen. DNA-Addukte können durch verschiedene DNA-Reparaturmechanismen entfernt werden. Nicht-genotoxische Kanzerogene wirken z. B. über die Tumorpromotion, eine gesteigerte Zellproliferation durch zytotoxische Effekte, Entzündungsreaktionen oder immunologische Wirkmechanismen. (Schwarz et al., 2013)

### **2.5.1 Schwellenwert**

Die Untersuchungen verschiedener genotoxischer Chemikalien zeigen, dass es unterschiedliche Dosis-Wirkungs-Kurven für genotoxische Substanzen gibt. Beispielsweise können genotoxische Substanzen einen dosisabhängigen Schwellenwert besitzen, während andere Chemikalien einer linearen Dosis-Wirkungsbeziehung unterliegen, bei der kein Schwellenwert bestimmt werden kann. Wichtig für die Risikobewertung von Kanzerogenen und die Bestimmung einer Dosis-Wirkungs-Kurve ist dabei die Unterscheidung in Chemikalien, die die Zellproliferation anregen und Chemikalien mit mutagenem Potential. Um die unterschiedlichen Dosis-Wirkungsbeziehungen bei der Risikobewertung von chemischen Kanzerogenen zu berücksichtigen wurde in den 1980er und 1990er Jahren das *mode-of-action*-Konzept eingeführt. Dabei wird ein biologisch basiertes Modeling für die Bestimmung der Dosis-Wirkungsbeziehung herangezogen. Außerdem muss für den *low-dose*-Effekt definiert werden, welche Extrapolation (linear ohne Schwellenwert, nicht linear, MoE mit Schwellenwert) angewendet werden kann. Bei *in-vivo*-Modellen ist durch die Anzahl der Tiere die Testung auf verschiedene Endpunkte begrenzt. Die Entwicklung verschiedener *in-vitro*-Modelle ermöglicht die Untersuchung verschiedener Endpunkte auf molekularer und zellulärer Ebene. Dazu gehören unter anderem die DNA-Schädigung und Reparatur sowie die Quantifizierung irreversibler mutagener Effekte. Durch verschiedene Assays können die direkte Schädigung der DNA (Addukte mittels Massenspektrometrie, Comet-Assay), die DNA-Reparatur ( $\gamma$ H2AX, Schwesterchromatidaustausch,

## 2 Theoretische Grundlagen

Apoptosesignale) und irreversibel Schädigungen (Mikrokerntest, HPRT-Test) abgebildet werden. (Clewell et al., 2019)

Geht man bei Kanzerogenen von einem linearen Wirkprinzip aus, würde jedes Molekül ein DNA-Addukt verursachen. Allerdings hängt die Bildung von Addukten auch von der Halbwertszeit der reaktiven Metaboliten, dem pH-Wert, der Reaktion mit anderen nukleophilen Zellbestandteilen oder Serumproteinen ab. Dadurch ist im geringen Dosisbereich keine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erwarten. Dazu kommt die mögliche Detoxifizierung in der Zelle bzw. Ausscheidung des Fremdstoffes. Weiterhin muss ein DNA-Addukt, bevor es zu einer Mutation kommt, erst manifestiert werden. Dies geschieht durch Fehler der DNA-Replikation bei der Zellteilung. Zuvor besitzt die Zelle einige DNA-Reparaturmechanismen, die zu einem nicht linearen Verlauf der Dosis-Wirkungsbeziehung bei genotoxischen Kanzerogenen führen können. Wird ein DNA-Schaden in der Zelle erkannt, kann durch die DNA-Schadensantwort neben der DNA-Reparatur auch ein Zellzyklusarrest oder die Apoptose der Zelle ausgelöst werden. Mit Hilfe verschiedener *point of departures* (PoD) könnte ein Schwellenwert auch für genotoxische Kanzerogene abgeleitet werden. Dabei wurden DNA-Addukte und daraus resultierende Mutationen als PoD für frühe Prozesse der chemischen Kanzerogenese identifiziert. (Thomas et al., 2015)

---

## 3 PROBLEMSTELLUNG

---

Estragol ist ein natürlich vorkommendes Phenylpropanoid, das Bestandteil der etherischen Öle vieler Gewürze und Kräutern ist. Dadurch wird Estragol als natürlicher Bestandteil von Lebensmitteln über die menschliche Ernährung aufgenommen. Estragol ist ein natürliches Kanzerogen, wobei eine metabolische Aktivierung stattfinden muss. Diese verläuft über eine 1'-Hydroxylierung und anschließende Sulfonierung, wobei ein ultimales Kanzerogen entsteht. Bei dem Hauptzielorgan der Toxizität handelt es sich bei allen untersuchten Versuchstieren um die Leber. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Estragol, nach metabolischer Aktivierung, in der Lage ist an die DNA zu binden, wobei verschiedene DNA-Addukte gebildet werden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Bildung der DNA-Addukte  $N^6$ -(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin ( $E3'N^6dA$ ) und  $N^2$ -(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin ( $E3'N^2dG$ ) in primären Rattenhepatozyten zu untersuchen. Dabei sollte sowohl die Konzentrationsabhängigkeit als auch die Zeitabhängigkeit der DNA-Adduktbildung überprüft werden. Weiterhin sollte die Dosis-Wirkungsbeziehung sowohl für einen Konzentrationsbereich von 0,01–300  $\mu M$  Estragol und insbesondere im niedrigen Konzentrationsbereich von 0,01–1  $\mu M$  Estragol untersucht werden. Um die Bildung der DNA-Addukte zu untersuchen und die Addukte quantifizieren zu können sollte eine Methode mittels *Ultra-High-Performance-Liquid-Chromatography*-Tandem-Massenspektroskopie mit Elektrospray-Ionisation (UHPLC-ESI-MS/MS) entwickelt werden. Die Quantifizierung sollte mittels Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse erfolgen. Dazu sollten die DNA-Addukte  $E3'N^6dA$  und  $E3'N^2dG$  sowie die  $^{15}N$ -isotopenmarkierten Analoga  $^{15}N_5$ - $E3'N^6dA$  und  $^{15}N_5$ - $E3'N^2dG$  synthetisiert werden.

Neben der Bildung von DNA-Addukte in primären Rattenhepatozyten sollte das genotoxische Potential von Estragol mittels Mikrokerntest in Abhängigkeit von der CYP1A2-Aktivität untersucht werden. Da Estragol metabolisch aktiviert werden muss, wurde als Testsystem HepG2-Zellen gewählt, die sowohl Phase-I- als auch Phase-II-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus exprimieren. Der Einfluss der CYP1A2-Aktivität sollte durch den Vergleich der Mikrokernelbildung in HepG2-Zellen mit transfizierten HepG2-CYP1A2-Zellen, welche CYP1A2 überexprimieren, untersucht werden.

## 4 ERGEBNISSE

### **4.1 Reaktivität von 1'-Acetoxyestragol und (E)-3'-Acetoxyisoestragol gegenüber DNA-Basen und Synthese der DNA-Addukte N<sup>2</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin und N<sup>6</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin**

Für die Benennung der Zwischenstufen und DNA-Addukte sowie die Zuordnung der <sup>1</sup>H-NMR-Signale wurde für den Phenylpropanoid-Rest folgende Nomenklatur verwendet:

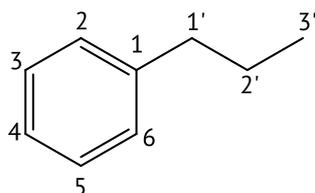


Abbildung 12: Nomenklatur Strukturformeln

#### **4.1.1 Synthesen der reaktiven Vorstufen 1'-Acetoxyestragol und (E)-3'-Acetoxyisoestragol**

Als Vorstufen für die Synthese der DNA-Addukte N<sup>2</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin (E3'N<sup>2</sup>dG) und N<sup>6</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-3'-desoxyadenosin (E3'N<sup>6</sup>dA) wurden 1'-Acetoxyestragol und (E)-3'-Acetoxyisoestragol eingesetzt. Die acetylierten Verbindungen wurden aus den entsprechenden Alkoholen 1'-Hydroxyestragol und (E)-3'-Hydroxyisoestragol synthetisiert.

1'-Hydroxyestragol wurde nach der Vorschrift von Punt et al. (2007) synthetisiert, welche von der Synthese für 1'-Hydroxysafrol nach Borchert et al. (1973) abgeleitet wurde. Die Synthese wurde mit Vinylmagnesiumchlorid statt Vinylmagnesiumbromid durchgeführt. Ein Vergleich des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums des synthetisierten Produkts mit der Literatur zeigt, dass das gewünschte Produkt erhalten wurde (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Signale von 1'-Hydroxyestragol mit Literaturdaten

Proton	Signal <sup>1</sup> H-NMR (Lösungsmittel DMSO-d <sub>6</sub> ) chemische Verschiebung [ppm] (Multiplizität, Anzahl der Protonen)	
	Synthese	Ishii et al. (2011)
OH	1,98 (s, 1H)	keine Angabe
OCH <sub>3</sub>	3,72 (s, 3 H)	3,79 (s, 3 H)
H3'	5,02 (m, 2H)	5,10–5,20 (m, 2 H)
H1'	5,21 (dt, 1 H)	5,26–5,35 (m, 2 H)
H2'	5,93 (m, 1 H)	5,98–6,10 (m, 1 H)
H2/H6	6,84–6,90 (m, 2 H)	6,82–6,89 (m, 2 H)
H3/H5	7,20–7,26 (m, 2 H)	7,22–7,29 (m, 2 H)

## Ergebnisse

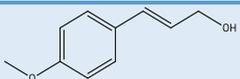
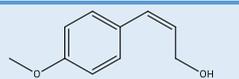
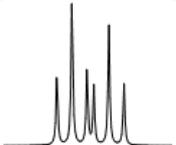
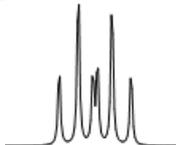
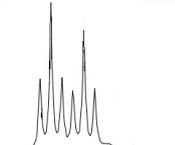
3'-Hydroxyisoestragol wurde nach der Vorschrift von Borchert et al. (1973) für die Synthese von 3'-Hydroxyisosaftrol aus 1'-Hydroxysaftrol synthetisiert. Auch hier zeigte das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der synthetisierten Substanz eine gute Übereinstimmung mit dem in der Literatur beschriebenen <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum für 3'-Hydroxyisoestragol (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Vergleich <sup>1</sup>H-NMR-Signale von 3'-Hydroxyisoestragol mit Literaturdaten

Proton	Signal <sup>1</sup> H-NMR chemische Verschiebung [ppm] (Multiplizität, Anzahl der Protonen) und Kopplungskonstante [Hz]	
	Synthese (DMSO-d <sub>6</sub> )	Punt et al. (2008) (CD <sub>3</sub> OD)
OCH <sub>3</sub>	3,73 (s, 3 H)	3,78 (s, 3 H)
H3'	4,07 (s, 2 H)	4,19 (m, 2 H)
OH	4,79 (s, 1 H)	keine Angabe
H2'	6,20 (dt, 1 H) <sup>3</sup> J <sub>H1',H2'</sub> =15,96; <sup>3</sup> J <sub>H1',H3'</sub> =5,23	6,21 (m, 1 H)
H1'	6,46 (d, 1 H) <sup>3</sup> J <sub>H2',H1'</sub> =16,14	6,53 (m, 1 H)
H3/H5	6,87 (d, 2 H) <sup>3</sup> J <sub>H3,H2/H5,H6</sub> =8,80	6,86 (m, 2 H)
H2/H6	7,34 (d, 2 H) <sup>3</sup> J <sub>H2,H3/H5,H6</sub> =8,44	7,33 (m, 2 H)

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem erhaltenen Produkt um das (*E*)-3'-Hydroxyisoestragol oder (*Z*)-3'-Hydroxyisoestragol handelt, wurden die gemessenen Kopplungskonstanten und die chemischen Verschiebungen mit den berechneten Daten (berechnet mit ChemDrawUltra, Version 12.0.2.1076) verglichen. Dabei sind die Signale der Protonen H1' und H2' für die Unterscheidung relevant (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Vergleich der Kopplungskonstanten und der chemischen Verschiebung der Protonen H1' und H2' von den berechneten Daten für (*E*)-3'-Hydroxyisoestragol oder (*Z*)-3'-Hydroxyisoestragol mit den experimentellen Daten des synthetisierten 3'-Hydroxyisoestragol

	( <i>E</i> )-3'-Hydroxyisoestragol	( <i>Z</i> )-3'-Hydroxyisoestragol	3'-Hydroxyisoestragol
	berechnet	berechnet	gemessen
Struktur			
Signalform H2'			
<sup>3</sup> J <sub>H1',H2'</sub> [Hz]	15,1	10,9	15,96
δH1' [ppm]	6,65	6,61	6,53
δH2' [ppm]	6,25	5,32	6,21

## Ergebnisse

Die  $^3J$ -Kopplungskonstante olefinischer Protonen liegt für die *trans*-Konfiguration zwischen 14–19 Hz und die *cis*-Konfiguration zwischen 7–12 Hz (Hesse, 2012). Somit deutet die Kopplungskonstante auf die Bildung von (*E*)-3'-Hydroxyisoestragol bzw. *trans*-3'-Hydroxyisoestragol hin. Auch der Vergleich der berechnete Kopplungskonstante für die  $^3J_{H1',H2'}$ -Kopplung und der chemischen Verschiebung für die Protonen H1' und H2' sowie der Signalform (siehe Tabelle 14) bestätigte, dass (*E*)-3'-Hydroxyisoestragol synthetisiert wurde.

Die Synthese der acetylierten Verbindungen wurde modifiziert nach der Synthese von Borchert et al. (1973) für die Synthese von 1'-Acetoxysafrol durchgeführt. Die Acetoxylierung der Hydroxylgruppe konnte erfolgreich auf 1'-Hydroxyestragol und (*E*)-3'-Hydroxyisoestragol übertragen werden. Ein Vergleich der  $^1H$ -NMR-Signale mit dem Literaturspektrum für 1'-Acetoxyestragol zeigte eine gute Übereinstimmung mit dem Literaturspektrum (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Vergleich  $^1H$ -NMR-Signale von 1'-Acetoxyestragol mit Literaturdaten

Proton	Signal $^1H$ -NMR	
	chemische Verschiebung [ppm] (Multiplizität, Anzahl der Protonen) und Kopplungskonstante [Hz] Synthese (DMSO- $d_6$ )	Drinkwater et al. (1976)
CH <sub>3</sub>	2,04 (s, 3 H)	2,01 (s, 3 H)
OCH <sub>3</sub>	3,73 (s, 3 H)	3,73 (s, 3 H)
H3'	5,19 (dt, 1 H) $^3J_{CH_2,H_2}=10,42$ ; $^2J_{CH_2}=1,38$	5,20 (m, 2 H)
	5,24 (dt, 1 H) $^3J_{CH_2,H_2}=17,07$ ; $^2J_{CH_2}=1,44$	
H2'	6,02 (ddd, 1 H) $^3J_{H_2',CH_2}=17,07$ ; $^3J_{H_2',CH_2}=10,42$ ; $^3J_{H_2',H_1}=5,90$	5,85 (m, 1 H)
H1'	6,14 (d, 1 H) $^3J_{H_1',H_2}=5,90$	6,18 (m, 1 H)
H3/H5	6,91 (td, 2 H) $^3J_{H_3,H_2/H_5,H_6}=1,00$	7,07 (m, 4 H)
H2/H6	7,26 (td, 2 H) $^3J_{H_2,H_3/H_6,H_5}=1,00$	

Für 3'-Acetoxyisoestragol konnten kein Literaturspektrum und keine Beschreibung der Synthese in der Literatur gefunden werden. Daher wurden die  $^1H$ -NMR-Signale mit den berechneten Signalen (berechnet mit ChemDrawUltra, Version 12.0.2.1076) verglichen (Tabelle 16). Sowohl die chemische Verschiebung als auch die Multiplizität der Signale ist vergleichbar mit dem berechneten  $^1H$ -NMR-Spektrum.

Ebenso wie bei der Synthese von (*E*)-3'-Hydroxyisoestragol liegt die  $^3J_{H_2',H_1}$ -Kopplungskonstante im Bereich der *trans*-Konfiguration olefinischer Protonen (Hesse, 2012), was ein Indiz für die Synthese von (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol ist. Dies lässt sich durch den Vergleich der berechneten

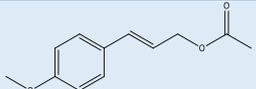
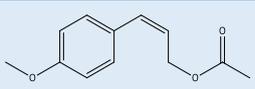
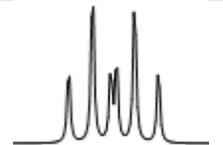
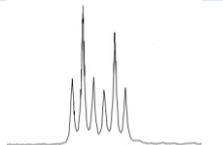
## Ergebnisse

Daten mit den experimentellen Daten der Signalform, der Kopplungskonstante von  ${}^3J_{H2',H1'}$  und der chemischen Verschiebung der Protonen H1' und H2' der bestätigen (siehe Tabelle 17). Somit bestätigen die Daten des  ${}^1\text{H-NMR}$ , dass (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol synthetisiert werden konnte.

Tabelle 16: Vergleich  ${}^1\text{H-NMR}$ -Signale von 3'-Acetoxyisoestragol mit berechnetem  ${}^1\text{H-NMR}$ -Spektrum für (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol

Proton	Signal ${}^1\text{H-NMR}$ chemische Verschiebung [ppm] (Multiplizität, Anzahl der Protonen) und Kopplungskonstante [Hz]	
	Synthese (DMSO- $d_6$ )	berechnet
CH <sub>3</sub>	2,03 (s, 3 H)	2,21 (s, 3 H)
OCH <sub>3</sub>	3,74 (s, 3 H)	3,83 (s, 3 H)
H3'	4,64 (dd, 2 H) ${}^3J_{H3',H2'}=6,60; {}^4J_{H3',H1'}=1,10$	4,50 (dd, 2 H)
H2'	6,19 (dt, 1 H) ${}^3J_{H2',H1'}=15,96; {}^3J_{H2',H3'}=6,33$	6,25 (dt, 1 H)
H1'	6,60 (m, 1 H)	6,65 (d, 1 H)
H3/H5	6,90 (m, 2 H)	6,94 (d, 1H)
H2/H6	7,38 (m, 2 H)	7,62 (d, 1H)

Tabelle 17: Vergleich der Kopplungskonstanten und der chemischen Verschiebung der Protonen H1' und H2' von den berechneten Daten für (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol oder (*Z*)-3'-Acetoxyisoestragol mit den experimentellen Daten des synthetisierten 3'-Acetoxyisoestragol

	( <i>E</i> )-3'-Acetoxyisoestragol berechnet	( <i>Z</i> )-3'-Acetoxyisoestragol berechnet	3'-Acetoxyisoestragol gemessen
Struktur			
Signalform H2'			
${}^3J_{H1',H2'}$ [Hz]	15,1	10,9	15,96
$\delta\text{H1'}$ [ppm]	6,65	6,61	6,53
$\delta\text{H2'}$ [ppm]	6,25	5,82	6,21

Alle von den synthetisierten Zwischenstufen und reaktiven Vorstufen aufgenommenen,  ${}^1\text{H-NMR}$ s sind im Anhang abgebildet. Die Reinheit von 1'-Acetoxyestragol und (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol wurde über das NMR abgeschätzt und betrug für beide Substanzen 100 %. Die Ausbeute der Synthese von 1'-Acetoxyestragol aus 1'-Hydroxyestragol betrug 79 % die Ausbeute für (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol aus (*E*)-3'-Hydroxyisoestragol 60 %.

#### **4.1.2 Allgemeines für die Untersuchungen der Reaktivität von 1'-Acetoxyestragol und (E)-3'-Acetoxyisoestragol mit den DNA-Basen**

Um die Reaktivität der reaktiven Vorstufen 1'-Acetoxyestragol und (E)-3'-Acetoxyisoestragol gegenüber DNA-Basen zu prüfen, wurde sich an der Synthesevorschrift von Paini et al. (2010) bzw. Punt et al. (2007) zur Synthese des DNA-Addukts mit 2'-Desoxyguanosin orientiert. Die zuvor synthetisierten reaktiven Vorstufen 1'-Acetoxyestragol bzw. (E)-3'-Acetoxyisoestragol wurden für die Zeitverläufe im 2,5fachen bis 3fachen Überschuss mit der entsprechenden Base eingesetzt. Für die Reaktionsansätze wurden die Basen in Ammoniumcarbonatpuffer (10 mM) gelöst, die reaktiven Vorstufen in Acetonitril. Die Reaktionsansätze wurden im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert.

Um die Reaktivität von 1'-Acetoxyestragol bzw. (E)-3'-Acetoxyisoestragol gegenüber DNA-Basen zu untersuchen, wurden die Reaktionsansätze mittels HPLC-UV/Vis (Methode siehe Kapitel 7.9.1.2) überprüft. Bei der Untersuchung der Zeitverläufe wurden zwei unterschiedliche HPLC-Systeme verwendet, wobei der Gradient sowie die verwendete Trennsäule identisch waren. Dabei wurde nur ein HPLC-System für die Zeitverläufe einer DNA-Base verwendet. Vergleichsmessungen der Edukte zeigten, dass sich die Retentionszeiten abhängig von den HPLC-Systemen leicht unterscheiden. Das Edukt (E)-3'-Acetoxyisoestragol zeigte in den HPLC-UV/Vis-Messungen einen zweiten Peak, der auf eine Verunreinigung hindeutet, die im <sup>1</sup>H-NMR nicht zu erkennen war. Auf eine weitere Aufreinigung von (E)-3'-Acetoxyisoestragol wurde verzichtet, da die gebildeten DNA-Addukte mittels präparativer HPLC isoliert werden sollten.

Aus der Literatur ist zu erwarten, dass mit 2'-Desoxyadenosin (dA) das DNA-Addukt N<sup>6</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-desoxyadenosin (E3'N<sup>6</sup>dA) und mit 2'-Desoxyguanosin (dG) das DNA-Addukt N<sup>2</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin (E3'N<sup>2</sup>dG) als Hauptaddukte gebildet werden (Phillips et al., 1981; Wiseman et al., 1985). Die Addukte E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA sollten, neben der Überprüfung der Reaktivität von 1'-Acetoxyestragol bzw. (E)-3'-Acetoxyisoestragol gegenüber der DNA-Basen, synthetisiert werden. Die Addukte wurden als Referenzsubstanzen für die spätere Quantifizierung mittels HPLC-ESI-MS/MS benötigt. Unter den gleichen Reaktionsbedingung sollte überprüft werden, ob Addukte mit den Basen 2'-Desoxythymidin (dT) und 2'-Desoxycytidin (dC) gebildet werden.

Die Verwendung der beiden reaktiven Vorstufen 1'-Acetoxyestragol und (E)-3'-Acetoxyisoestragol diente zur Überprüfung, ob jeweils die gleichen Addukte gebildet werden. Zudem sollte die Synthese für E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA für einen Mikroansatz mit maximal 1 mg der DNA-Base optimiert werden, wobei überprüft werden sollte welche reaktive Vorstufe für die Synthese im Mikroansatz besser geeignet ist. Nach der Optimierung sollten mit Hilfe dieser Synthesen die Stabilisotopen-markierten Standards <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>2</sup>dG und <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>6</sup>dA synthetisiert werden.

### 4.1.3 Reaktivität von 1'-Acetoxyestragol und (E)-3'-Acetoxyisoestragol gegenüber 2'-Desoxyguanosin und Synthese von N<sup>2</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin

Um die Reaktivität von 1'-Acetoxyestragol bzw. (E)-3'-Acetoxyisoestragol mit dG zu untersuchen wurde ein Ansatz mit je 100 mg dG und dem 2,5fachen bis 3fachen Überschuss 1'-Acetoxyestragol bzw. (E)-3'-Acetoxyisoestragol eingesetzt. Die mittels HPLC-UV/Vis-Messungen aufgenommenen Zeitverläufe zeigten, dass bei beiden Reaktionsansätzen eine Abnahme der dG-Konzentration zu beobachten war. Im Reaktionsansatz mit 1'-Acetoxyestragol konnte zudem eine deutliche Abnahme der Konzentration von 1'-Acetoxyestragol beobachtet werden. In beiden Reaktionsansätzen bildet sich ein zusätzlicher Peak mit einer Retentionszeit von  $t_{R(UV/Vis)}=18,5$  min.

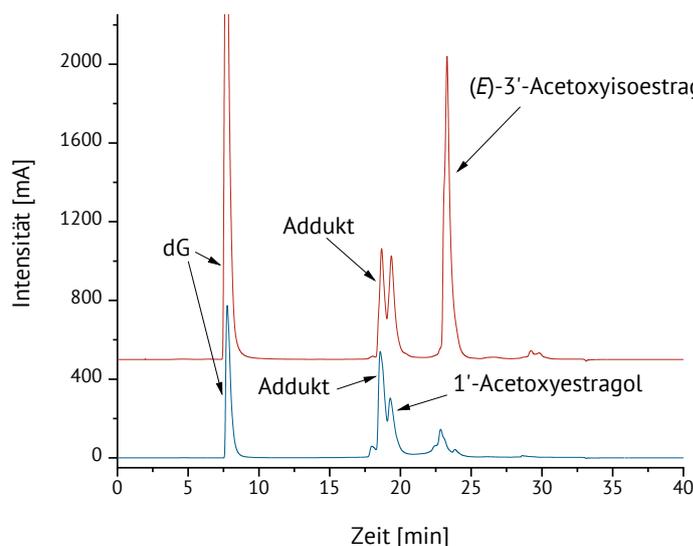


Abbildung 13: HPLC-UV/Vis-Chromatogramme der Reaktion von 2'-Desoxyguanosin mit 1'-Acetoxyestragol (blau) bzw. (E)-3'-Acetoxyisoestragol (rot) nach einer Reaktionszeit von 24 h. Gemessen wurden die Proben mit dem Agilent HPLC-System; Methodenparameter siehe Kapitel 7.9.1.2;  $\lambda=275$  nm,  $\lambda_{ref}=360$  nm

Um zu bestätigen, dass es sich bei dem neu gebildeten Peak mit der Retentionszeit von  $t_{R(UV/Vis)}=18,5$  min um das in der Literatur von Punt et al. (2007) identifiziert DNA-Addukt N<sup>2</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin handelt, wurden verschiedene HPLC-ESI-MS/MS-Messungen durchgeführt. Für die HPLC-ESI-MS/MS-Messungen wurden die gerätespezifischen und substanzspezifischen MS-Parameter anhand einer bestehenden Methode für die Quantifizierung von N<sup>2</sup>-(Isomethyleugenol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin abgeschätzt, da dieses DNA-Addukt eine ähnliche Struktur aufweist, wie die in der Literatur bekannten DNA-Addukte von Estragol.

In der Literatur bekannte DNA-Addukte von Desoxyguanosin mit Phenylpropanoiden wie z. B.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Asaron oder Methyleugenol besitzen oft einen Neutralverlust (NL) von 116 (Stegmüller et al., 2018; Herrmann et al., 2013), wobei dieser Neutralverlust auch für das Addukt E3'N<sup>2</sup>dG identifiziert werden konnte (Punt et al., 2007). Der NL von 116 entspricht den Verlust der Desoxyribose aus dem Molekül. Das Chromatogramm des NL-Experiment mit einem NL von 116 für den Reaktionsansätze von 1'-Acetoxyestragol mit dG ist in Abbildung 14 abgebildet.

## Ergebnisse

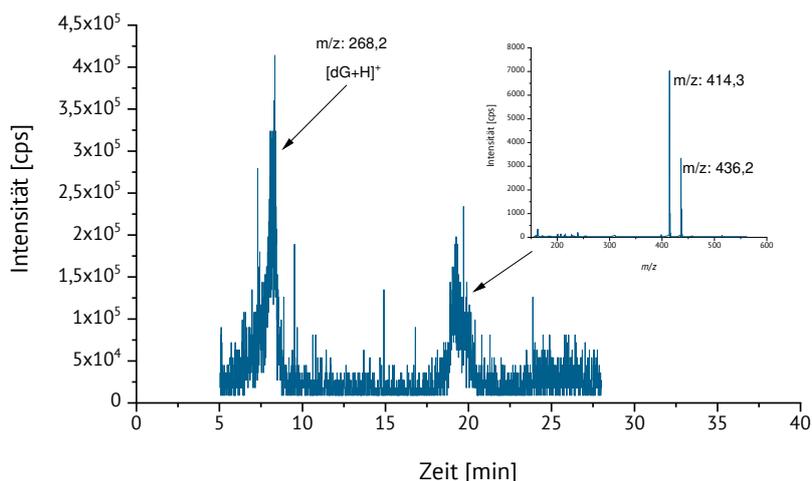


Abbildung 14: Chromatogramm des NL-Experiments des Reaktionsansatzes von dG mit 1'-Acetoxyestragol mit Angabe der zugrundeliegenden  $m/z$ -Verhältnisse der Peaks. Die eingefügte Abbildung zeigt die  $m/z$ -Verhältnisse des zweiten Peaks; Informationen zur Methode siehe Kapitel 7.9.2.1

Durch spätere Fraktionierung der Reaktionsansätze mittels präparativer HPLC und anschließenden Vergleichsmessungen an der HPLC-UV/Vis und HPLC-ESI-MS/MS konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem zweiten Peak im Chromatogramm der NL-Experiment um den neu gebildeten Peak mit einer Retentionszeit von  $t_{R(UV/Vis)}=18,5$  min der HPLC-UV/Vis-Messungen handelt. Dem Peak lagen ein  $m/z$ -Verhältnis von 414,3 bzw. 436,2 zugrunde (siehe Abbildung 14). Das  $m/z$ -Verhältnis 414,3 entspricht bei einfach positiver Ladung dem  $[M+H]^+$  von E3'N<sup>2</sup>dG, das  $m/z$ -Verhältnis von 436,2 ist keinem in der Literatur bekannten DNA-Addukt zuzuordnen (Punt et al., 2007). Im Reaktionsansatz von (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol mit dG konnten bei der entsprechenden Retentionszeit die gleichen  $m/z$ -Verhältnisse identifiziert werden. Sowohl im Reaktionsansatz von 1'-Acetoxyestragol mit dG als auch im Reaktionsansatz von (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol mit dG besaß im NL-Experiment das  $m/z$ -Verhältnisse von 414,3 eine wesentlich höhere Signalintensität als das  $m/z$ -Verhältnisse von 436,2.

Um auszuschließen, dass weitere DNA-Addukte gebildet wurden, die nicht den Neutralverlust von 116 aufweisen, wurde ein Q1-Scan im Massenbereich von  $m/z=50-600$  durchgeführt. Es konnte neben dem  $m/z$ -Verhältnis von 414,3 keine weitere Masse identifiziert werden, die auf DNA-Addukte hinweisen.

Für die im NL-Experiment identifizierten  $m/z$ -Verhältnisse von 414,3 und 436,2 wurde jeweils ein *Produkt Ion Scan* (PIS) durchgeführt. Im PIS des  $m/z$ -Verhältnis von 414,3 wurden für die Reaktionsansätze von 1'-Acetoxyestragol bzw. (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol mit dG und einer Retentionszeit von  $t_{R(UV/Vis)}=18,5$  min die Fragmentierungsmuster aus Abbildung 15 aufgenommen. Die Fragmentierung war in beiden Reaktionsansätzen vergleichbar. Ein Vergleich mit Punt et al. (2007) zeigte, dass diese Fragmente mit den Fragmente von E3'N<sup>2</sup>dG aus der Literatur übereinstimmen. Das PIS-Spektrum des  $m/z$ -Verhältnis von 436,2 lieferte keine Hinweise auf die Bildung eines DNA-Addukts.

## Ergebnisse

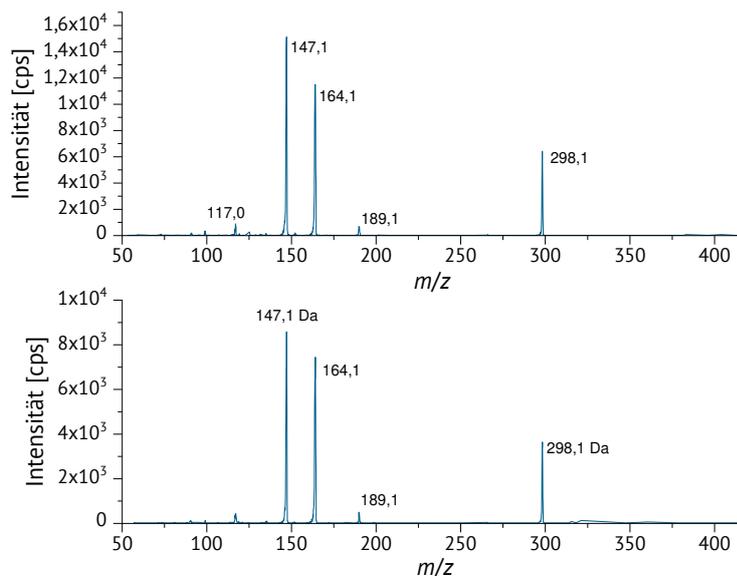


Abbildung 15: PIS für das  $m/z$ -Verhältnis von 414,3 des Reaktionsansatzes von dG mit 1'-Acetoxyestradiol (oben) und (*E*)-3'-Acetoxyisoestradiol (unten) des Peaks mit der Retentionszeit  $t_{R(UV/Vis)}=18,5$  min; Informationen Methode siehe Kapitel 7.9.2.11

Von beiden Reaktionsansätzen wurde der Peaks mit der Retentionszeit von  $t_{R(UV/Vis)}=18,5$  min mittels präparativer HPLC (Methodeninformation siehe Kapitel 7.9.1.1) isoliert. Die Addukt-enhaltenden Fraktionen mit gleicher Reinheit wurden vereinigt und lyophilisiert, um das Produkt mittels <sup>1</sup>H-NMR charakterisieren zu können. Ein Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Daten beider Reaktionsansätze zeigte, dass bei beiden Reaktionsansätzen das gleiche Addukt gebildet wurde (siehe Abbildung 16).

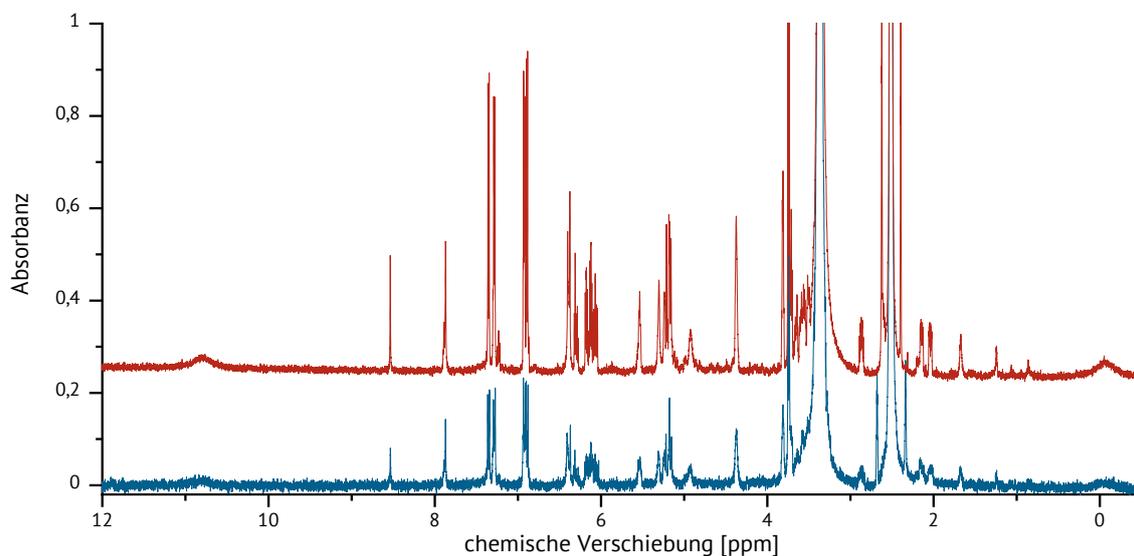


Abbildung 16: <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von den Produkten aus den Reaktionsansätzen von dG mit 1'-Acetoxyestradiol (blau) bzw. (*E*)-3'-Acetoxyisoestradiol (rot). Die Signalintensität wurden in den relevanten Bereich gezoomt und die y-Achse wurde auf 1 normiert.

Ein Vergleich der HPLC-UV/Vis-Daten, HPLC-ESI-MS/MS-Daten und <sup>1</sup>H-NMR-Daten sowie der Vergleich mit der Literatur bestätigte, dass E3'N<sup>2</sup>dG erfolgreich synthetisiert wurde (genaue

Charakterisierung siehe Kapitel 5.1). Dabei handelte es sich bei dem neu gebildeten Peak mit der Retentionszeit von  $t_{R(UV/Vis)}=18,5$  min um das DNA-Addukt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl bei der Verwendung von 1'-Acetoxyestragnol als auch (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol E3'N<sup>2</sup>dG als Produkt der Synthese gebildet wurde. Die Ausbeute was bei dem Reaktionsansatz mit 1'-Acetoxyestragnol (7 %) höher als bei dem Reaktionsansatz mit (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol (6 %).

#### **4.1.4 Reaktivität von 1'-Acetoxyestragnol und (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol gegenüber 2'-Desoxyadenosin und Synthese von *N*<sup>6</sup>-(Isoestragnol-3'-yl)-3'-desoxyadenosin**

Die Reaktivität von 1'-Acetoxyestragnol und (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol gegenüber 2'-Desoxyadenosin (dA) wurde in einem Reaktionsansatz mit je 100 mg dA und dem 2,5fachen bis 3fachen Überschuss 1'-Acetoxyestragnol bzw. (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol untersucht. Die Zeitverläufe zeigten, dass sowohl bei dem Reaktionsansatz mit 1'-Acetoxyestragnol als auch bei dem Reaktionsansatz mit (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol eine Abnahme der dA-Konzentration beobachtet werden konnte. Das gleiche war für die eingesetzten reaktiven Vorstufen 1'-Acetoxyestragnol bzw. (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol zu beobachten. Gleichzeitig wurde in beiden Reaktionsansätzen die Bildung eines Peaks beobachtet, der eine Retentionszeit von  $t_{R(UV/Vis)}=21,5$  min aufweist. Im HPLC-UV/Vis-Chromatogramm des Reaktionsansatz mit 1'-Acetoxyestragnol wurden noch zwei weitere Peaks mit einer Retentionszeit von  $t_{R(UV/Vis)}=23,5$  min bzw.  $t_{R(UV/Vis)}=23,9$  min beobachtet, die bei dem Reaktionsansatz mit (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol nicht beobachtet wurden. Allerdings könnten die Peaks mit der Retentionszeit von  $t_R=23,5$  min bzw.  $t_R=23,9$  min von dem Peak des (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol überlagert werden.

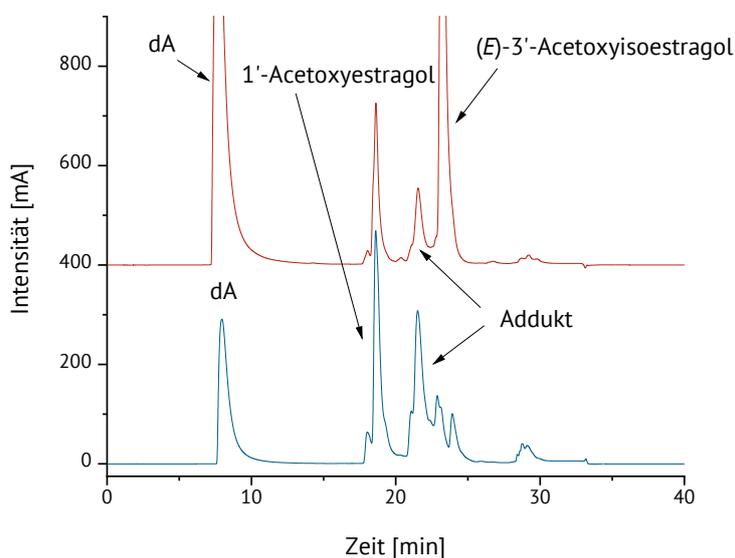


Abbildung 17: HPLC-UV/Vis-Chromatogramme der Reaktion von 2'-Desoxyadenosin mit 1'-Acetoxyestragnol (blau) bzw. (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol (rot) nach einer Reaktionszeit von 24 h. Gemessen wurden die Proben mit dem Agilent HPLC-System; Methodenparameter siehe Kapitel 7.9.1.2;  $\lambda=275$  nm,  $\lambda_{ref}=360$  nm

Um zu bestätigen, dass es sich bei dem neu gebildeten Peak mit der Retentionszeit von  $t_{R(UV/Vis)}=21,5$  min aus den Reaktionsansatz von 1'-Acetoxyestragnol mit dA bzw. den Peaks mit einer

## Ergebnisse

Retentionszeit von  $t_{R(UV/Vis)}=21,5$  min,  $t_{R(UV/Vis)}=23,5$  min bzw.  $t_{R(UV/Vis)}=23,9$  min aus den Reaktionsansatz von (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol mit dA um das von Ishii et al. (2011) identifizierte DNA-Addukt *N*<sup>6</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-3'-desoxyadenosin handelt, wurden verschiedene HPLC-ESI-MS/MS-Messungen durchgeführt. Die MS-Parameter wurden im Vergleich zu den Experimenten für E3'N<sup>2</sup>dG nicht verändert.

Die DNA-Addukte von Desoxyadenosin mit anderen Phenylpropanoiden wie z. B.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Asaron oder Methyleugenol besitzen oft einen NL von 116 (Stegmüller et al., 2018; Herrmann et al., 2013), wobei dieser auch für E3'N<sup>6</sup>dA nachgewiesen werden konnte (Ishii et al., 2011). Im Chromatogramm des NL-Experiments des Reaktionsansatz von 1'-Acetoxyestragol mit dA konnte das *m/z*-Verhältnis von 398,3 identifiziert werden (siehe Abbildung 18). Dies entspricht bei einer einfachen positiven Ladung dem  $[M+H]^+$  von E3'N<sup>6</sup>dA, das ebenfalls von Ishii et al. (2011) identifiziert wurde. Die spätere Fraktionierung des Reaktionsansatzes und Vergleichsmessungen an der HPLC-UV/Vis und HPLC-ESI-MS/MS zeigten, dass es sich bei dem zweiten Peak im Chromatogramm des NL-Experiment um den Peak mit der Retentionszeit  $t_{R(UV/Vis)}=21,5$  min handelte. In dem NL-Experiment des Reaktionsansatz mit (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol konnte für den Peak mit der Retentionszeit  $t_{R(UV/Vis)}=21,5$  min ebenfalls das *m/z*-Verhältnis von 398,3 identifiziert werden. Die Peaks bei einer Retentionszeit von  $t_{R(UV/Vis)}=23,5$  min bzw.  $t_{R(UV/Vis)}=23,9$  min konnten nicht beobachtet werden, weshalb es sich bei diesen Peaks vermutlich nicht um DNA-Addukte handelt.

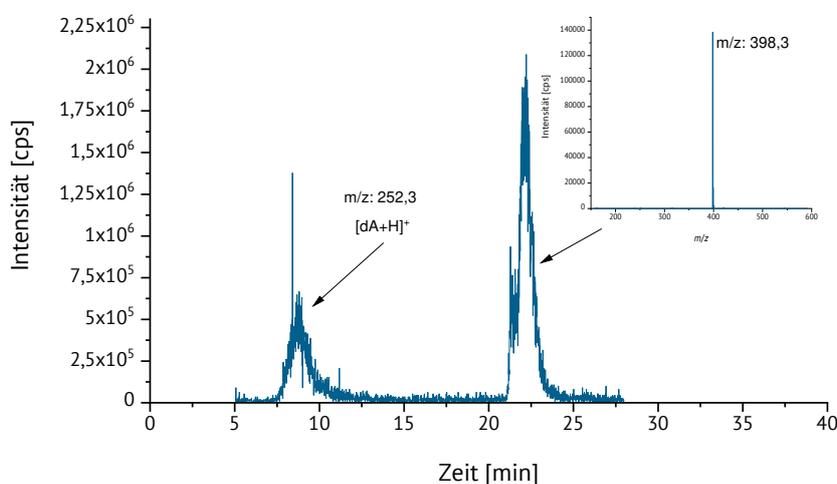


Abbildung 18: Chromatogramm des NL-Experiment des Reaktionsgemisch von dA und 1'-Acetoxyestragol mit Angabe der zugrundeliegenden *m/z*-Verhältnisse der Peaks. Die eingefügte Abbildung zeigt die *m/z*-Verhältnisse des zweiten Peaks; Informationen zur Methode siehe Kapitel 7.9.2.1

Um auszuschließen, dass weitere Addukte gebildet wurden, die nicht den Neutralverlust von 116 aufweisen, wurde ein Q1-Scan im Massenbereich von *m/z*=50–600 durchgeführt. Hier konnten keine Hinweise auf weitere DNA-Addukte identifiziert werden.

Für das im NL-Experiment identifizierte *m/z*-Verhältnis von 398,3 wurde ein PIS durchgeführt. Im PIS für die Reaktionsansätze von 1'-Acetoxyestragol bzw. (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol mit dA wurden

## Ergebnisse

die Fragmentierungsmuster aus Abbildung 19 aufgenommen. Die Fragmentierung des Peaks mit der Retentionszeit von  $t_{R(UV/Vis)}=21,5$  min ist in beiden Reaktionsansätzen vergleichbar. Ein Vergleich mit den Daten von Ishii et al. (2011) zeigte, dass diese Fragmente mit den Fragmente von E3'N<sup>6</sup>dA übereinstimmen.

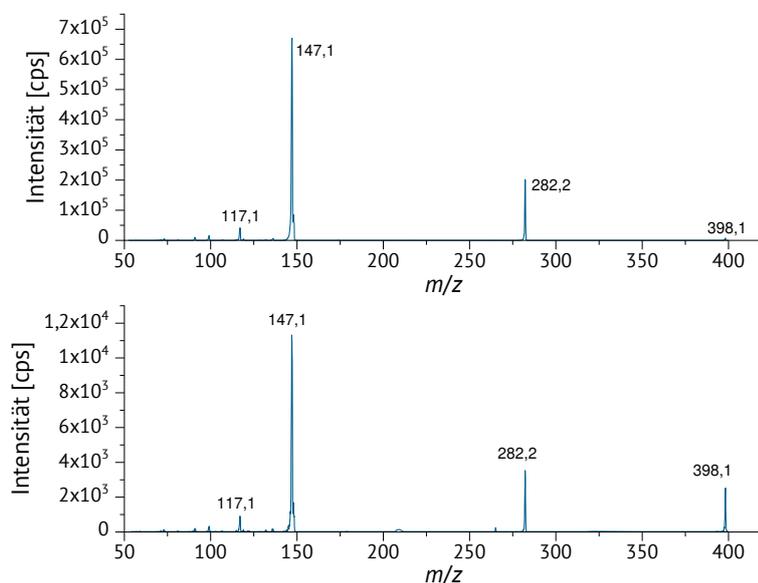


Abbildung 19: PIS für das  $m/z$ -Verhältnis von 398,1 von dem Reaktionsansatz von dA mit 1'-Acetoxyestragol (oben) bzw. (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol (unten) des Peaks mit der Retentionszeit  $t_{R(UV/Vis)}=21,5$  min; Informationen Methode siehe Kapitel 7.9.2.11

Von beiden Reaktionsansätzen wurde der Peaks mit einer Retentionszeit  $t_{R(UV/Vis)}=21,5$  min mittels präparativer HPLC (Methodeninformation siehe Kapitel 7.9.1.1) isoliert. Die Addukt-enhaltenden Fraktionen mit gleicher Reinheit wurden vereinigt und lyophilisiert, um das Produkt mittels <sup>1</sup>H-NMR charakterisieren zu können. Ein Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Daten (Abbildung 20) beider Reaktionsansätze zeigte, dass bei beiden Reaktionsansätzen das gleiche Addukt gebildet wurde.

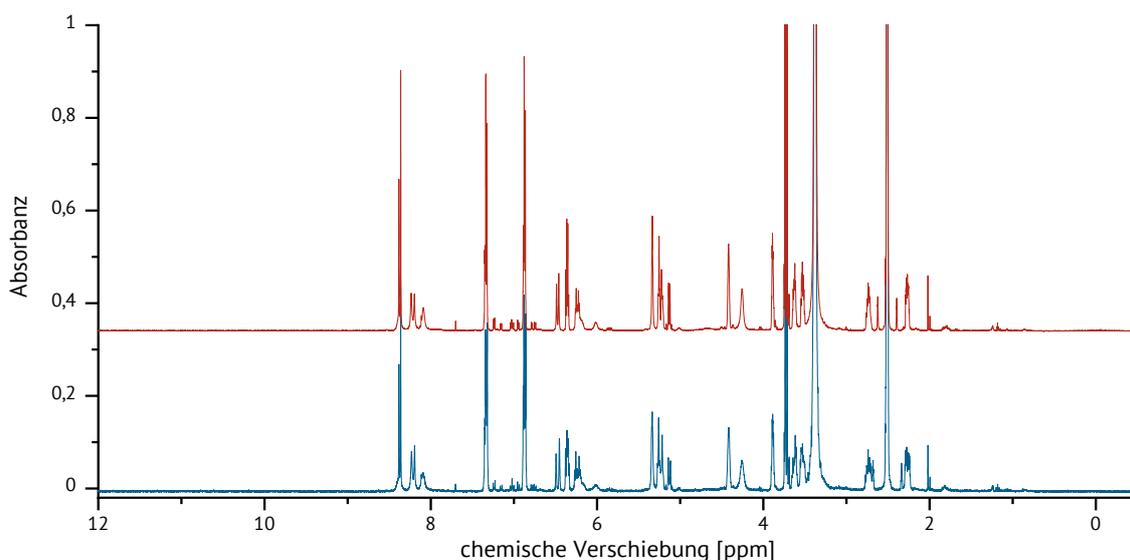


Abbildung 20: <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von den Produkten aus den Reaktionsansätzen von dA mit 1'-Acetoxyestragol (blau) und (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol (rot). Die Signalintensität wurden in den relevanten Bereich gezoomt und die y-Achse wurde auf 1 normiert.

## Ergebnisse

Ein Vergleich der HPLC-UV/Vis-Daten, HPLC-ESI-MS/MS-Daten und  $^1\text{H-NMR}$ -Daten sowie der Vergleich mit der Literatur bestätigte, dass E3'N<sup>6</sup>dA erfolgreich synthetisiert wurde (genaue Charakterisierung siehe Kapitel 5.1). Dabei handelte es sich bei dem neu gebildeten Peak mit der Retentionszeit von  $t_{\text{R(UV/Vis)}}=21,5$  min um das DNA-Addukt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl bei der Verwendung von 1'-Acetoxyestragnol als auch (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol E3'N<sup>6</sup>dA als Produkt der Synthese gebildet wurde. Die Ausbeute war bei dem Reaktionsansatz mit 1'-Acetoxyestragnol (3 %) höher als bei dem Reaktionsansatz mit (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol (2 %). Den Peaks mit der Retentionszeit von  $t_{\text{R(UV/Vis)}}=23,5$  min bzw.  $t_{\text{R(UV/Vis)}}=23,9$  min konnte kein DNA-Addukt zugeordnet werden. In beiden Reaktionsansätzen wurde unabhängig von der reaktiven Vorstufe das gleiche Addukt gebildet.

### 4.1.5 Reaktivität von 1'-Acetoxyestragnol und (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol gegenüber 2'-Desoxycytidin

Für die Zeitverläufe wurden die Reaktionsansätze von dC mit 1'-Acetoxyestragnol bzw. (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol über einen Zeitraum von 22 h vermessen. Dazu wurden ca. 1,1 mg dC mit dem 3,6fachen Überschuss 1'-Acetoxyestragnol bzw. 3,9fachen Überschuss (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol versetzt. Weder in dem Reaktionsansatz mit 1'-Acetoxyestragnol noch im Reaktionsansatz mit (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol ist im Zeitverlauf eine Abnahme der dC-Konzentration zu beobachten. Auch die Konzentration der reaktiven Vorstufen veränderte sich im Laufe der Reaktion kaum. Im Chromatogramm des Reaktionsansatz mit 1'-Acetoxyestragnol sind zwei Peaks zu beobachten, die allerdings auch bei der Messung des Edukts mit diesem HPLC-System auftraten. Daher weisen diese Peaks nicht auf ein gebildetes Addukt hin. Im Reaktionsansatz mit (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol ist eine Verunreinigung mit 1'-Acetoxyestragnol zu sehen. Auch hier gibt es in den UV/Vis-Chromatogrammen keine Hinweise auf die Bildung möglicher Addukte (Abbildung 21).

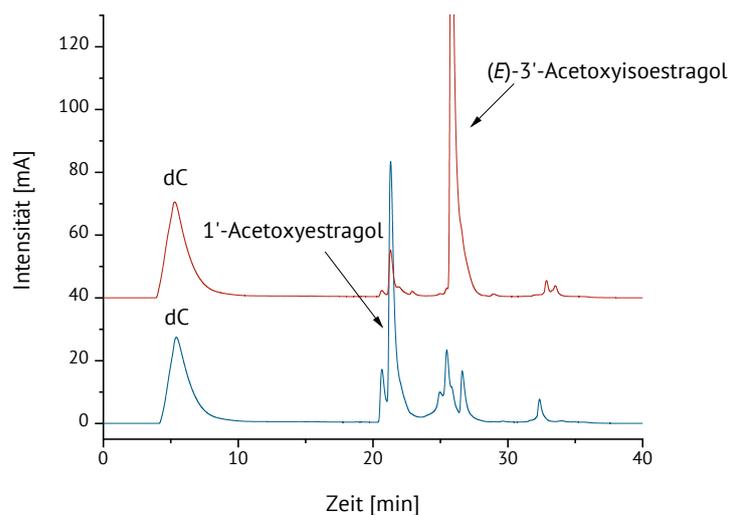


Abbildung 21: HPLC-UV/Vis-Chromatogramme der Reaktion von 2'-Desoxycytidin mit 1'-Acetoxyestragnol (blau) bzw. (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol (rot) nach einer Reaktionszeit von 22 h. Gemessen wurden die Proben mit dem Waters HPLC-System; Methodenparameter siehe 7.9.1.2

## Ergebnisse

Um die Bildung möglicher DNA-Addukte ausschließen zu können, wurden die beiden Reaktionsansätze zusätzlich im Q1-Scan sowie mit NL-Experimenten massenspektrometrisch vermessen. Für beide Reaktionsansätze konnten weder im Q1-Scan noch im NL-Experiment Hinweise auf die Bildung von DNA-Addukten beobachtet werden. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Wahl der gerätespezifischen Parameter zu einer frühen Fragmentierung möglicher Addukte führt, wurden diese variiert. Auch hier ergaben sich keine Hinweise auf gebildete DNA-Addukte.

### **4.1.6 Reaktivität von 1'-Acetoxyestragnol und (E)-3'-Acetoxyisoestragnol gegenüber 2'-Desoxythymidin**

Für die Reaktionsansätze wurden 1,4 mg dT mit dem 3,6fachen Überschuss 1'-Acetoxyestragnol und 1,6 mg dT mit dem 3,2fachen Überschuss (E)-3'-Acetoxyisoestragnol über 22 h inkubiert. In beiden Reaktionsansätzen konnte weder eine Abnahme von dT noch der reaktiven Vorstufen beobachtet werden. Im Reaktionsansatz von dT mit 1'-Acetoxyestragnol waren die gleichen Peaks zu beobachten wie in der Inkubation von dC mit 1'-Acetoxyestragnol. In beiden Reaktionsansätzen konnten keine Hinweise auf eine zeitabhängige Bildung eines Peaks beobachtet werden, die auf die Bildung eines DNA-Addukts hinweisen.

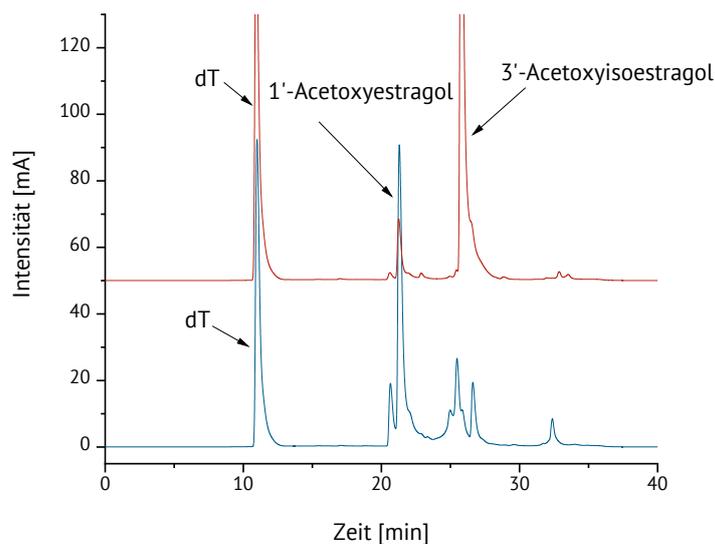


Abbildung 22: HPLC-UV/Vis-Chromatogramme der Reaktion von 2'-Desoxythymidin mit 1'-Acetoxyestragnol (blau) bzw. (E)-3'-Acetoxyisoestragnol (rot) nach einer Reaktionszeit von 22 h. Gemessen wurden die Proben mit dem Waters HPLC-System (Methodenparameter siehe Kapitel 7.9.1.2)

Ebenso wie für die Reaktionsansätze mit dC wurden beide Reaktionsansätze mit Q1-Scan und NL-Experimenten vermessen, wobei auch die gerätespezifischen Parameter variiert wurden. Auch die MS-Messungen lieferten keine Hinweise auf die Bildung von DNA-Addukten.

#### **4.1.7 Synthese der isotopenmarkierten Standards $^{15}\text{N}_5\text{-N}^2\text{-(Isoestragnol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin}$ und $^{15}\text{N}_5\text{-N}^6\text{-(Isoestragnol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin}$**

Für die Entwicklung einer Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse (SIVA) wurden die stabilisotopenmarkierten Standards  $^{15}\text{N}_5\text{-N}^2\text{-(Isoestragnol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin}$  ( $^{15}\text{N}_5\text{-E3'N}^2\text{dG}$ ) und  $^{15}\text{N}_5\text{-N}^6\text{-(Isoestragnol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin}$  ( $^{15}\text{N}_5\text{-E3'N}^6\text{dA}$ ) synthetisiert. Dazu wurde die Synthese der Addukte  $\text{E3'N}^2\text{dG}$  und  $\text{E3'N}^6\text{dA}$  auf einen Mikroansatz mit 1 mg der entsprechenden DNA-Base optimiert. Die Optimierung der Reaktionsansätze zeigte, dass im Mikroansatz für beide Addukte unter Verwendung von 1'-Acetoxyestragnol eine ausreichende Ausbeute erzielt werden konnte. Eine optimale Ausbeute für die Addukte konnte bei einem 10fachen Überschuss von 1'-Acetoxyestragnol gegenüber der DNA-Base erreicht werden. In den Reaktionsansätzen mit (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol konnte unter Verwendung von geringen Mengen der Base keine Adduktausbeute beobachtet werden.

Für die Synthese der Stabilisotopen-markierten Standards wurde 1 mg  $^{15}\text{N}_5\text{-Desoxyguanosin}$  ( $^{15}\text{N}_5\text{-dG}$ ) bzw.  $^{15}\text{N}_5\text{-Desoxyadenosin}$  ( $^{15}\text{N}_5\text{-dA}$ ) und 1'-Acetoxyestragnol nach der Synthesevorschrift aus Kapitel 7.10.13 und 7.10.14 angesetzt. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels HPLC-UV/Vis-Messungen überprüft. Anschließend wurden die Addukte mittels präparativer HPLC isoliert. Aufgrund der geringen Konzentration der Stabilisotopen-markierten Standards wurde das organische Lösungsmittel mittels Vakuumzentrifuge entfernt und die Konzentration mittels externer Kalibriergerade der nicht Stabilisotopen-markierten Standards an der HPLC-UV/Vis bestimmt.

Die Ausbeute betrug für  $^{15}\text{N}_5\text{-E3'N}^6\text{dA}$  14 %. Die Überprüfung an der HPLC-ESI-MS/MS bestätigte die Synthese des  $^{15}\text{N}_5\text{-E3'N}^6\text{dA}$ , wobei im PIS als Massenübergänge die *m/z*-Verhältnisse 403,227/287,200, 403,227/147,200 und 403,227/91,200 detektiert wurden. Diese Übergänge entsprechen den Übergängen, die aus der Literatur bekannten sind (Ishii et al., 2011).

Nach der ersten Isolierung von  $^{15}\text{N}_5\text{-E3'N}^2\text{dG}$  mittel präparativer HPLC und Auswertung der Fraktionen an der HPLC-UV/Vis betrug die Ausbeute der Synthese ca. 45 %. Die Auswertung der Fraktionen an der HPLC-ESI-MS/MS zeigte allerdings nur sehr geringe bzw. keine detektierbaren Konzentrationen von  $^{15}\text{N}_5\text{-E3'N}^2\text{dG}$ . Eine Änderung der HPLC-Bedingungen zeigte im HPLC-UV/Vis-Chromatogramm eine starke Verunreinigung des Standards. Nach einer erneuten präparativen Aufreinigung mit einem anderen Gradienten und Acetonitril statt Methanol als organisches Fließmittel konnte  $^{15}\text{N}_5\text{-E3'N}^2\text{dG}$  in ausreichender Reinheit erhalten werden. Mittels HPLC-ESI-MS/MS konnte über einen PIS die Bildung des  $^{15}\text{N}_5\text{-E3'N}^2\text{dG}$  mit den Massenübergängen 419,051/303,100, 419,051/169,020, 419,051/147,000 bestätigt werden, wobei die Übergänge den Übergängen von Punt et al. (2007) für  $^{15}\text{N}_5\text{-E3'N}^2\text{dG}$  entsprechen. Die Ausbeute  $^{15}\text{N}_5\text{-E3'N}^2\text{dG}$  der Synthese betrug ca. 1 %.

## **4.2 Entwicklung einer HPLC-ESI-MS/MS-Methode (Sciex QTrap 5500) zur Quantifizierung von E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA mittels SIVA**

Erste Vorversuche an einem HPLC-ESI-MS/MS-System bestehend aus einem Agilent 1100 System und einer RP18-Säule (LiChrospher®, 5 µm, 4,0 mm×125 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland) mit entsprechender Vorsäule (LiChrospher®, 5 µm, 4,0 mm×4,0 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland), gekoppelt mit einem TripleQuad-Massenspektrometer API2000 (AB Sciex, Framingham, USA) zeigten, dass in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit Estragol (Inkubationszeit 1, 24 und 48 h) de DNA-Addukte E3'N<sup>6</sup>dA und E3'N<sup>2</sup>dG gebildet wurden. Ab einer Konzentration von 50 µM Estragol im Inkubationsmedium konnten beide Addukte quantifiziert werden. Durch diese Vorversuche konnte bestätigt werden, dass die synthetisierten DNA-Addukte auch *in vitro* in pRH gebildet werden.

Ziel dieser Arbeit war es eine sensitive und robuste Methode zur Quantifizierung der DNA-Addukte E3'N<sup>6</sup>dA und E3'N<sup>2</sup>dG durch eine SIVA in DNA-Hydrolysaten zu entwickeln. Da die Sensitivität des TripleQuad Massenspektrometer API2000 nicht ausreichte, wurde die Methode auf eine UHPLC gekoppelt mit einem Sciex QTrap 5500 Massenspektrometer (AB Sciex, Framingham, USA) übertragen. Als Säule wurde eine UHPLC-Säule mit RP18-Phase (U-VDSpher PUR C18-E 1,8 µm; 50×4,6 mm, VDS Optilab) mit entsprechender Vorsäule (PUR C-18-E, 1,8 µm 5×4 mm) verwendet. Für die Addukte E3'N<sup>6</sup>dA und E3'N<sup>2</sup>dG sowie die isotopenmarkierten Analoga <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>6</sup>dA und <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>2</sup>dG wurden die substanzspezifischen Parameter mittels *manual tuning* und die gerätespezifischen Parameter mittels Fließinjektionsanalyse jeweils für die in Tabelle 18 aufgeführten drei Übergänge pro Analyt optimiert. Die zwei Übergänge mit der höchsten Intensität wurden in die finale Methode eingepflegt.

Tabelle 18: optimierte Massenübergänge für die Quantifizierung von den DNA-Addukten E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA sowie die Rolle der der Übergänge bei der Quantifizierung

Analyt	<i>m/z</i> -Verhältnis (Precursorion)	<i>m/z</i> -Verhältnis (Fragment)	Rolle
E3'N <sup>2</sup> dG	414,143	298,100	Quantifier
		164,000	Qualifier
		147,000	-
<sup>15</sup> N <sub>5</sub> -E3'N <sup>2</sup> dG	419,051	303,100	Quantifier
		169,000	-
		147,000	Qualifier
E3'N <sup>6</sup> dA	398,132	282,100	Qualifier
		147,000	Quantifier
		117,000	-
<sup>15</sup> N <sub>5</sub> -E3'N <sup>6</sup> dA	403,227	287,200	Quantifier
		147,000	Qualifier
		91,200	-

## Ergebnisse

Da Vorversuche zeigten, dass E3'N<sup>6</sup>dA bei der Inkubation von pRH im Vergleich zu E3'N<sup>2</sup>dG in geringerem Maße gebildet wurde, wurden die gerätespezifischen Parameter auf E3'N<sup>6</sup>dA optimiert. Dabei sollte für E3'N<sup>6</sup>dA eine möglichst hohe Sensitivität erreicht werden, bei gleichzeitig hoher Sensitivität für E3'N<sup>2</sup>dG. Das Chromatogramm für die UHPLC-ESI-MS/MS-Messung von Standards mit einer Konzentration von 250 pM ist in Abbildung 23 dargestellt.

Die Intensität der beiden Übergänge von E3'N<sup>6</sup>dA war wesentlich höher als die von E3'N<sup>2</sup>dG. Bei E3'N<sup>6</sup>dA ist die Intensität der Quantifier- und Qualifierspur vergleichbar, während bei E3'N<sup>2</sup>dG die Qualifierspur eine wesentlich geringere Intensität hatte als die Quantifierspur.

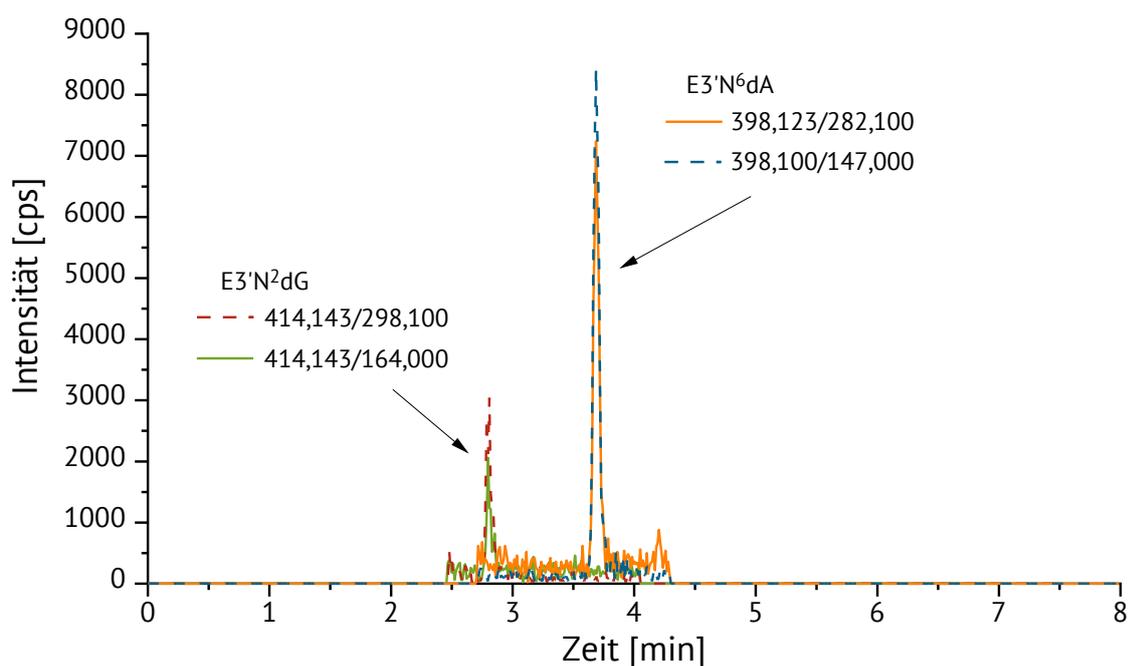


Abbildung 23: UHPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm (Messmodus: MRM) der UHPLC-ESI-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von E3'N<sup>2</sup>dG (rot: 414,143/298,100 und grün: 414,143/164,00) und E3'N<sup>6</sup>dA (orange: 398,123/282,100 und blau: 398,123/147,000). Beide Standards wurden in einer Konzentration von 250 pM angesetzt.

Abbildung 24 zeigt eine Messung von der Quantifierspur beider Standards mit einer Konzentration von 1 nM sowie der isotopenmarkierten Analoga der Standards. Den Standards wurden jeweils 1 nM der isotopenmarkierten Standards zugesetzt, was der Konzentration entspricht, die den DNA-Hydrolysaten während der Probenaufarbeitung zugesetzt wurde.

## Ergebnisse

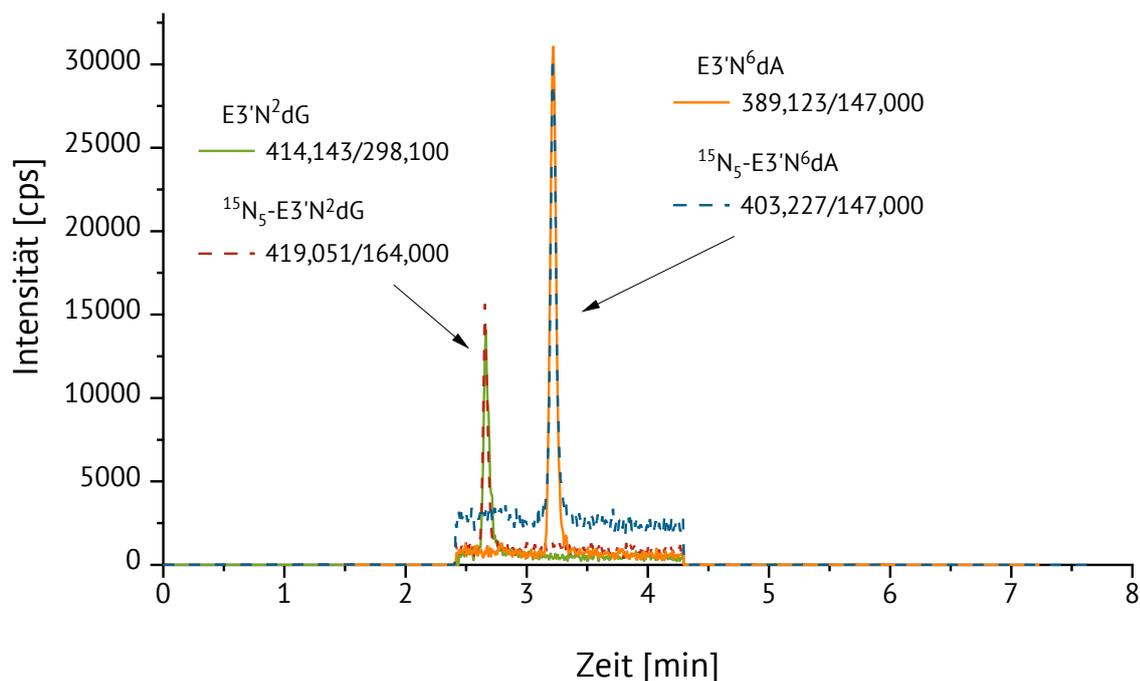


Abbildung 24: UPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm (Messmodus: MRM) der UHPLC-ESI-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von E3'N<sup>2</sup>dG (grün: 414,143/298,100) und E3'N<sup>6</sup>dA (orange: 389,123/147,00) mit <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>2</sup>dG (rot: 419,051/303,100) und <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>6</sup>dA (blau: 403,227/147,000). Alle Standards und isotope markierten Standards wurden in einer Konzentration von 1000 pM angesetzt.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) und der Bestimmungsgrenze (*limit of quantification*, LOQ) wurden die Standards beider Addukte im Konzentrationsbereich von 10 pM bis 10.000 pM vermessen. Als LOD wurde ein Peak angenommen, der dem Dreifachen des Grundrauschens (Signal-Rausch-Verhältnis über 3) entspricht, als LOQ das zehnfache des Grundrauschens (Signal Rauschverhältnis über 10). Zudem musste die Bedingung erfüllt sein, dass sowohl die Quantifierspur als auch die Qualifierspur vorhanden ist. Für die Methode ergab sich somit ein LOD für E3'N<sup>6</sup>dA von 25 pM und für E3'N<sup>2</sup>dG von 40 pM sowie ein LOQ von 55 pM bzw. 85 pM.

Die Standards der DNA-Addukte E3'N<sup>6</sup>dA und E3'N<sup>2</sup>dG wurden in Wasser gelöst, während es sich bei den Proben um DNA-Hydrolysate handelte. Um Matrixeffekt bei der Quantifizierung abschätzen zu können, wurde die Wiederfindung der beiden Addukte in der Matrix bestimmt. Dazu wurde aus nicht behandelten pRH DNA isoliert. Die erhaltenen DNA wurde wie die Proben enzymatisch hydrolysiert und die erhaltenen Hydrolysate mit verschiedenen Konzentrationen der Referenzsubstanzen (500 pM, 3.000 pM, 5.000 pM) versetzt. Zudem wurde jeder Probe eine Konzentration von 1.000 pM der isotope markierten Standards <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>2</sup>dG und <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>6</sup>dA zugesetzt. Für jede Konzentration wurde ein Triplikat angesetzt und jede Probe in einer Dreifachbestimmung gemessen. Die Mittelwerte der Messungen sind in Tabelle 19 dargestellt. Für E3'N<sup>2</sup>dG liegt die Wiederfindung für alle Proben zwischen 98 % und 118 % für E3'N<sup>6</sup>dA zwischen 101 % und 116 %.

## Ergebnisse

Tabelle 19: Bestimmung der Wiederfindung in der Matrix für E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA

E3'N <sup>2</sup> dG		
Soll	Messung	prozentuale Abweichung
500 pM	532 pM ± 14 pM	6,4
3.000 pM	3.095 pM ± 7 pM	3,1
5.000 pM	5.398 pM ± 42 pM	8,0
E3'N <sup>6</sup> dA		
Soll	Messung	prozentuale Abweichung
500 pM	542 pM ± 9 pM	8,4
3.000 pM	3.080 pM ± 27 pM	2,7
5.000 pM	5.671 pM ± 42 pM	13,4

Der Vergleich der Messungen der gespickten hydrolysierten DNA mit den in Wasser gelösten Standards zeigte, dass sowohl die Intensität als auch die Area beider Messungen vergleichbar ist. Somit kann der Matrixeffekt vernachlässigt werden.

Um die Wiederfindung der Gesamtmethode zu überprüfen, wurde 30 µg DNA, isoliert aus Rattenhepatozyten, mit Standard versetzt und anschließend wie die Proben behandelt. Die Daten zeigen, dass die Wiederfindung für beide Addukte zwischen 90 % und 118 % liegen.

Für beide Addukte lag die Streuung um den Mittelwert der Einzelmessungen der Standards unter 5 %. Gleiches gilt für die Abweichung des Mittelwerts von dem Sollwert für die Kalibriergerade.

### **4.3 Bestimmung der Zytotoxizität von Estragol in primären Rattenhepatozyten und verschiedenen Zelllinien**

Die Zytotoxizität wurde mittels Resazurin-Reduktionstest in primären Rattenhepatozyten sowie verschiedenen Zelllinien (HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen) getestet. Die Zellen wurden jeweils für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen Estragol im Konzentrationsbereich von 1 µM bis 2.000 µM inkubiert. Zusätzlich wurde in den HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen die Zytotoxizität nach 24 h Inkubation und einer anschließenden Erholungszeit von 72 h bestimmt. Dies entspricht dem Vorgehen des Mikrokerntest. Als Lösungsmittelkontrolle diente DMSO (0,1 %), als Positivkontrolle für die Zytotoxizität Saponin (0,1 %). Die Vitalität der Zellen wurde auf die Lösungsmittelkontrolle normiert, für die statistische Auswertung wurde die Vitalität auf die mitgeführte Mediumkontrolle (unbehandelte Zellen) normiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Positivkontrolle eine Vitalität von ≤ 5 % aufwies. Lag die Vitalität der Positivkontrolle oberhalb von 5 % wurden die Ergebnisse dieses Testdurchlaufes verworfen.

Zusätzlich zum Resazurin-Reduktionstest wurden die Zellmorphologie der pRH nach 24 h und 48 h Inkubationszeit lichtmikroskopisch überprüft. Ebenfalls wurde das Wachstumsverhalten und die Zellmorphologie der HepG2-CYP1A2-Zellen nach 24 h Inkubation sowie nach 24 h Inkubation mit anschließender Erholungsphase für 72 h betrachtet.

## Ergebnisse

Ziel der Bestimmung der Zytotoxizität war es, den Arbeitsbereich für die Inkubationen der primären Rattenhepatozyten zur Untersuchung der DNA-Adduktbildung und der HepG2-Zellen bzw. HepG2-CYP1A2-Zellen für den Mikrokerntest abzustecken.

Neben den pRH, HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen wurde die Zytotoxizität von Estragol nach einer Inkubationszeit von 24 h bzw. einer Inkubationszeit von 24 h und einer Erholungszeit von 18 h in V79-Zellen getestet. Die entsprechenden Daten sind im Anhang (Abbildung 49) dargestellt. Zusätzlich gibt Tabelle 52 (siehe Anhang) einen Überblick über alle Messdaten der Zellvitalität in den primären Hepatozyten und allen getesteten Zelllinien.

### **4.3.1 Bestimmung der Zytotoxizität von Estragol in primären Rattenhepatozyten**

#### **4.3.1.1 Resazurin-Reduktionstest**

Die Ergebnisse des Resazurin-Reduktionstest nach der Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Estragol für 24 h sind in Abbildung 25 dargestellt. Es konnte keine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellvitalität beobachtet werden. Die Zellvitalität lag, mit Ausnahme der höchsten Inkubationskonzentration, bei allen Inkubationskonzentrationen über 80 % und es konnte keine signifikante Abnahme der Zellvitalität im Vergleich zu Lösungsmittelkontrolle (0,1 DMSO) beobachtet werden. Ab einer Konzentration von 600  $\mu\text{M}$  konnte bei einigen Inkubationen bei lichtmikroskopischer Betrachtung die Bildung von Präzipitaten nach der Zugabe der Inkubationslösung zum Kulturmedium beobachtet werden.

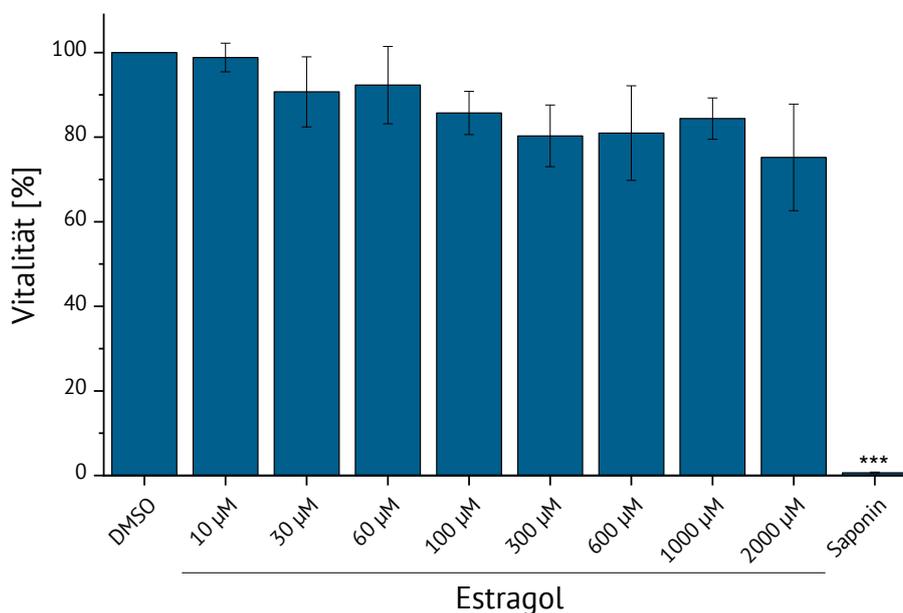
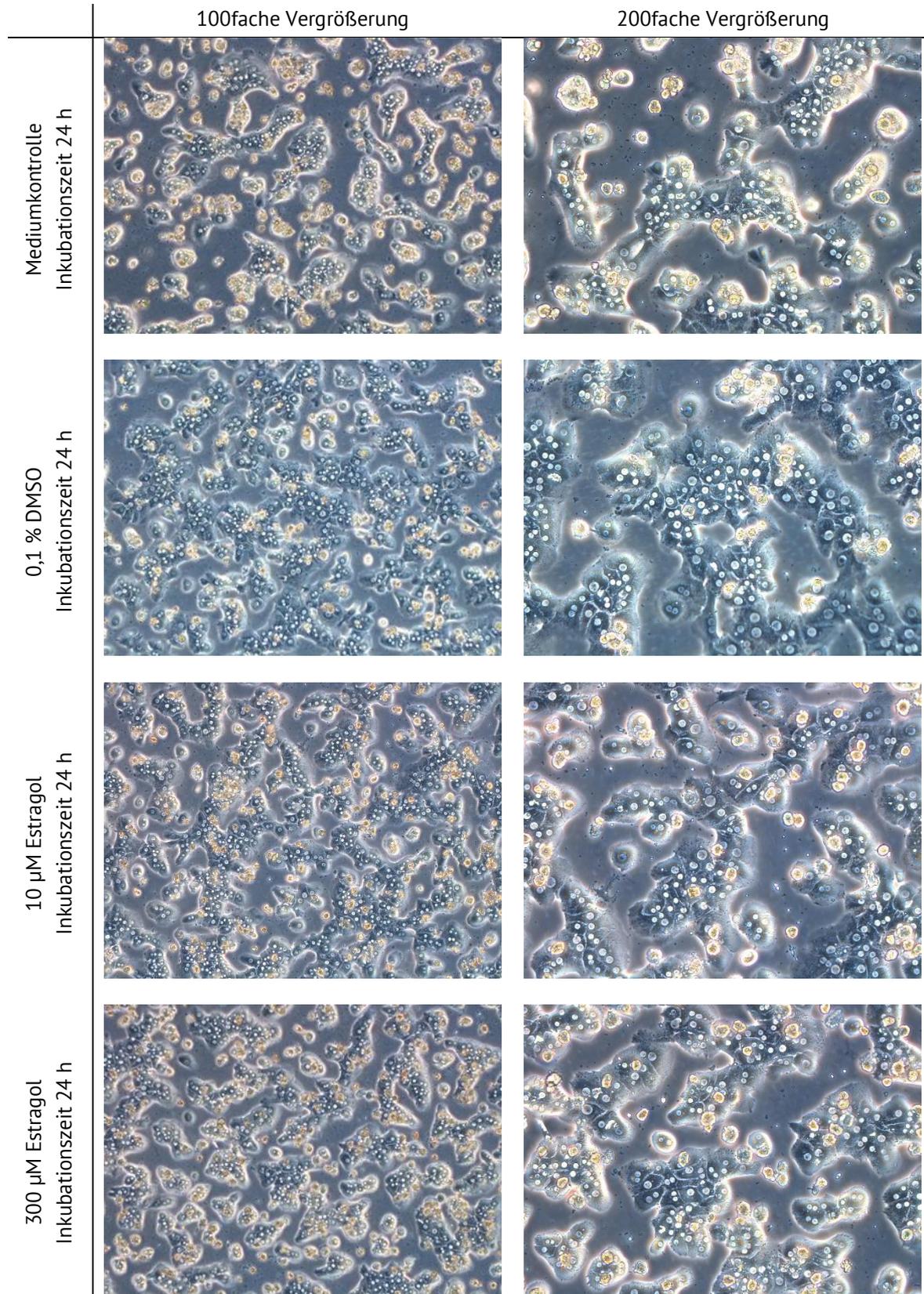


Abbildung 25: Ergebnisse des Resazurin-Reduktionstest nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Estragol nach einer Inkubationszeit von 24 h im Konzentrationsbereich von 10–2.000  $\mu\text{M}$ . Die Vitalität ist angegeben in % bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO). Bei der Angabe der Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=4). Die statistische Signifikanz wurde auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen, wobei für die statistische Auswertung alle Messwerte auf die Mediumkontrolle normiert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student-Newman-Keuls-Test.

## Ergebnisse

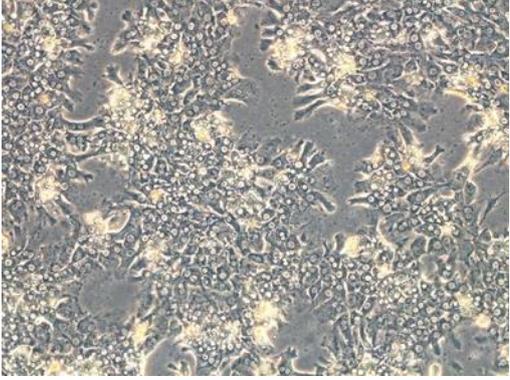
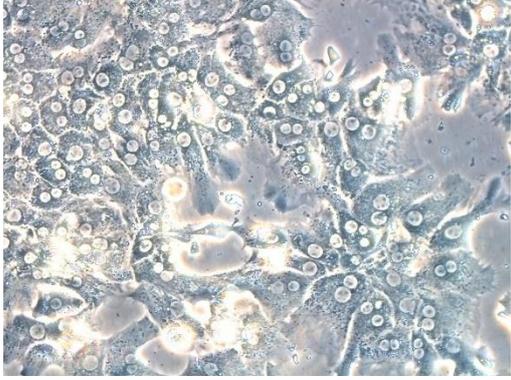
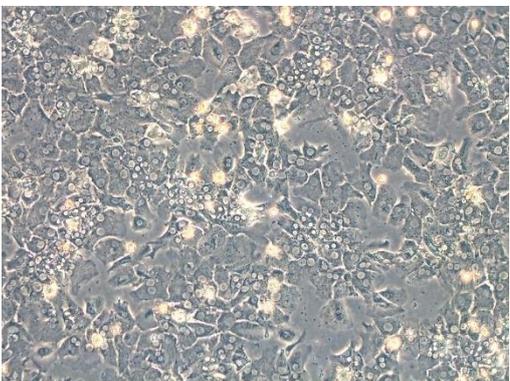
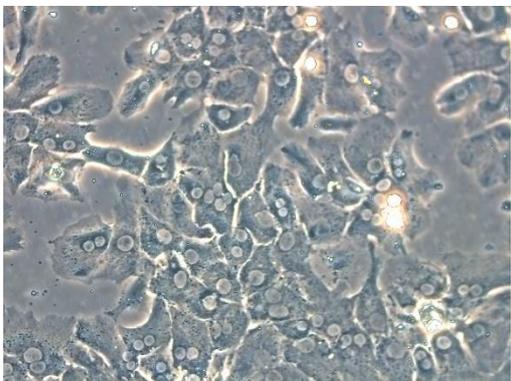
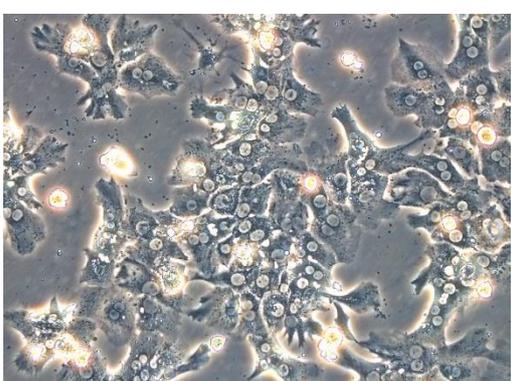
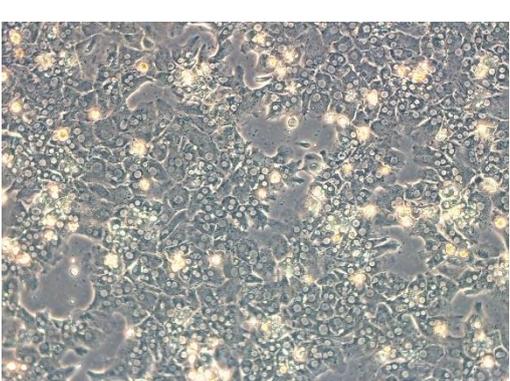
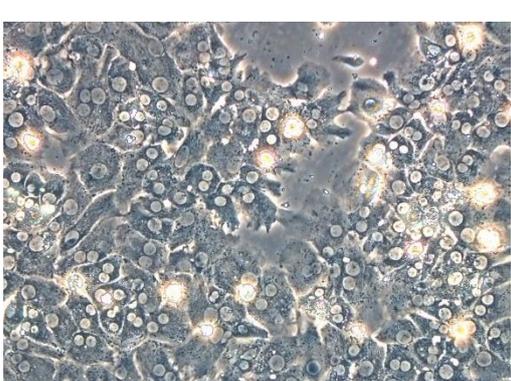
### 4.3.1.2 Lichtmikroskopische Auswertung

Tabelle 20: Lichtmikroskopische Aufnahmen von primären Rattenhepatozyten nach 24 h Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Estragol und 300  $\mu\text{M}$  Estragol im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle bzw. Mediumkontrolle. Die Zellen wurde mit einer Zelldichte von 7 Mio. Zellen/7 ml Kulturmedium in einer kollagenierten 100 mm Gewebekulturschale ausgesät und nach einer Anwachszeit von 3 h inkubiert



## Ergebnisse

Tabelle 21: Lichtmikroskopische Aufnahmen von primären Rattenhepatozyten nach 48 h Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Estragol und 300  $\mu\text{M}$  Estragol im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle bzw. Mediumkontrolle. Die Zellen wurde mit einer Zelldichte von 7 Mio. Zellen/7 ml Kulturmedium in einer kollagenierten 100 mm Gewebekulturschale ausgesät und nach einer Anwachszeit von 3 h inkubiert

	100fache Vergrößerung	200fache Vergrößerung
Mediumkontrolle Inkubationszeit 48 h		
0,1 % DMSO Inkubationszeit 48 h		
10 $\mu\text{M}$ Estragol Inkubationszeit 48 h		
300 $\mu\text{M}$ Estragol Inkubationszeit 48 h		

## Ergebnisse

Die Zellen wurden für die lichtmikroskopische Auswertung in 100 mm Gewebekulturschalen mit einer Zelldichte von 7 Mio. Zelle/7 ml Kulturmedium ausgesät. Das Kulturmedium wurde nach einer Anwuchszeit von 3 h gewechselt und die Zellen anschließend für 24 h bzw. 48 h mit 10  $\mu\text{M}$  bzw. 300  $\mu\text{M}$  Estragol inkubiert. Die gewählten Konzentrationen entsprechen der höchsten eingesetzten Inkubationskonzentration und einer mittleren Inkubationskonzentration für die Inkubation zur Untersuchung der DNA-Adduktbildung. Tabelle 20 bzw. 21 zeigen den Vergleich der Zellen nach einer Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  bzw. 300  $\mu\text{M}$  Estragol im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) nach einer Inkubationszeit von 24 h bzw. 48 h dargestellt. Die lichtmikroskopische Auswertung zeigte, dass sich bei einer Inkubationskonzentration von 300  $\mu\text{M}$  Estragol keine Präzipitate gebildet haben. Auch in der höchsten Inkubationskonzentration konnte weder nach 24 h noch nach 48 h Inkubationszeit eine Veränderung der Zellmorphologie im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet werden. Weiterhin gab es keine Hinweise auf einen erhöhten Anteil an toten Zellen, die sich von der Wachstumsoberfläche abgelöst haben.

### 4.3.2 Bestimmung der Zytotoxizität von Estragol in HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen

#### 4.3.2.1 Resazurin-Reduktionstest

Die Ergebnisse der Inkubation der HepG2-Zellen für 24 h mit Estragol bzw. 24 h mit Estragol und einer Nachinkubationszeit von 72 h sind in Abbildung 26 dargestellt.

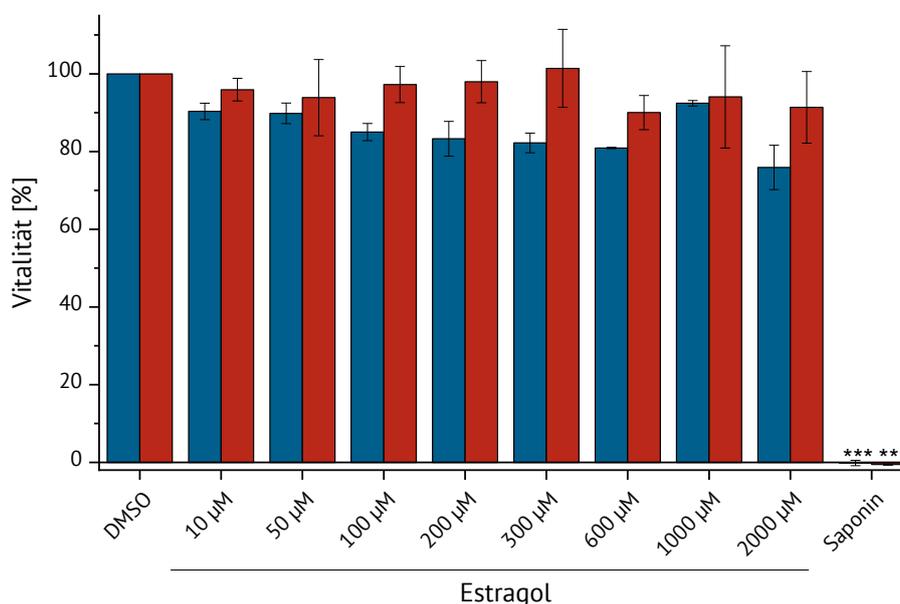


Abbildung 26: Ergebnisse des Resazurin-Reduktionstest nach Inkubation von HepG2-Zellen mit Estragol für eine Inkubationszeit von 24 h (blau) bzw. 24 h Inkubationszeit und einer Nachinkubationszeit von 72 h (rot) im Konzentrationsbereich von 10–2.000  $\mu\text{M}$ . Die Vitalität ist angegeben in % bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO). Bei der Angabe der Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n=3$ ). Die statistische Signifikanz wurde auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen, wobei für die statistische Auswertung alle Messwerte auf die Mediumkontrolle normiert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student-Newman-Keuls-Test.

Es konnte in den HepG2-Zellen sowohl nach einer Inkubationszeit von 24 h als auch nach einer Inkubationszeit von 24 h und anschließender Nachinkubationszeit von 72 h kein zytotoxischer

## Ergebnisse

Effekt beobachtet werden. Dabei lag die Zellvitalität nach 24 h Inkubation mit Estragol zwischen  $92,4 \% \pm 0,7 \%$  (Konzentration  $1.000 \mu\text{M}$ ) und  $75,9 \% \pm 5,7 \%$  (Konzentration  $2.000 \mu\text{M}$ ). Nach 24 h Inkubationszeit und 72 h Nachinkubationszeit lag die Zellvitalität zwischen  $101,4 \% \pm 10,0 \%$  (Konzentration  $300 \mu\text{M}$ ) und  $90,0 \% \pm 4,4 \%$  (Konzentration  $600 \mu\text{M}$ ). Weder nach 24 h Inkubation noch nach 24 h Inkubation und einer Nachinkubationszeit von 72 h konnte eine signifikante Abnahme der Zellvitalität bzw. eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellvitalität beobachtet werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Zytotoxizität mit und ohne Nachinkubationszeit.

Die Ergebnisse des Resazurin-Reduktionstest in HepG2-CYP1A2-Zellen sind in Abbildung 27 dargestellt. Ab einer Konzentration von  $30 \mu\text{M}$  Estragol ist nach einer Inkubationszeit von 24 h eine höchst signifikante Abnahme der Zellvitalität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zu beobachten. Die Reduktion der Zellvitalität ist nicht konzentrationsabhängig und schwankt zwischen  $67,1 \% \pm 1,3 \%$  (Konzentration  $300 \mu\text{M}$ ) und  $78,9 \% \pm 0,5 \%$  bzw.  $78,3 \% \pm 3,7 \%$  (Konzentration  $30 \mu\text{M}$  bzw.  $2.000 \mu\text{M}$ ). Es ist der Trend zu beobachten, dass die Zellvitalität bis zu einer Konzentration von  $300 \mu\text{M}$  abnimmt und danach wieder leicht ansteigt.

Nach einer Inkubationszeit von 24 h und anschließender Nachinkubationszeit von 72 h wurde ab einer Konzentration von  $30 \mu\text{M}$  eine hoch signifikante Abnahme der Zellvitalität im Vergleich zu Lösungsmittelkontrolle ( $0,1 \%$  DMSO) beobachtet, ab einer Konzentration von  $300 \mu\text{M}$  eine höchst signifikante Abnahme. Es konnte derselbe Trend beobachtet wie nach einer Inkubationszeit von 24 h. Auch nach einer Inkubationszeit von 24 h mit Estragol und anschließender Erholungsphase zeigte sich keine konzentrationsabhängige Verminderung der Zellvitalität.

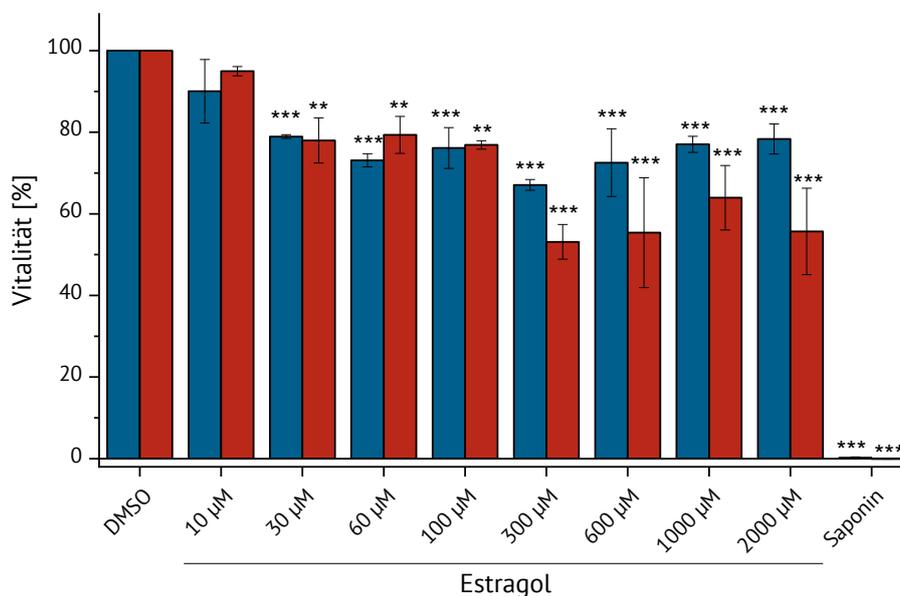


Abbildung 27: Ergebnisse des Resazurin-Reduktionstest nach Inkubation von HepG2-CYP1A2-Zellen mit Estragol für eine Inkubationszeit von 24 h (blau) bzw. 24 h Inkubationszeit und einer Nachinkubationszeit von 72 h (rot) im Konzentrationsbereich von  $10\text{--}2.000 \mu\text{M}$ . Die Vitalität ist angegeben in % bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle ( $0,1 \%$  DMSO). Bei der Angabe der Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n=3$ ). Die statistische Signifikanz wurde auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen, wobei für die statistische Auswertung alle Messwerte auf die Mediumkontrolle normiert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student-Newman-Keuls-Test.

## Ergebnisse

Vergleicht man die Ergebnisse der Inkubation der HepG2-CYP1A2-Zellen für 24 h mit Estragol und 24 h mit Estragol und einer Nachinkubationszeit von 72 h fällt auf, dass die Zellvitalität ab einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  bei der Inkubation mit Nachinkubationszeit deutlich verringert war. Bei einer Konzentration von 600  $\mu\text{M}$  ist der Effekt signifikant, bei 2.000  $\mu\text{M}$  hoch signifikant. Der Vergleich der Inkubation der HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen für eine Inkubationszeit von 24 h zeigt den Trend, dass die Zellvitalität der HepG2-CYP1A2-Zellen stärker verringert war (Daten siehe Anhang; Abbildung 48). Der Effekt war bei keiner getesteten Inkubationskonzentration signifikant. Bei einem Vergleich der Inkubationen nach 24 h Inkubation mit Estragol und einer Nachinkubationszeit von 72 h der HepG2-Zellen und der HepG2-CYP1A2-Zellen fällt auf, dass die Zellvitalität der HepG2-CYP1A2-Zellen deutlich stärker verringert wurde als bei den nicht transfizierten HepG2-Zellen. Ab einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  Estragol ist der Unterschied höchst signifikant, mit Ausnahme der Konzentration von 1.000  $\mu\text{M}$  Estragol. Bei dieser ist der Unterschied hoch signifikant. Im Vergleich zur 24stündigen Inkubation ist der Unterschied zwischen den beiden Ziellinien größer.

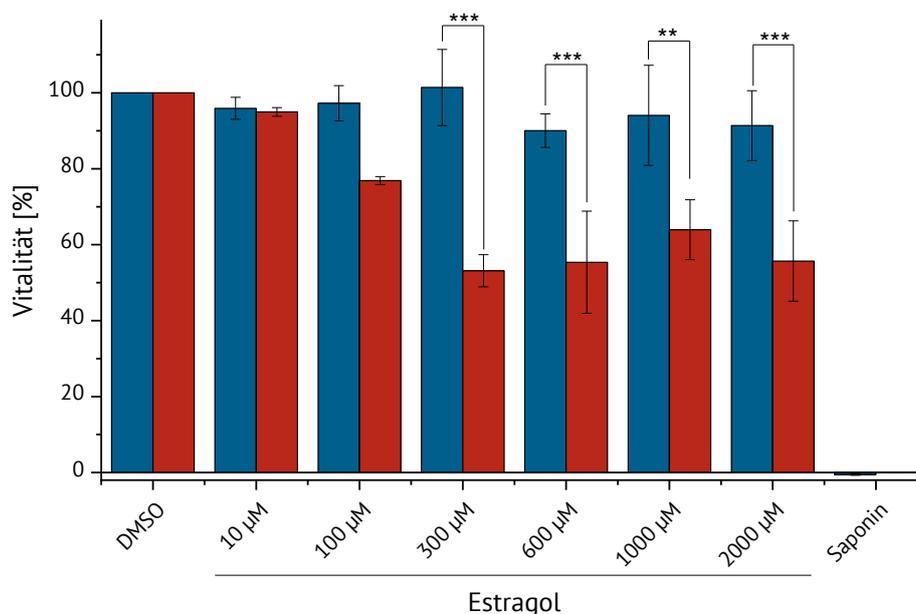


Abbildung 28: Vergleich der Ergebnisse des Resazurin-Reduktionstest nach Inkubation von HepG2-Zellen (blau) bzw. HepG2-CYP1A2-Zellen (rot) mit Estragol für 24 h und einer Nachinkubationszeit von 72 h. Die Vitalität ist angegeben in % bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO). Bei der Angabe der Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3). Die statistische Signifikanz gibt den Unterschied zwischen den Zelllinien an. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student-Newman-Keuls-Test.

Zusätzlich zur Zytotoxizität von Estragol wurde in HepG2-CYP1A2-Zellen die Zytotoxizität von Mitomycin C (MMC) untersucht, welches für den Mikrokerntest als Positivkontrolle diente. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt. Sowohl nach 24 h Inkubation als auch nach 24 h Inkubation und anschließender Nachinkubationszeit von 72 h wurde eine signifikante Verringerung der Zellvitalität beobachten. Nach 24 h Inkubation lag die Zellvitalität bei beiden Konzentrationen mit 77,4 %  $\pm$  4,0 % für die Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  MMC bzw. 78,8 %  $\pm$  3,4 % für die Konzentration von 0,6  $\mu\text{M}$  MMC deutlich über 50 %, was eine Bedingung für die Verwendung im Mikrokerntest ist (OECD, 2016). Ein starker zytotoxischer Effekt war erst nach der

## Ergebnisse

Erholungsphase von 72 h zu beobachten. Dabei lag die Zellvitalität bei beiden getesteten Konzentrationen bei ca. 30 %.

Tabelle 22: Zellvitalität von HepG2-CYP1A2-Zellen nach der Inkubation mit 0,5  $\mu\text{M}$  bzw. 0,6  $\mu\text{M}$  MMC für 24 h sowie für 24 h und einer anschließenden Nachinkubationszeit von 72 h. Die Vitalität ist bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (n=3)

	24 h Inkubationszeit	24 h Inkubationszeit + 72 h Nachinkubationszeit
0,5 $\mu\text{M}$ MMC	77,4 % $\pm$ 4,0 %	30,3 % $\pm$ 0,5 %
0,6 $\mu\text{M}$ MMC	78,8 % $\pm$ 3,4 %	28,3 % $\pm$ 0,9 %

### 4.3.2.2 Lichtmikroskopische Auswertung

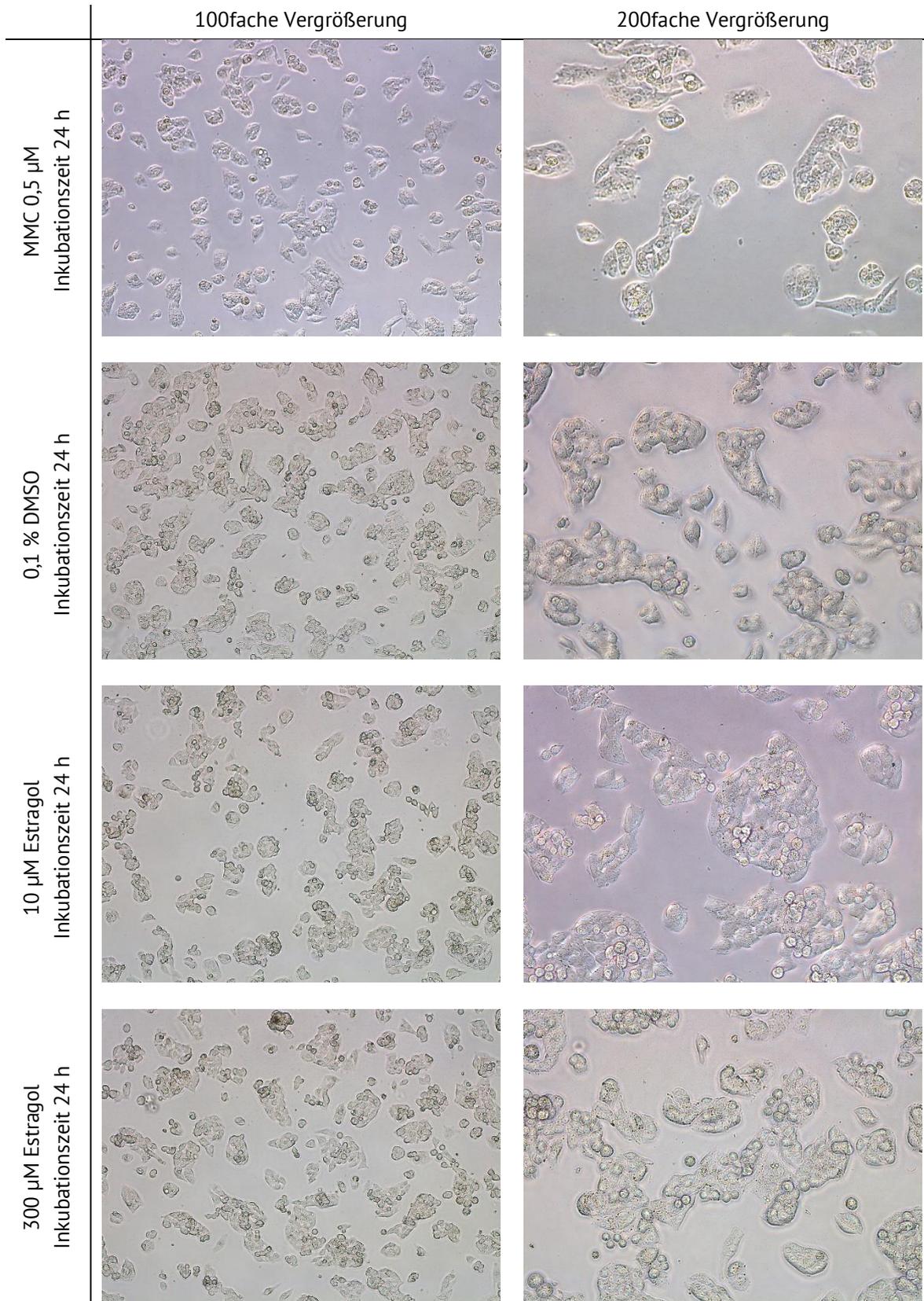
Neben dem Resazurin-Reduktionstest wurden die HepG2-CYP1A2-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h sowie einer Inkubationszeit von 24 h und einer Nachinkubationszeit von 72 h lichtmikroskopisch betrachtet. Dazu wurden 700.000 Zellen/2 ml Kulturmedium in 60 mm Gewebekulturschalen ausgesät und nach einer Anwachszeit von 24 h inkubiert. Die Zellen wurden mit der Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO), der Positivkontrolle (0,5  $\mu\text{M}$  MMC) sowie mit einer mittleren Konzentration Estragol (10  $\mu\text{M}$ ) und der höchsten verwendeten Inkubationskonzentration Estragol (300  $\mu\text{M}$ ) im Mikrokerntest inkubiert. In Tabelle 23 ist der Vergleich der Zellen nach einer Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  bzw. 300  $\mu\text{M}$  Estragol sowie der Positivkontrolle zur Lösungsmittelkontrolle nach einer Inkubationszeit von 24 h, in Tabelle 24 nach einer Inkubationszeit von 24 h und anschließender Erholungsphase von 72 h dargestellt.

Bei einer Inkubationszeit von 24 h konnte lichtmikroskopisch keine Veränderung der Zellmorphologie zwischen der Lösungsmittelkontrolle und der Inkubationen mit 10  $\mu\text{M}$  bzw. 300  $\mu\text{M}$  Estragol beobachtet werden. Auch die Zelldichte war bei allen drei Inkubationen vergleichbar. Die Zellen sind nach der 24stündigen Inkubationszeit nicht konfluent. Bei der Wahl der Zelldichte zur Aussaat der Zellen wurde die Zelldichte so gewählt, dass nach der Erholungsphase die Zellen zu 80–90 % konfluent waren. Daher war zu diesem Zeitpunkt keine Konfluenz zu erwarten. Nach Inkubation der Zellen mit 0,5  $\mu\text{M}$  MMC konnte nach 24 h eine Reduzierung der Zelldichte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) beobachtet werden. Zudem war auffällig, dass die gebildeten Zellkolonien aus weniger Zellen bestanden.

Nach einer Inkubationszeit von 24 h und weiterer Kultivierung der Zellen für 72 h erreichte der Zellrasen in der Lösungsmittelkontrolle ca. 80 % Konfluenz. Die Zellen wuchsen zum Großteil als Monolayer, wobei sich auch eigene Polylayer ausbildeten. Die Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Estragol zeigte weder in der Zellmorphologie noch in der Zelldichten einen Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle. Im Vergleich dazu war die Zelldichte bei der Inkubation mit 300  $\mu\text{M}$  Estragol deutlich verringert (ca. 50–60 % Konfluenz). Die Zellen bildeten wie erwartet Kolonien und waren in der Zellmorphologie nicht verändert. Die Inkubation mit 0,5  $\mu\text{M}$  MMC führte zu einer starken Verminderung der Zellzahl. Zudem kam es zu weniger Zell-Zell-Kontakten und es ist keine Koloniebildung zu beobachten. Neben den vitalen abgeflachten Zellen, die Zell-Zell-Verbindungen ausbilden, sind viele runde Zellen zu beobachten, was auf einen hohen Anteil abgestorbener Zellen hindeutet.

## Ergebnisse

Tabelle 23: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HepG2-CYP1A2-Zellen nach 24 h Inkubation mit 0,5  $\mu\text{M}$  MMC, 10  $\mu\text{M}$  Estragol und 300  $\mu\text{M}$  Estragol im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO). Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 700.000 Zellen/2 ml in einer 30 mm Gewebekulturschale ausgesät und nach einer Anwuchszeit von 24 h inkubiert.



## Ergebnisse

Tabelle 24: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HepG2-CYP1A2-Zellen nach 24 h Inkubation mit 0,5  $\mu\text{M}$  MMC, 10  $\mu\text{M}$  Estragol und 300  $\mu\text{M}$  Estragol und anschließender Nachinkubationszeit für 72 h ohne Testsubstanz im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO). Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 700.000 Zellen/2 ml in 30 mm Gewebekulturschalen ausgesät

	100fache Vergrößerung	200fache Vergrößerung
MMC 0,5 $\mu\text{M}$ Inkubationszeit 24 h + 72 h		
0,1 % DMSO Inkubationszeit 24 h + 72 h		
10 $\mu\text{M}$ Estragol Inkubationszeit 24 h + 72 h		
300 $\mu\text{M}$ Estragol Inkubationszeit 24 h + 72 h		

#### **4.4 Bestimmung der Genotoxizität von Estragol in HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen**

Das genotoxische Potential von Estragol wurde in HepG2-Zellen sowie HepG2-CYP1A2-Zellen mittels Mikrokerntest untersucht. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 700.000 Zellen/2 ml Kulturmedium in 30 mm Gewebekulturschalen ausgesät. Nach einer Anwachszeit von 24 h wurden die Zellen für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen Estragol inkubiert. Zusätzlich wurde eine Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) und eine Positivkontrolle (0,5  $\mu$ M MMC) mitgeführt. Nach der Inkubation wurden die Zellen für weitere 72 h ohne Testsubstanz kultiviert. Die Ergebnisse des Mikrokerntest sind in Abbildung 29 dargestellt (Daten der Einzelwerte siehe Anhang, Tabelle 53).

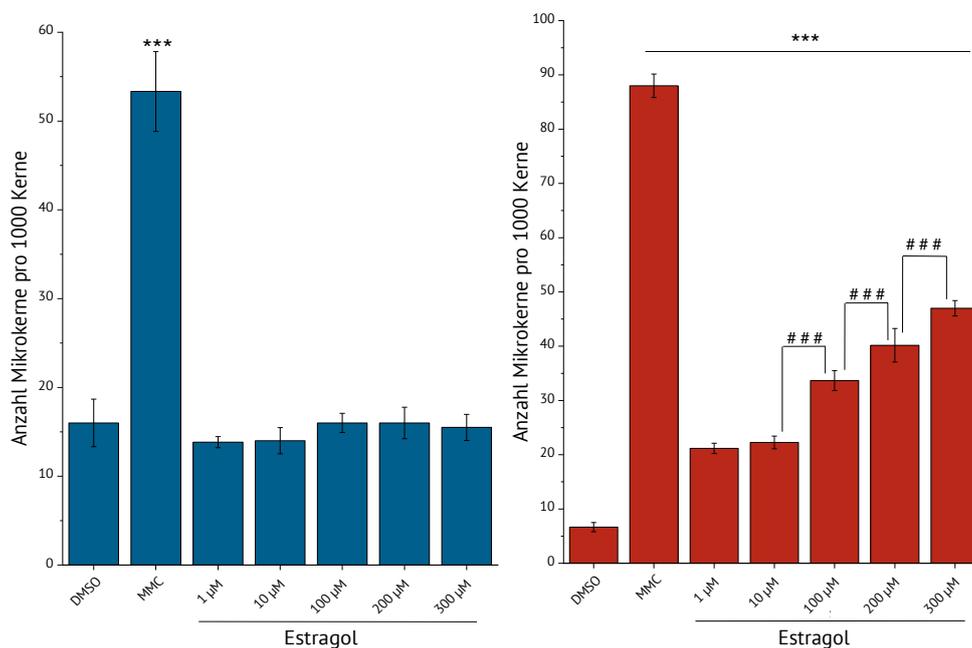


Abbildung 29: Ergebnisse des Mikrokerntest nach Inkubation von HepG2-Zellen (blau) bzw. HepG2-CYP1A2-Zellen (rot) nach 24 h Inkubation mit Estragol und einer Nachinkubationszeit von 72 h im Konzentrationsbereich von 1–300  $\mu$ M bzw. 0,5  $\mu$ M MMC. Bei der Angabe der Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3). Angegeben ist die Anzahl der Mikrokerne pro 1.000 Kerne. Ausgezählt wurden die Zellen in einer Doppelbestimmung. Die statistische Signifikanz wurde auf die Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO (\*)) bzw. auf die niedriger Inkubationskonzentration (#) bezogen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student-Newman-Keuls-Test.

Die HepG2-Zellen zeigten eine spontane Mikrokernrate von  $16 \pm 3$  Mikrokerne/1.000 Kerne in der Lösungsmittelkontrolle. Bei der Behandlung mit der Positivkontrolle (0,5  $\mu$ M MMC) wurde eine Mikrokernrate von  $53 \pm 4$  Mikrokerne/1.000 Kerne beobachtet. HepG2-CYP1A2-Zellen zeigten mit  $7 \pm 1$  Mikrokerne/1.000 Kerne in der Lösungsmittelkontrolle im Vergleich zu den HepG2-Zellen eine geringere spontane Bildung von Mikrokerne. Gleichzeitig reagieren HepG2-CYP1A2-Zellen empfindlicher auf die Positivkontrolle mit einer Mikrokernrate von  $88 \pm 2$  Mikrokerne/1.000 Kerne. Sowohl in HepG2-Zellen als auch in HepG2-CYP1A2-Zellen war nach Inkubation mit MMC die Mikrokernrate höchst signifikant gegenüber der Lösungsmittelkontrolle erhöht.

## Ergebnisse

Nach Inkubation von HepG2-Zellen mit Estragol ist kein Anstieg der Mikrokernrate zu beobachten. Bei der Inkubation von HepG2-CYP1A2-Zellen mit Estragol zeigte sich bereits ab einer Inkubationskonzentration von 1 µM eine höchst signifikante Erhöhung der Mikrokernrate. Im gesamten getesteten Konzentrationsbereich von 1–300 µM Estragol im Kulturmedium ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Mikrokernrate zu beobachten.

Um die Ergebnisse der beiden Zelllinien besser vergleichen zu können wurde die Mikrokernrate der Lösungsmittelkontrolle auf 1 normiert, um die x-fache Induktion der Mikrokernrate in Bezug auf die DMSO-Kontrolle zu berechnen. Die Ergebnisse sind in Tabellen 25 dargestellt. Bei HepG2-Zellen wurde ein 3,3fache Erhöhung der Mikrokernrate nach Inkubation mit MMC beobachtet während nach der Inkubation mit Estragol keine Erhöhung der Mikrokernrate beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde nach Inkubationen der HepG2-CYP1A2-Zellen mit Estragol bei allen Inkubationskonzentrationen eine Erhöhung der Mikrokernrate beobachtet. Diese lag zwischen den 3,2fachen (1 µM Estragol) und dem 7,1fachen (300 µM). Wie schon aus den absoluten Zahlen zu erkennen war reagierten die HepG2-CYP1A2-Zellen empfindlicher auf MMC, wobei der Mikrokernrate durch MMC um das 13,2fache erhöht wurde.

Tabelle 25: Ergebnisse des Mikrokerntest in HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen bezogen auf die DMSO-Kontrolle. Die DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normiert.

	x-fache Induktion der Mikrokernrate in HepG2-Zellen nach Inkubation mit Estragol	x-fache Induktion der Mikrokernrate in HepG2-CYP1A2-Zellen nach Inkubation mit Estragol
DMSO	1,0	1,0
MMC	3,3	13,2
1 µM Estragol	0,9	3,2
10 µM Estragol	0,9	3,3
100 µM Estragol	1,0	5,1
200 µM Estragol	1,0	6,0
300 µM Estragol	1,0	7,1

### **4.5 Untersuchung der zeit- und konzentrationsabhängigen Bildung von E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit Estragol**

Für die Untersuchung der Bildung der beiden DNA-Addukte *N*<sup>2</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin (E3'N<sup>2</sup>dG) und *N*<sup>6</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-3'-desoxyadenosin (E3'N<sup>6</sup>dA) wurden primäre Rattenhepatozyten mit einer Zelldichte von 7 Mio. Zellen/7 ml Kulturmedium in 100 mm Gewebekulturschalen ausgesät. Nach einer Anwachszeit von 3–4 h wurden die Zellen mit Konzentrationen von 0,01–300 µM Estragol inkubiert. Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO (0,1 %) mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 1, 6, 24 bzw. 48 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, geerntet und lysiert. Nach Zelllyse wurde die DNA extrahiert und die DNA nach

## Ergebnisse

Einstellung des DNA-Gehaltes mit isotoopenmarkiertem Standard versetzt und hydrolysiert. Nach der Probenaufarbeitung wurden die DNA-Adduktlevel mittels UHPLC-ESI-MS/MS bestimmt. Die Ergebnisse der Bestimmung der DNA-Adduktlevel sind in Abbildung 30 für E3'N<sup>2</sup>dG und in Abbildung 31 für E3'N<sup>6</sup>dA dargestellt. Weder bei der Inkubation mit 0,01 µM Estragol noch mit 0,05 µM Estragol konnten DNA-Addukte detektiert werden. Zur Übersichtlichkeit werden daher im Folgenden die Ergebnisse der Inkubationen mit der Konzentration von 0,01 µM nicht dargestellt. In der Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) konnten weder E3'N<sup>2</sup>dG noch E3'N<sup>6</sup>dA detektiert werden.

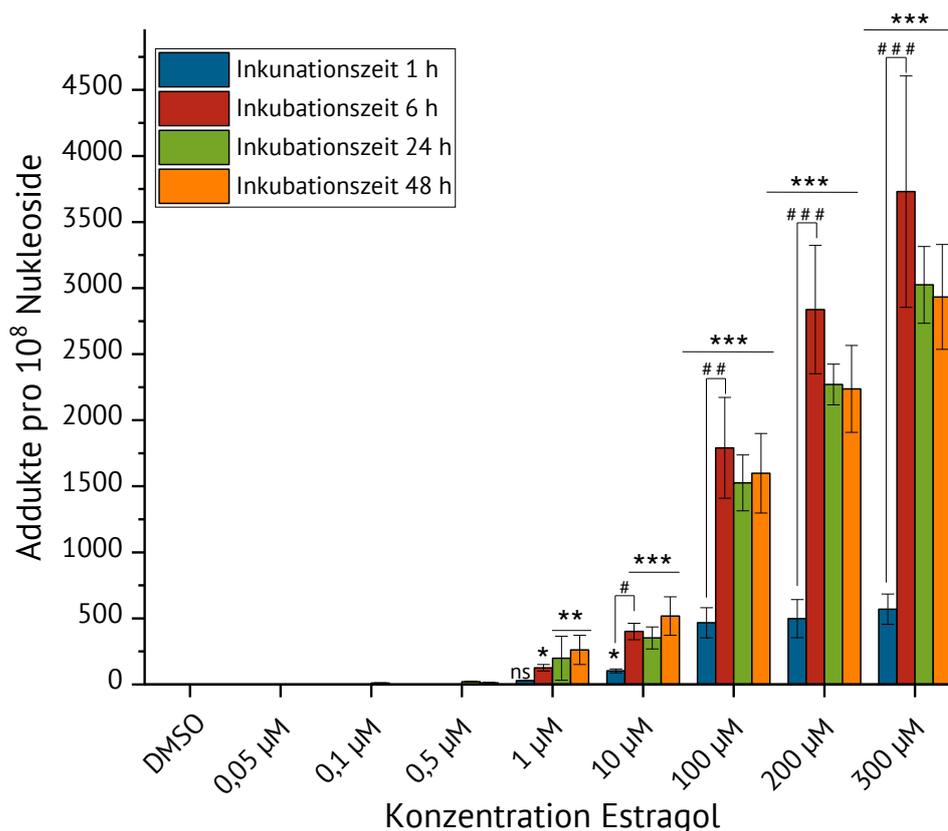


Abbildung 30: Bildung von E3'N<sup>2</sup>dG in pRH nach Inkubation mit Estragol für 1, 6, 24, und 48 h. Bei der Angabe der Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3). Die Messung erfolgte in Duplikaten, welche jeweils zweimal gemessen wurden. Die statistische Signifikanz wurde auf die Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) (\*) bzw. auf den vorherigen Inkubationszeitpunkt (#) bezogen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student-Newman-Keuls-Test.

Ab einer Inkubationskonzentration von 0,1 µM und einer Inkubationszeit von 24 h konnte die Bildung von E3'N<sup>2</sup>dG beobachtet werden. Bei einer Konzentration von 1 µM wurde zu allen Inkubationszeitpunkten E3'N<sup>2</sup>dG detektiert. Im geringeren Konzentrationsbereich bis einschließlich 10 µM Estragol ist der Trend zu beobachten, dass über den kompletten Zeitverlauf die Bildung von E3'N<sup>2</sup>dG zunimmt. Dieser Trend ist statistisch nicht signifikant. Ab einer Inkubationskonzentration von 100 µM wurden die höchsten Adduktlevel nach einer Inkubationszeit von 6 h beobachtet. Mit längerer Inkubationszeit nahmen die Adduktlevel ab, wobei es hier zu keiner statistisch signifikanten Abnahme der Adduktlevel kam.

## Ergebnisse

Ab 1  $\mu\text{M}$  Estragol im Kulturmedium ist ein hoch signifikanter Unterschied der Adduktlevel von E3'N<sup>2</sup>dG im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle bei 6 h Inkubationszeit und ein höchst signifikanter Unterschied bei der Inkubationszeit von 24 h bzw. 48 h zu beobachten. Bei einer Inkubationszeit von 1 h ist erst ab eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ein statistisch signifikanter Anstieg der DNA-Addukte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zu beobachten. Die Bildung von E3'N<sup>2</sup>dG ist bei einer Inkubationszeit von 6 h, 24 h und 48 h konzentrationsabhängig.

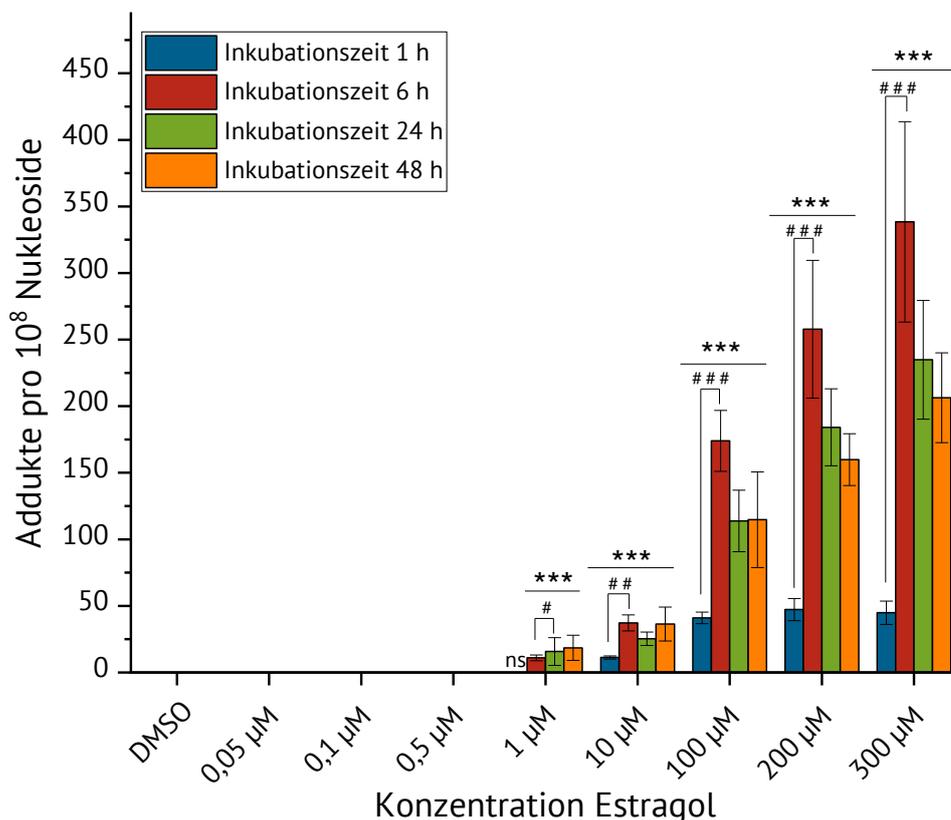


Abbildung 31: Bildung von E3'N<sup>6</sup>dA in pRH nach Inkubation mit Estragol für 1, 6, 24, und 48 h. Bei der Angabe der Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3). Die Messung erfolgte in Duplikaten, welche jeweils zweimal gemessen wurden. Die statistische Signifikanz wurde auf die Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) (\*) bzw. auf den vorherigen Inkubationszeitpunkt (#) bezogen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student-Newman-Keuls-Test.

Die Bildung von E3'N<sup>6</sup>dA konnte erst ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Estragol im Kulturmedium beobachtet werden, wobei nach 1 h Inkubationszeit erst ab 10  $\mu\text{M}$  Estragol E3'N<sup>6</sup>dA detektiert wurde. Nach Inkubation der Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  Estragol war über den kompletten Zeitverlauf ein Anstieg der Adduktlevel von E3'N<sup>6</sup>dA zu beobachten. Nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Estragol ist ein starker Anstieg der Adduktlevel zwischen 1 h und 6 h Inkubationszeit zu beobachten, wobei die Adduktlevel im weiteren Zeitverlauf relativ konstant blieben. Der Unterschied zwischen den einzelnen Inkubationszeitpunkten war nicht signifikant. Ab einer Inkubationskonzentration von 100  $\mu\text{M}$  sind die höchsten Adduktlevel nach einer Inkubationszeit von 6 h detektiert worden. Danach kam es zu einer deutlichen Abnahme der Adduktlevel zwischen einer Inkubationszeit von 6 h und 24 bzw. 48 h, die allerdings nicht statistisch signifikant war. Bei den Inkubationszeitpunkten 6, 24 und 48 h ist die Bildung von E3'N<sup>6</sup>dA konzentrationsabhängig.

## Ergebnisse

Die beobachteten Trends für die Bildung von E3'N<sup>2</sup>dG, E3'N<sup>6</sup>dA sowie der Gesamtanzahl der Addukte waren identisch. E3'N<sup>2</sup>dG konnte schon bei geringen Inkubationskonzentrationen (ab 0,1 µM, Inkubationszeit 24 h) detektiert werden als E3'N<sup>6</sup>dA (ab 1 µM, Inkubationszeit 6 h). Bei allen Inkubationskonzentrationen und Inkubationszeitpunkten handelte es sich bei E3'N<sup>2</sup>dG um das Hauptaddukt. Dabei sind die gebildeten Level an E3'N<sup>2</sup>dG im Mittel um den Faktor 12 höher als die Adduktlevel von E3'N<sup>6</sup>dA.

In folgender Tabelle sind die Ergebnisse der Bestimmung der DNA-Adduktlevel von E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA zusammengefasst. Zusätzlich ist die Gesamthöhe der Addukte mit angegeben.

Tabelle 26: Ergebnisse der Bildung von E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation für 1, 6, 24 und 48 h. Bei der Angabe der Daten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3). Die Messung erfolgte in Duplikaten, welche jeweils zweimal gemessen wurden.

DNA Adduktlevel E3'N <sup>2</sup> dG				
c (Estragol)	1 h	6 h	24 h	48 h
0,01 µM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
0,05 µM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
0,1 µM	0 ± 0	0 ± 0	11 ± 2	0 ± 0
0,5 µM	0 ± 0	0 ± 0	21 ± 3	13 ± 3
1 µM	30 ± 3	127 ± 25	199 ± 167	263 ± 110
10 µM	103 ± 15	401 ± 62	352 ± 83	518 ± 146
100 µM	467 ± 114	1791 ± 382	1526 ± 212	1599 ± 301
200 µM	498 ± 145	2837 ± 485	2271 ± 154	2237 ± 328
300 µM	569 ± 115	3730 ± 875	3025 ± 291	2933 ± 397
DNA Adduktlevel E3'N <sup>6</sup> dA				
c (Estragol)	1 h	6 h	24 h	48 h
0,01 µM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
0,05 µM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
0,1 µM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
0,5 µM	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
1 µM	0 ± 0	11 ± 2	16 ± 10	19 ± 9
10 µM	11 ± 1	37 ± 6	25 ± 5	36 ± 13
100 µM	41 ± 4	174 ± 23	114 ± 23	115 ± 36
200 µM	47 ± 8	256 ± 52	184 ± 29	160 ± 19
300 µM	45 ± 9	338 ± 75	235 ± 45	206 ± 34
DNA Adduktlevel E3'N <sup>2</sup> dG + E3'N <sup>6</sup> dA				
c (Estragol)	1 h	6 h	24 h	48 h
0,01 µM	0	0	0	0
0,05 µM	0	0	0	0
0,1 µM	0	0	11	0
0,5 µM	0	0	21	13
1 µM	30	138	215	282
10 µM	114	447	377	554
100 µM	508	1965	1640	1714
200 µM	545	3093	2455	2397
300 µM	569	4068	3260	3137

---

## 5 DISKUSSION

---

### **5.1 Untersuchung der Reaktivität von 1'-Acetoxyestragol und (E)-3'-Acetoxyisoestragol gegenüber DNA-Basen und Synthese von Standards E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA sowie der stabilisotopen-markierten Standards <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>2</sup>dG und <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>6</sup>dA**

Studien zum Metabolismus von Estragol zeigten, dass das ultimale Kanzerogen, welches zur Bildung von DNA-Addukte führt, nach metabolischer Aktivierung entsteht. Dabei spielt der Metabolit 1'-Sulfoxyestragol eine entscheidende Rolle. (Punt et al., 2016) Die möglichen Reaktionswege für die Bildung der DNA-Addukte ist beispielhaft für die Bildung von E3'N<sup>2</sup>dG in Abbildung 32 dargestellt.

Durch die spontane Abspaltung der Sulfatgruppe von 1'-Sulfoxyestragol entsteht ein Carbeniumion, welches mit der DNA reagieren kann. Durch das Mesomerie-stabilisierte System der C3-Seitenkette kommt es zur Isomerisierung der Doppelbindung. Bei diesem Reaktionsmechanismus würde es sich um eine S<sub>N</sub>1-Reaktion handeln. Neben der S<sub>N</sub>1-Reaktion ist auch ein Reaktionsverlauf über einen S<sub>N</sub>2-Mechanismus denkbar. Dabei reagiert der Schwefelsäureester direkt mit der Aminogruppe der DNA-Base. Diese kann wie in Abbildung 32 an der 3'-Position der Seitenkette oder der 1'-Position der Seitenkette (nicht dargestellt) erfolgen. Der S<sub>N</sub>2-Reaktion an der 1'-Position würde zu N<sup>2</sup>-(estragol-1'-yl)-desoxyguanosin führen, wobei diese DNA-Addukt in der Literatur als Nebenaddukt identifiziert wurde. (Phillips et al., 1981; Wiseman et al., 1985)

Die chemische Synthese von E3'N<sup>6</sup>dA und E3'N<sup>2</sup>dG erfolgte über die acetylierten Verbindungen. Diese sind in wässriger Lösung instabil und zerfallen zu dem entsprechenden Carbeniumion. (Phillips et al., 1981; Wakazono et al., 1998). Für 1'-Acetoxyestragol konnte gezeigt werden, dass es in Wasser und PBS schnell zerfällt und eine sehr geringe Halbwertszeit von ca. 1,8 min aufweist (Phillips und Hanawalt, 1982). Zudem ist die Acetylgruppe eine gute Abgangsgruppe, wodurch auch die Reaktion über einen S<sub>N</sub>2-Mechanismus möglich wäre.

In dieser Arbeit wurde die Synthese sowohl mit der 1'-acetylierten als auch mit der 3'-acetylierten Verbindung durchgeführt. Die Reaktionsansätze in dieser Arbeit wurden wie in der Synthesevorschrift von Herrmann et al. (2012) für die DNA-Addukte von Methyleugenol in 10 mM Ammoniumcarbonatpuffer durchgeführt. Als Lösungsvermittler wurde Acetonitril eingesetzt, da sich 1'-Acetoxyestragol und (E)-3'-Acetoxyisoestragol nicht in Wasser lösen.

## 5 Diskussion

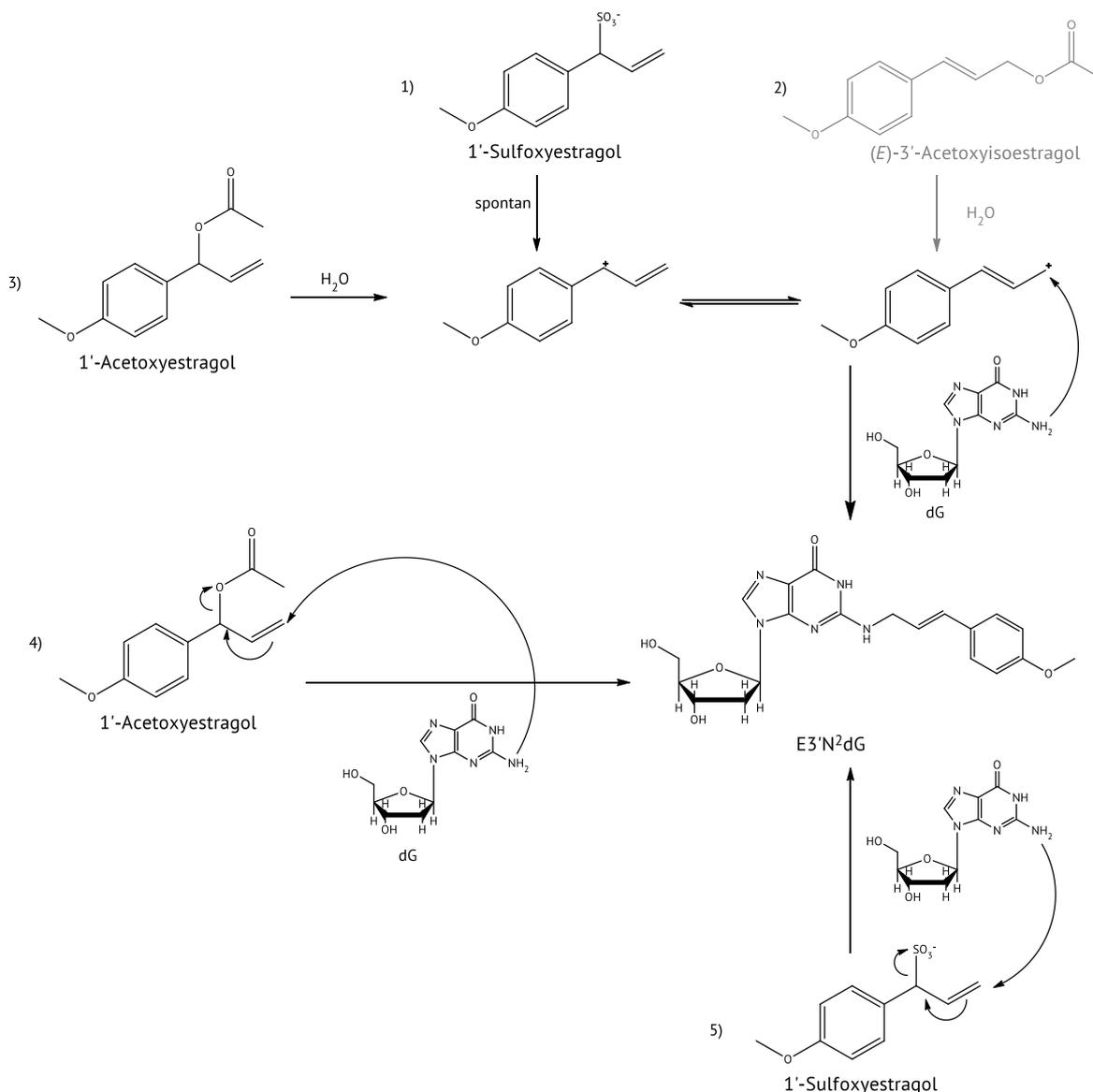


Abbildung 32: Möglicher Reaktionsmechanismus der Bildung der DNA-Addukten von Estragol über den Schwefelsäureester bzw. die acetylierten Verbindungen am Beispiel von E3'N<sup>2</sup>dG. 1-3) Reaktionsmechanismus über eine S<sub>N</sub>1-Reaktion nach Bildung eines Carbeniumions 4/5) Reaktionsmechanismus über eine S<sub>N</sub>2-Reaktion mit Angriff an der 3'-Position (Wakazono et al., 1998; Phillips et al., 1981) Der Reaktionsweg über (E)-3'-Acetoxyisoestragol (grau) ist in der Literatur nicht beschrieben.

Aus dem Syntheseansatz von 1'-Acetoxyestragol und (E)-3'-Acetoxyisoestragol mit dG konnte jeweils ein DNA-Addukt isoliert werden. Der Vergleich der Retentionszeiten, massenspektrometrischen Daten und <sup>1</sup>H-NMR-Spektren zeigte, dass es sich bei dem Produkt beider Reaktionsansätze um das gleiche DNA-Addukt handelte. Nach Isolierung des DNA-Addukt aus den Reaktionsansätzen mittel präparativer HPLC und Lyophilisierung lag das gebildete Addukt als weißer Feststoff vor. Dieser wurde sowohl mittels HPLC-ESI-MS im PIS als auch <sup>1</sup>H-NMR charakterisiert. In Abbildung 33 ist das PIS-Spektrum von E3'N<sup>2</sup>dG dargestellt. Der PIS wurde bei positiver Ionisierung mittels ESI-Quelle aufgenommen. Bei allen weiteren Angaben wird von einer einfachen positiven Ladung der Moleküle ausgegangen.

## 5 Diskussion

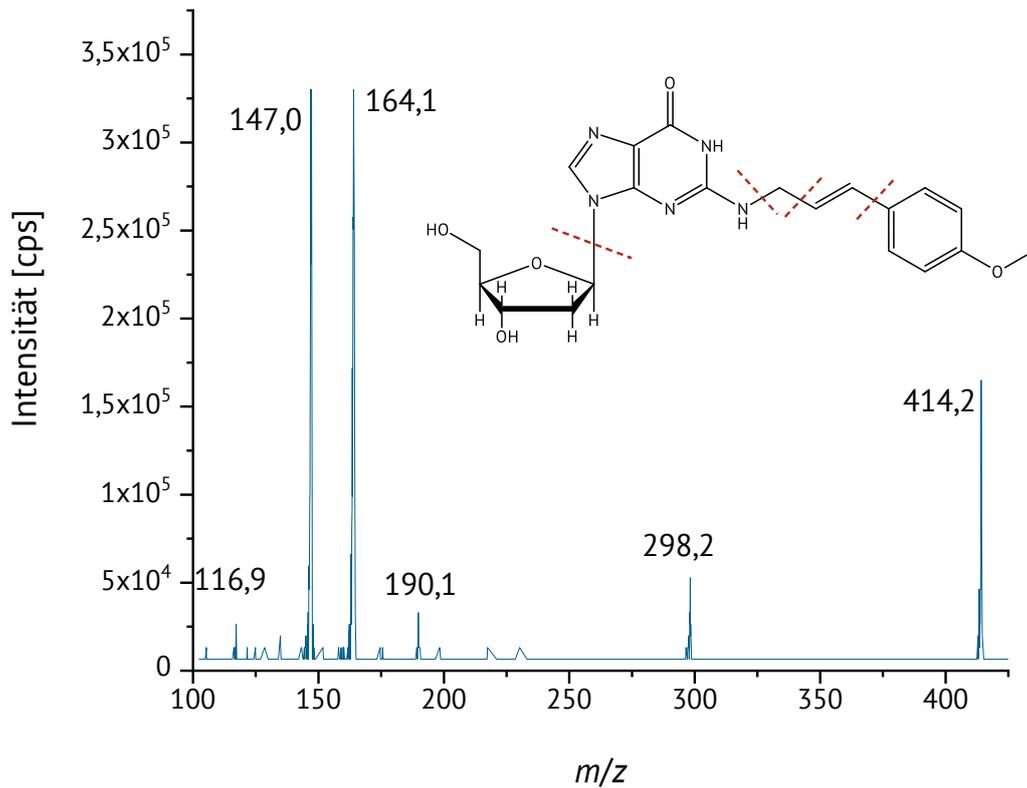


Abbildung 33: PIS von E3'N<sup>2</sup>dG, aufgenommen mit einem TripleQuad-Massenspektrometer von AB Sciex API2000

Als Fragmente konnten neben dem  $m/z$ -Verhältnis für [M+H]<sup>+</sup> von 414,2 Da die  $m/z$ -Verhältnisse 298,2, 190,1, 164,1, 147,0 und 116,9 identifiziert werden. Die mögliche Struktur der gebildeten Fragmente ist in Abbildung 34 dargestellt.

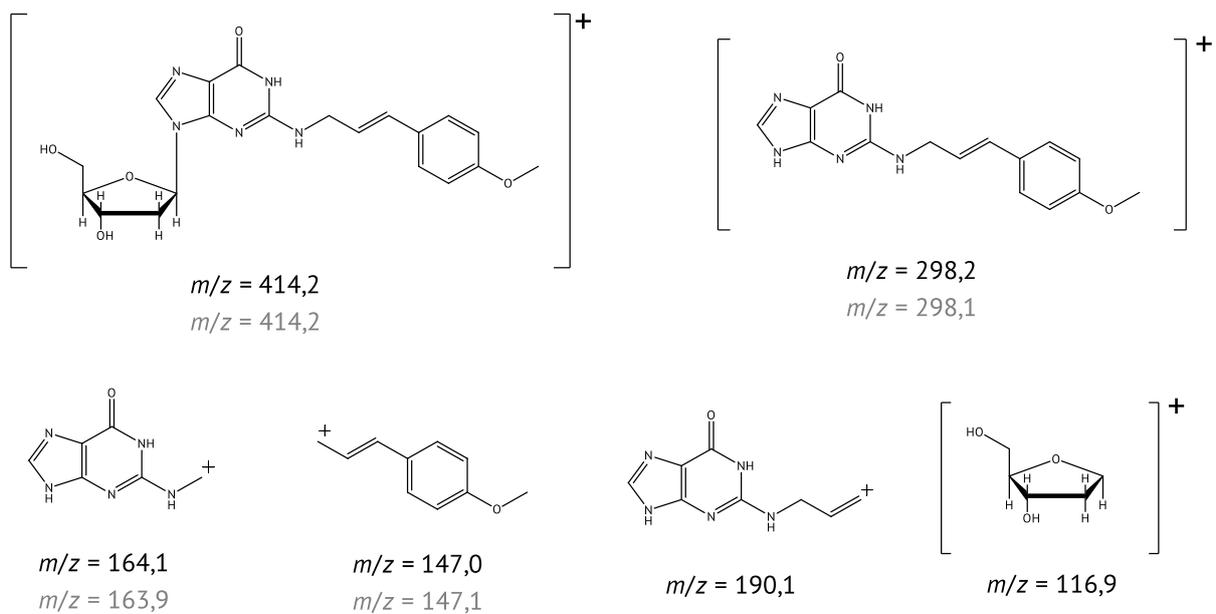


Abbildung 34: Fragmentierung von E3'N<sup>2</sup>dG inklusive des Vergleichs mit der Literatur. Bei allen Angaben in [] handelt es sich jeweils um das [Molekül + H]<sup>+</sup>; Schwarz: experimentell bestimmte  $m/z$ -Verhältnisse, grau:  $m/z$ -Verhältnisse nach Punt et al. (2007)

## 5 Diskussion

In der Literatur konnten neben der Precursorion von 414,2 Da ebenfalls die Fragmente mit den Massen von 298,1 Da, 163,9 Da und 147,1 Da identifiziert werden (Punt et al., 2007). Diese decken sich mit den Fragmenten des synthetisierten Adduktes. Die Fragmente mit einem  $m/z$ -Verhältnisse von 190,1 und 116,9 sind in der Literatur nicht beschrieben, lassen sich aber aus dem Molekül als Fragmente erklären. Bei 116,9 handelt es sich um Desoxyribose, welche typischerweise aus diesem Molekül abgespalten werden kann. Beide Fragmente treten nur bei hoher *collision energy* mit geringer Intensität auf.

Neben dem PIS wurde auch das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum mit den Literaturdaten verglichen. In der Literatur ist das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von E3'N<sup>2</sup>dG abgebildet, wobei die chemische Verschiebung genaue Signalmultiplizität nicht angegeben wurde (Phillips et al., 1981). Die Multiplizität der Signale sowie die chemische Verschiebung der Signale sind für beide Spektren vergleichbar (siehe Abbildung 35).

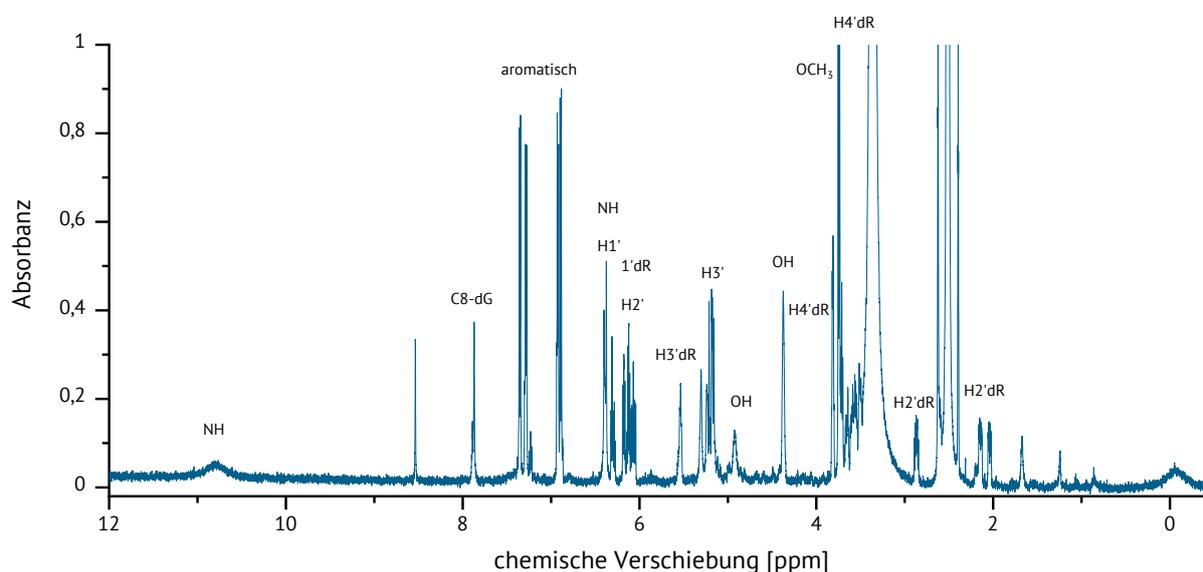


Abbildung 35:  $^1\text{H}$ -NMR von E3'N<sup>2</sup>dG aus dem Reaktionsansatz mit (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol und Zuordnung der Signale; Vergleichsspektrum siehe Phillips et al. (1981)

Die Synthese des Stabilisotopen-markierten Standards  $^{15}\text{N}_5$ -E3'N<sup>2</sup>dG erfolgt unter Einsatz von 1 mg  $^{15}\text{N}_5$ -dG nach Optimierung der Synthese auf den Mikroansatz mit 1'-Acetoxyestragol als reaktiver Vorstufe. Über die Retentionszeit wurde mittels HPLC-UV/Vis die Bildung des Addukts bestätigt. Nach ersten massenspektrometrischen Messungen und der Anpassung der HPLC-UV/Vis-Methode zeigte sich allerdings, dass der Stabilisotopen-markierte Standard verunreinigt war. Nach einer zweiten präparativen Isolierung konnte  $^{15}\text{N}_5$ -E3'N<sup>2</sup>dG in ausreichender Reinheit erhalten werden. Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC-UV/Vis über eine externe Kalibriergerade mit E3'N<sup>2</sup>dG. Die Retentionszeit von  $^{15}\text{N}_5$ -E3'N<sup>2</sup>dG war bei allen HPLC-Methoden identisch mit der Retentionszeit von E3'N<sup>2</sup>dG.

Zusätzlich wurden die Fragmente des Stabilisotopen-markierten Standards bestimmt. Die Ionisation erfolgte ebenfalls im positiven Modus. Das synthetisierte Produkt hatte ein  $m/z$ -Verhältnis für  $[\text{M}+\text{H}]^+$  von 419,051 und die Fragmente besaßen die  $m/z$ -Verhältnisse 303,100,

## 5 Diskussion

169,020 und 147,000. In der Literatur wurde der Stabilisotopen-markierte Standard unter anderem von Paini et al. (2012) und Punt et al. (2007) synthetisiert. Hierbei wurde sowohl das Precursorion mit 419,1 Da als auch die Fragmente mit den  $m/z$ -Verhältnisse 303,0, 168,9 und 147,1 identifiziert.

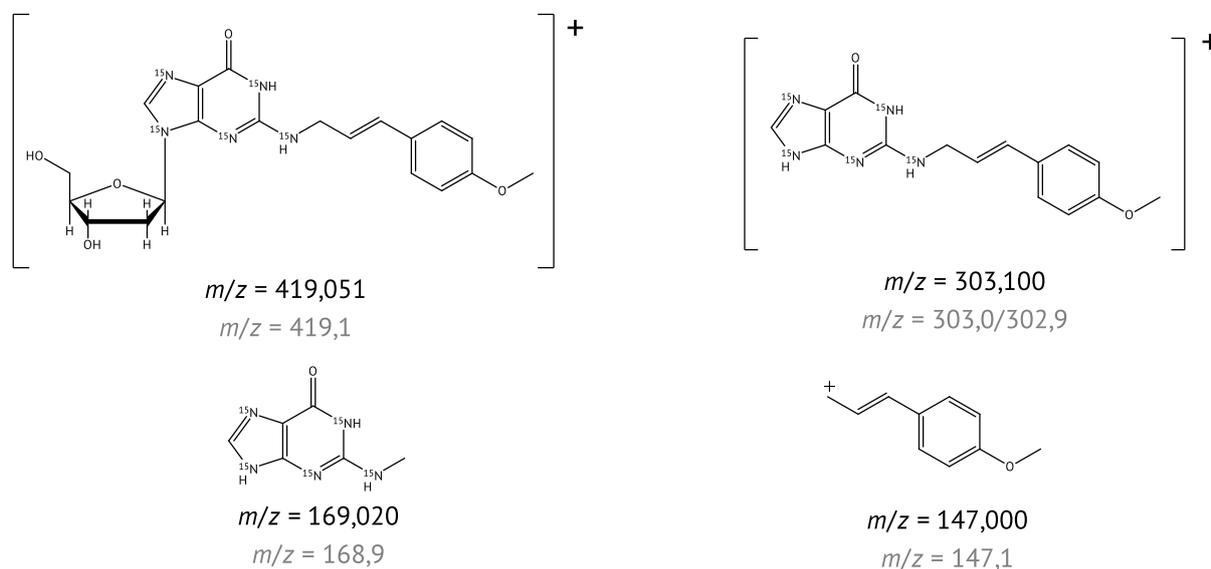


Abbildung 36: Fragmentierung von  $^{15}\text{N}_5\text{-E3}'\text{N}^2\text{dG}$  inklusive Vergleich mit der Literatur. Bei allen Angaben in [] handelt es sich jeweils um das [Molekül + H]<sup>+</sup>; Schwarz: experimentell bestimmte  $m/z$ -Verhältnisse, grau:  $m/z$ -Verhältnisse nach Punt et al. (2007)

In der Literatur konnte sowohl die Bildung des *cis*-Isomer als auch die Bildung des *trans*-Isomer von E3'N<sup>2</sup>dG beobachtet werden. Außerdem konnten die Nebenaddukte N<sup>2</sup>-(estragol-1'-yl)-desoxyguanosin (E1'-N<sup>2</sup>dG), N<sup>7</sup>-(*trans*-isoestragol-3'-yl)-desoxyguanosin (E3'-N<sup>7</sup>dG) und 8-(*trans*-isoestragol-3'-yl)-desoxyguanosin (E3'-8dG) identifiziert werden. Dabei handelte es sich bei E3'N<sup>2</sup>dG um das Hauptaddukt (Phillips et al., 1981; Wiseman et al., 1985). In dieser Arbeit konnte in den Reaktionsansätzen von dG mit 1'-Acetoxyestragol bzw. (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol nur das Addukt E3'N<sup>2</sup>dG isoliert und identifiziert werden.

Auch aus den Syntheseansätzen von 1'-Acetoxyestragol und (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol mit dA konnte jeweils ein DNA-Addukt isoliert werden, welches in beiden Fällen als E3'N<sup>6</sup>dA identifiziert wurde. Die Retentionszeiten, die PIS und <sup>1</sup>H-NMR-Spektren zeigten, dass in beiden Reaktionsansätzen das gleiche Addukt gebildet wurde. Das synthetisierte Produkt aus den Reaktionsansätzen von dA mit 1'-Acetoxyestragol bzw. (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol konnte mittels präparativer HPLC isoliert und nach Lyophilisierung als weißer Feststoff erhalten werden.

Der PIS wurde bei einer positiven Ionisierung mittels ESI-Quelle aufgenommen. Bei allen weiteren Angaben wurde eine einfache positive Ladung des Moleküls bzw. Fragment angenommen. Der PIS zeigt für das Syntheseprodukt ein  $m/z$ -Verhältnis von 398,2 für das [M+H]<sup>+</sup> mit den beiden Fragmenten mit einem  $m/z$ -Verhältnis 282,800 bzw. 147,2. Diese Fragmente stimmen mit den Fragmenten des von Ishii et al. (2011) synthetisierten Standards E3'N<sup>6</sup>dA überein. Der PIS ist in Abbildung 37 abgebildet.

## 5 Diskussion

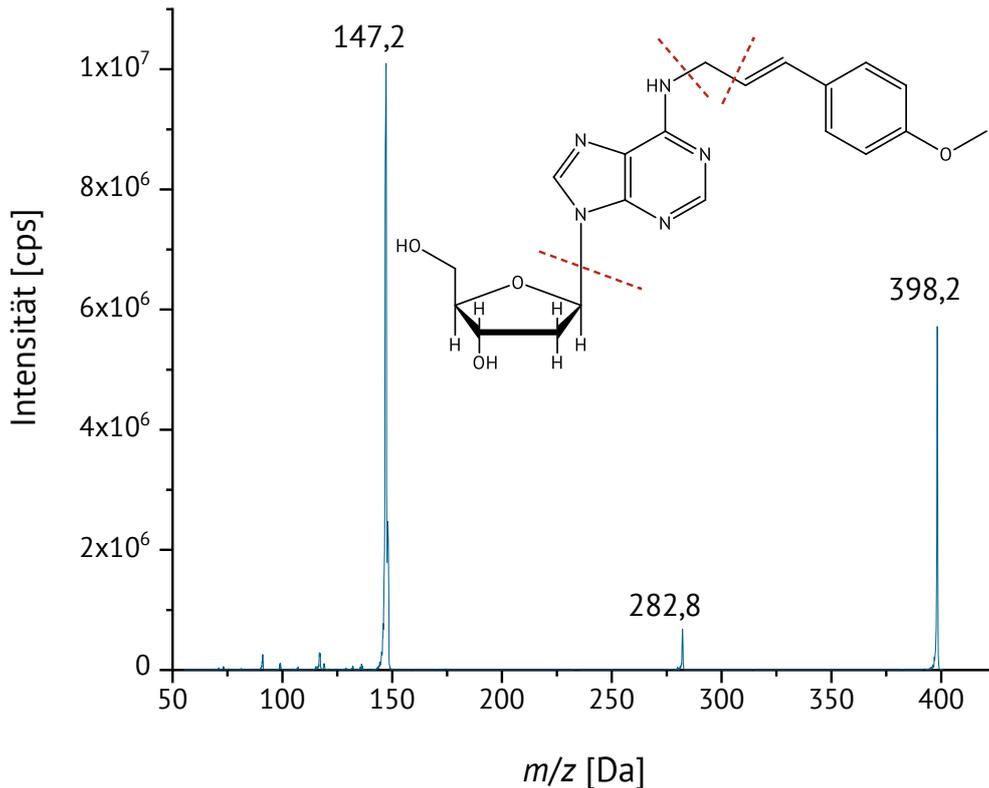


Abbildung 37: PIS-Spektrum von E3'N<sup>6</sup>dA aufgenommen mit einem TripleQuad-Massenspektrometer von AB Sciex API2000

Die mögliche Struktur der gebildeten Fragmente ist in Abbildung 38 dargestellt.

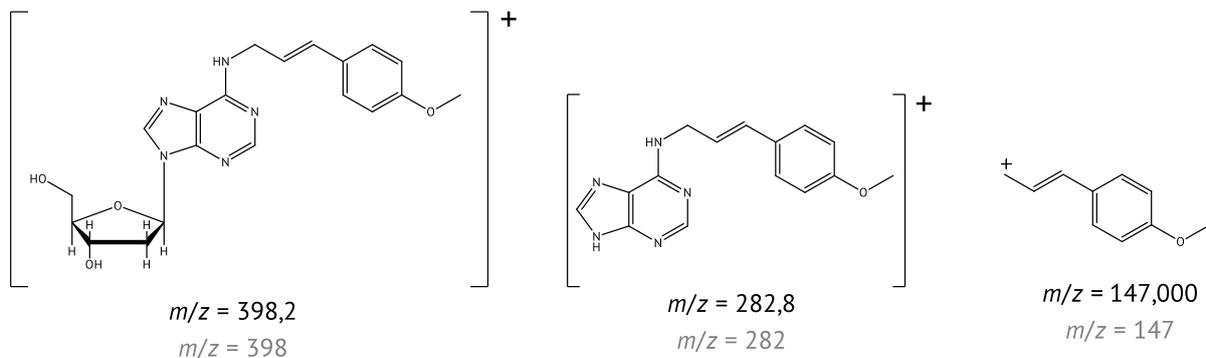


Abbildung 38: Fragmentierung von E3'N<sup>6</sup>dA inklusive des Vergleichs mit der Literatur. Bei allen Angaben in [] handelt es sich jeweils um das [Molekül + H]<sup>+</sup>; Schwarz: experimentell bestimmte  $m/z$ -Verhältnisse, grau:  $m/z$ -Verhältnisse nach Ishii et al. (2011)

Ishii et al. (2011) charakterisierte das dA-Addukt aus der Synthese von dA mit 1'-Acetoxyestragol als ES-3'N<sup>6</sup>-dA, welches E3'N<sup>6</sup>dA entspricht. Ein Vergleich der beiden <sup>1</sup>H-NMR-Spektren ist in Tabelle 27 dargestellt. Die beiden Spektren sind sowohl in Bezug auf die chemische Verschiebung als auch in Bezug auf die Multiplizität der Signale vergleichbar. Das Spektrum, welches von Phillips et al. (1981) publiziert wurde, ist ebenfalls vergleichbar (siehe Abbildung 39), wobei hier keine Angaben zur chemischen Verschiebung oder Signalmultiplizität gemacht wurden.

## 5 Diskussion

Tabelle 27: Vergleich der  $^1\text{H-NMR}$ -Signale von  $\text{E3}'\text{N}^6\text{dA}$  mit  $\text{ES-3}'\text{N}^6\text{dA}$  synthetisiert von Ishii et al., 2011

Proton	Synthese	Ishii et al. (2011)
Signal $^1\text{H-NMR}$ (Lösungsmittel $\text{DMSO-d}_6$ ) chemische Verschiebung (Multiplizität, Anzahl der Protonen)		
2'dR	2,25 (m, 1 H)	2,25 (m, 1 H)
2'dR	2,71 (m, 1 H)	2,70 (m, 1 H)
5'dR	3,51 (m, 1 H)	3,51 (m, 1 H)
5'dR	3,60 (m, 1 H)	3,61 (m, 1 H)
$\text{OCH}_3$	3,72 (s, 3 H)	3,75 (m, 3 H)
4'dR	3,87 (m, 1 H)	3,87 (m, 1 H)
$\text{H3}'$	4,23 (s, 2 H)	4,22 (bs, 2 H)
3'dR	4,40 (s, 1 H)	4,40 (m, 1 H)
$\text{OH5}'\text{dR}$	5,22 (m, 2 H)	5,22 (m, 2 H)
$\text{OH3}'\text{dR}$	5,32 (s, 1 H)	5,31 (s, 1 H)
$\text{H2}'$	6,21 (m, 1 H)	6,21 (m, 1 H)
1'dR	6,33 (m, 1 H)	6,34 (m, 1 H)
$\text{H1}'$	6,45 (d, 1 H)	6,42 (m, 1 H)
$\text{H3/H5}$ (aromatisch)	6,85 (m, 2 H)	6,85 (m, 2 H)
$\text{H2/H6}$ (aromatisch)	7,32 (m, 2 H)	7,30 (m, 2 H)
C2-dA	8,20 (d, 1 H)	8,21 (bs, 1 H)
C8-dA	8,35 (d, 1 H)	8,37 (s, 1 H)
NH	8,08 (m, 1 H)	8,07 (bs, 1 H)

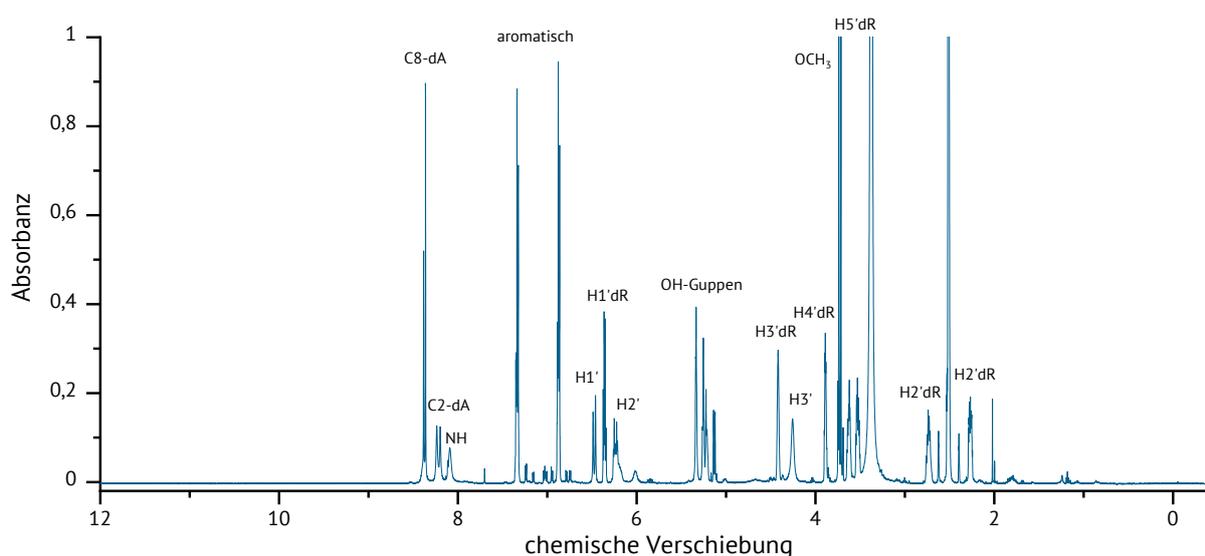


Abbildung 39:  $^1\text{H-NMR}$  von  $\text{E3}'\text{N}^6\text{dA}$  aus dem Reaktionsansatz mit (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol und Zuordnung der Signale; Vergleichsspektrum Phillips et al. (1981)

Die Synthese von  $\text{E3}'\text{N}^6\text{dA}$  wurde auf einen Mikroansatz mit 1 mg  $^{15}\text{N}_5\text{-dA}$  übertragen. Das erhaltene Produkt der Reaktion von 1'-Acetoxyestragol mit  $^{15}\text{N}_5\text{-dA}$  wies die gleiche Retentionszeit auf wie  $\text{E3}'\text{N}^6\text{dA}$ , was die Synthese von  $^{15}\text{N}_5\text{-E3}'\text{N}^6\text{dA}$  bestätigte. Die Konzentration

## 5 Diskussion

wurde mittels externer Kalibriergerade über E3'N<sup>6</sup>dA bestimmt. Zusätzlich wurde massenspektrometrisch die Fragmentierung bei positiver Ionisation bestimmt, wobei das Precursorion von <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>6</sup>dA ein *m/z*-Verhältnis von 403,227 besaß. Die Fragmente besaßen ein *m/z*-Verhältnis von 287,200 und 147,200. Sowohl das Precursorion mit einem *m/z*-Verhältnis von 403 als auch das Fragment mit einem *m/z*-Verhältnis von 287 konnten ebenfalls in der Studie von Ishii et al. (2011) identifiziert werden.

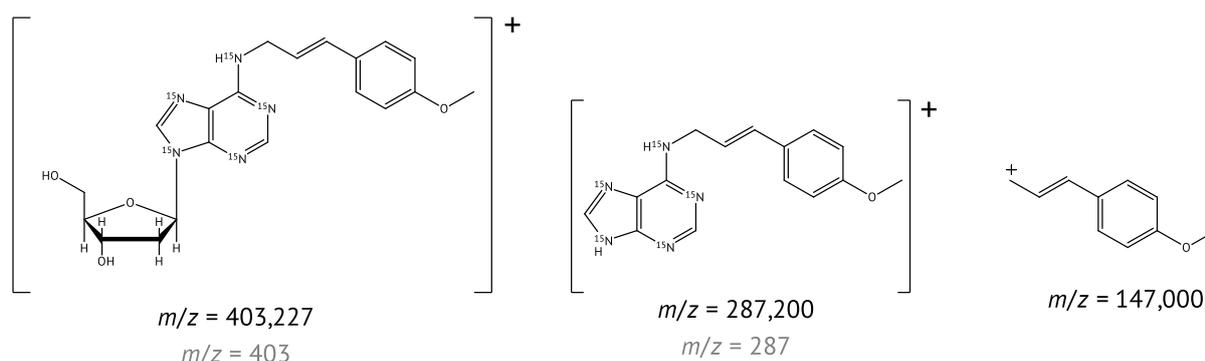


Abbildung 40: Fragmentierung von <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>6</sup>dA inklusive des Vergleichs mit der Literatur. Bei allen Angaben in [] handelt es sich jeweils um das [Molekül + H]<sup>+</sup>; Schwarz: experimentell bestimmte *m/z*-Verhältnisse, grau *m/z*-Verhältnisse nach Ishii et al. (2011)

Ein Vergleich der Literaturdaten mit den experimentellen Daten zeigt, dass sowohl E3'N<sup>2</sup>dG als auch E3'N<sup>6</sup>dA erfolgreich synthetisiert werden konnten. Bei dem synthetisierten E3'N<sup>2</sup>dG handelt es sich um das Hauptaddukt, das in der Literatur identifiziert wurde (Phillips et al., 1981). Die in der Literatur ebenfalls aufgetretenen Nebenaddukte mit dG konnten mit dieser Syntheseroute nicht identifiziert bzw. synthetisiert werden. Sowohl E3'N<sup>2</sup>dG als auch E3'N<sup>6</sup>dA konnten als weißer Feststoff erhalten werden, sodass für die spätere Methodenentwicklung und Quantifizierung beide Addukte als Referenzsubstanz eingewogen werden konnten. Dabei machte es keinen Unterschied, ob 1'-Acetoxyestragnol oder (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol als Vorstufe eingesetzt wurde. Die Ausbeute war jeweils bei der Verwendung von 1'-Acetoxyestragnol höher.

Nach Übertragung der Synthesen auf den jeweiligen Mikroansatz konnten die Stabilisotopen-markierten Analoga für beide Addukte erfolgreich synthetisiert werden. Dabei führte nur die Syntheseroute über 1'-Acetoxyestragnol zur erfolgreichen Synthese der Stabilisotopen-markierten Standards. Die Übertragung der Syntheseroute der Reaktion von (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol mit den Basen dA und dG war nicht erfolgreich. Aufgrund der geringen Menge an eingesetzter <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-markierter Base war es nicht möglich die Stabilisotopen-markierten Standards als Reinsubstanz zu isolieren. Die Identifikation erfolgt zum einen über die Retentionszeit (HPLC-UV/VIS und UHPLC-ESI-MS/MS) und zum anderen über das Precursorion bzw. die Fragmentierung. Die Konzentration der Stabilisotopen-markierten Standards wurde mittels externer Kalibriergerade bestimmt.

Die Reaktionsansätze beider reaktiven Vorstufen mit dT bzw. dC zeigten keine Hinweise, dass 1'-Acetoxyestragnol bzw. (*E*)-3'-Acetoxyisoestragnol mit den DNA-Basen reagierten. Auch aus der

Literatur ist die Bildung eines DNA-Addukt von Estragol bzw. eines Metaboliten mit dT und dC nicht bekannt.

## **5.2 Entwicklung einer UHPLC-ESI-MS/MS-Methoden zur Quantifizierung von E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit Estragol mittels SIVA**

Im Vorfeld zur Methodenentwicklung einer UHPLC-ESI-MS/MS-Methode konnten sowohl die Standards E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA als auch die <sup>15</sup>N-markierten Analoga <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>2</sup>dG und <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>6</sup>dA erfolgreich synthetisiert werden. Die Probenaufarbeitung (Isolation der DNA aus pRH und DNA-Hydrolyse) wurde im Arbeitskreis bereits für die Quantifizierung anderer DNA-Addukte von Phenylpropanoiden wie z. B. Methyleugenol oder  $\alpha$ - und  $\beta$ -Asaron etabliert. Für die enzymatische Hydrolyse wurden 30  $\mu$ g DNA eingesetzt, wobei jeder Probe vor der Hydrolyse 50 fmol der Stabilisotopen-markierten Addukte <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>2</sup>dG und <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>6</sup>dA sowie 1 nmol <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-dG zugesetzt wurde. Für das Endvolumen der Proben von 50  $\mu$ l ergibt sich somit eine Endkonzentration von 1 nM der Stabilisotopen-markierten Addukte <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>2</sup>dG und <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>6</sup>dA und 20  $\mu$ M für <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-dG. Die Konzentration für <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-dG wurde von etablierten Methoden übernommen, die Endkonzentration der Stabilisotopen-markierten Addukte wurde während der Methodenentwicklung experimentell ermittelt.

Nach der Synthese der Referenzsubstanzen wurde eine MRM-Methode zur Quantifizierung von E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA an der API2000 entwickelt. Als HPLC-Säule wurde eine RP18-Säule mit einer Partikelgröße von 5  $\mu$ m und einer Länge von 125 mm eingesetzt. Da noch kein isotopenmarkierter Standard zur Verfügung stand, wurde als interner Standard das dG-Addukt von Methyleugenol (*N*<sup>2</sup>-(Isomethyleugenol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin) eingesetzt. Mit dieser Methode konnte bestätigt werden, dass sowohl E3'N<sup>2</sup>dG als auch E3'N<sup>6</sup>dA in primären Rattenhepatozyten nach der Inkubation mit Estragol gebildet wird. Es konnten erste Hinweise auf eine Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der DNA-Adduktbildung beobachtet werden. Allerdings war die Nachweis- und Bestimmungsgrenze sehr hoch, weshalb Addukte erst bei hohen Inkubationskonzentrationen größer 50  $\mu$ M Estragol im Kulturmedium detektiert werden konnten. Daher war es nötig eine sensitivere Methode zur Bestimmung beider Addukte zu entwickeln.

Um eine möglichst sensitive Methode zu entwickeln, wurde die Methode auf eine Qtrap5500 übertragen. Statt der RP18 Säule (LiChrospher®, 5  $\mu$ m, 125,0 mm×4,0 mm) wurde eine UHPLC-Säule mit einer C18-E-Phase, Partikelgröße von 1,8  $\mu$ m und einer Länge von 50 mm eingesetzt. Durch die Verwendung der UHPLC-Säule konnte die Methode auf eine Länge von 8 min verkürzt werden. Zudem konnte die Peakbreite deutlich verringert werden. Die gerätespezifischen Parameter für die UHPLC-ESI-MS/MS-Methode wurde so optimiert, dass die Methode möglichst sensitiv für E3'N<sup>6</sup>dA ist, bei gleichzeitig hoher Sensitivität für E3'N<sup>2</sup>dG. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da aus den Vorversuchen bekannt war, dass es sich bei E3'N<sup>2</sup>dG um das Hauptaddukt

handelt. Daher sollte für E3'N<sup>6</sup>dA eine möglichst geringe Nachweiß- bzw. Bestimmungsgrenze erzielt werden.

Durch Vermessen von Standards verschiedener Konzentrationen wurde das LOD und LOQ für E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA experimentell bestimmt. Zusätzlich wurde aus den experimentell ermittelten Konzentrationen das LOD und LOQ für die Gesamtmethode einschließlich der enzymatischen DNA-Hydrolyse bestimmt. Dazu wurde die Annahme getroffen, dass die DNA-Hydrolyserate 100 % beträgt (30 µg Ratten-DNA entspricht  $1,72 \times 10^{10}$  Teilchen dG) und die Berechnung wurde wie für die Proben durchgeführt. Als LOD und LOQ ergaben sich somit folgende Werte:

Tabelle 28: LOD und LOQ für die UHPLC-ESI-MS/MS-Methode für E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA bezogen auf die experimentell bestimmte Konzentration in pM der UHPLC-ESI-MS/MS-Methode und daraus berechnetes LOD und LOQ bezogen auf die Addukte/10<sup>8</sup> Nukleoside

E3'N <sup>2</sup> dG		
	Konzentration [pM]	Addukte/10 <sup>8</sup> Nukleosiden
LOD	40	2
LOQ	85	5
E3'N <sup>6</sup> dA		
	Konzentration [pM]	Addukte/10 <sup>8</sup> Nukleosiden
LOD	25	1
LOQ	55	3

Somit konnte eine ausreichend sensitive Methode für beide Addukte entwickelt werden. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Matrix der DNA-Hydrolysate die Quantifizierung nicht beeinflusst. Die Wiederfindung für die Konzentrationen 500 pM, 3000 pM und 5000 pM in den Hydrolysaten lag bei allen Messungen zwischen 98 % und 118 %. Wird unbehandelte DNA isoliert aus pRH mit den Referenzsubstanzen versetzt und die DNA anschließend wie die Proben hydrolysiert liegt die Wiederfindung für beide Addukte zwischen 90 % und 118 %. Durch Messungen der Standards konnte die Robustheit der Methode bestätigt werden.

### **5.3 Zytotoxizität von Estragol in primären Rattenhepatozyten und verschiedenen Zelllinien**

In pRH und HepG2-Zellen konnte nach 24 h Inkubation mit Estragol kein zytotoxischer Effekt beobachtet werden. Es wurde weder in pRH noch in HepG2-Zellen eine signifikante Verringerung der Zellvitalität beobachtet. Außerdem lag die Zellvitalität bei allen Inkubationskonzentrationen in pRH und HepG2-Zellen über 80 %, mit Ausnahme der höchsten Konzentration von 2.000 µM Estragol der Inkubation von HepG2-Zellen (75,9 % ± 5,7 %). In den transfizierten HepG2-CYP1A2-Zellen konnte ein leichter zytotoxischer Effekt beobachtet werden. Die Zellvitalität war signifikant verringert, wobei die geringste Zellvitalität mit 67,0 % ± 1,3 % bei einer Konzentration von 300 µM beobachtet wurde. Die Abnahme der Zellvitalität ist nicht konzentrationsabhängig.

## 5 Diskussion

Nach Inkubation von HepG2-Zellen mit Estragol für 24 h und einer Nachinkubationszeit von 72 h konnte ebenfalls keine Zytotoxizität gezeigt werden. Im Gegensatz dazu wirkte Estragol nach 24 h Inkubation und einer Nachinkubationszeit von 72 h auf HepG2-CYP1A2-Zellen ab einer Konzentration von 30 µM Estragol zytotoxisch. Die geringste Zellvitalität wurde bei einer Konzentration von 300 µM mit  $53,1 \% \pm 4,5 \%$  detektiert. Bei höheren Inkubationskonzentrationen war eine leichte Zunahme der Zellvitalität zu beobachten. Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte nicht beobachtet werden.

Aufgrund der Ergebnisse des Resazurin-Reduktionstestes wurden der Konzentrationsbereich für die folgenden Assays festgelegt. Für die Inkubation der pRH wurde der Konzentrationsbereich so gewählt, dass die Zellvitalität über 80 % lag. Diese Bedingung war für den gesamten getesteten Konzentrationsbereich erfüllt. Da bei hohen Inkubationskonzentration ab 600 µM Estragol bei manchen Inkubationen Präzipitate auftraten, wurden die pRH mit maximal 300 µM Estragol für die Untersuchung der DNA-Adduktbildung inkubiert. Nach OECD-Guideline für den Mikrokerntest soll die Inkubationskonzentration so gewählt werden, dass die Zellvitalität mindestens 50 % beträgt (Kirsch-Volders et al., 1997; OECD, 2016). Diese Bedingung war nach 24 h Inkubation für die HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen über den gesamten Konzentrationsbereich erfüllt. Das gleiche galt für die Inkubation der HepG2-Zellen nach 24 h Inkubation und einer Nachinkubation von 72 h. Die Zellvitalität der HepG2-CYP1A2-Zellen lag nach 24 h Inkubation mit Estragol und anschließender Erholungsphase von 72 h bei einer Inkubationskonzentration von 300 µM bei  $53,1 \% \pm 4,5 \%$ . Daher wurde für beide Zelllinien ebenfalls eine maximale Inkubationskonzentration von 300 µM Estragol gewählt.

Im Arbeitskreis war 0,6 µM MMC von Kerstin Berg bereits als Positivkontrolle für den Mikrokerntest in HepG2-Zellen etabliert worden (Berg, 2016). Um zu überprüfen, ob diese Konzentration auch als Positivkontrolle für den Mikrokerntest in den transfizierten HepG2-CYP1A2-Zellen eingesetzt werden kann, wurde die Zytotoxizität von den Konzentrationen 0,5 µM und 0,6 µM MMC in dieser Zelllinie bestimmt. Nach 24 h Inkubation lag die Zellvitalität bei  $77,5 \% \pm 4,0 \%$  bzw.  $78,8 \% \pm 3,4 \%$ . Somit ist die Bedingung der OECD-Guideline erfüllt, dass die Zellvitalität nach der Inkubation über 50 % liegen muss. Nach der Nachinkubationszeit von 72 h ist allerdings eine starke Verminderung der Zellvitalität auf ca. 30 % zu beobachten. Vorversuche beim Mikrokerntest zeigten, dass bei einer Konzentration von 0,6 µM MMC die Mikrokerne nicht ausgezählt werden konnten. Daher wurde für beide Zelllinien eine Konzentration von 0,5 µM MMC als Positivkontrolle für den Mikrokerntest gewählt.

Die Ergebnisse des Resazurin-Reduktionstest bestätigen die in der Literatur beschriebene geringe Zytotoxizität von Estragol. Nach vier stündiger Inkubation von HepG2-Zellen mit bis zu 570 µM Estragol wurde keine Zytotoxizität beobachtet (Villarini et al., 2014). Bei einer Inkubation für 24 h ist Estragol im hohen Konzentrationsbereich zytotoxisch, wobei ein  $IC_{50}$ -Wert von 15,8 mM bestimmt wurde. Nach 4 h Inkubation von pRH und einer Erholungsphase von 16 h wurde erst ab einer Konzentration von 5 mM im Medium eine Erhöhung der LDH-Leakage beobachtet (Howes et al., 1990). Sowohl bei pRH als auch bei HepG2-Zellen handelt es sich um Zellen mit

## 5 Diskussion

leberspezifischen Eigenschaften. Auch für nicht leberspezifische Zellen konnte keine Zytotoxizität bzw. nur in hohen Konzentrationsbereichen eine geringe Zytotoxizität beobachtet werden (Martins et al., 2012). HeLa-Zellen zeigten eine geringe Empfindlichkeit, wobei der  $IC_{50}$ -Wert für die Zytotoxizität von Estragol in HeLa-Zellen nach 24 h Inkubation bei 18,1 mM lag (Oliveira et al., 2016). In dieser Arbeit konnte anhand von V79-Zellen (Daten siehe Anhang, Abbildung 49) ebenfalls beobachtet werden, dass Estragol auf diese Zellen nicht zytotoxisch wirkt. Im Konzentrationsbereich von 10  $\mu$ M bis 2.000  $\mu$ M Estragol konnte keine Zytotoxizität nach einer Inkubationszeit von 24 h beobachtet werden. Gleiches galt für eine Inkubationszeit von 24 h und einer Nachinkubationszeit von 18 h.

Bei V79-Zellen handelt es sich um eine aus Lungenfibroblasten isolierten Zelllinie, wobei die Zellen keine CYP450-Enzyme exprimieren und somit nicht metabolisch kompetent sind (Ford und Yerganian, 1958; Doehmer, 1993; Krahn, 1983). Daher eignen sich die Zellen vor allem zur Untersuchung der Muttersubstanz. Estragol ist in V79-Zellen nicht zytotoxisch, was auf eine geringe Zytotoxizität der Muttersubstanz hindeutet. Dies deckt sich damit, dass Estragol über eine CYP450-katalysierte Reaktion metabolisch aktiviert werden muss.

Bei HepG2-Zellen handelt es sich um eine immortalisierte humane Hepatomzelllinie. Die Zellen exprimieren sowohl Phase-I- als auch Phase-II-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus und haben leberspezifische Eigenschaften. (Aden et al., 1979; Knasmüller et al., 1998; Brandon et al., 2006) Im Vergleich zu HepG2-Zellen weisen die HepG2-CYP1A2-Zellen eine 700–800fache CYP1A2-Aktivität auf (Steinbrecht et al., 2020). Nina Seiwert (Fachbereich Lebensmittelchemie und Toxikologie, Arbeitsgruppe Fahrer, Technischen Universität Kaiserslautern) konnte mittels Western-Blot keine Bande für CYP1A2 in den verwendeten HepG2-Zellen detektieren, während die HepG2-CYP1A2-Zellen eine deutliche Bande für CYP1A2 zeigte. Untersuchungen des Metabolismus von Estragol zeigten, dass CYP1A2 eines der CYP450s ist, das die 1'-Hydroxylierung von Estragol mit hoher Effizienz katalysiert (Jeurissen et al., 2007). Daher eignet sich die Verwendung der beiden Zelllinien zur Untersuchung der Rolle der 1'-Hydroxylierung von Estragol auf die Zytotoxizität. Der Vergleich der Ergebnisse der beiden Zelllinien zeigte, dass im Gegensatz zu den HepG2-Zellen in den HepG2-CYP1A2-Zellen Estragol zytotoxisch wirkte. Dies konnte bereits nach einer Inkubationszeit von 24 h beobachtet werden. Der Anstieg der Zytotoxizität in den HepG2-CYP1A2-Zellen im Vergleich zu den HepG2-Zellen war nach einer Inkubationszeit von 24 und anschließender Erholungsphase wesentlich deutlicher. Diese Daten weisen darauf hin, dass die 1'-Hydroxylierung von Estragol zu 1'-Hydroxyestragol zur Zytotoxizität von Estragol beiträgt. Dies deckt sich damit, dass von Chan und Caldwell (1992) gezeigt werden konnte, dass 1'-Hydroxyestragol in wesentlich geringeren Konzentrationen auf pRH zytotoxisch wirkt als Estragol selbst.

Die Enzymaktivität Fremdstoff-metabolisierender Enzyme ist in pRH vergleichbar mit der Aktivität *in vivo*. Es ist allerdings zu beachten, dass die Enzymaktivität von CYP450-Enzymen bei einer längeren Kultivierungsdauer der Zellen stark abnimmt (Zurlo und Arterburn, 1996; Gao et al., 2020). In pRH konnte kein zytotoxischer Effekt von Estragol beobachtet werden, was sich mit der

Literatur deckt. Allerdings wurden die pRH in der Literatur 4 h mit Estragol und anschließend für 16 bzw. 17 h ohne Testsubstanz inkubiert. (Chan und Caldwell, 1992; Howes et al., 1990)

### **5.4 Genotoxizität von Estragol in HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen**

Ein Vergleich der Inkubation von HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen mit der Positivkontrolle MMC zeigt, dass in den HepG2-Zellen durch MMC eine Erhöhung der Mikrokernrate zur Lösungsmittelkontrolle um das 3,2fache, bei den transfizierten HepG2-CYP1A2-Zellen um das 13,2fache stattfand. Gleichzeitig lag die spontane Mutationsrate der HepG2-Zellen (16 Mikrokerne/1.000 Kerne) deutlich höher als die der HepG2-CYP1A2-Zellen (7 Mikrokerne/1.000 Kerne). MMC führt nach metabolischer Aktivierung zu Crosslinks in der DNA und somit zur Bildung von Mikrokernen. (Bargonetti et al., 2010) Diese findet in beiden Zelllinien statt, weshalb MMC für beide Zelllinien als Positivkontrolle verwendet werden kann.

In HepG2-Zellen zeigte Estragol kein genotoxisches Potential. Im Gegensatz dazu konnte ein genotoxischer Effekt im Konzentrationsbereich von 1–300 µM in den transfizierten HepG2-CYP1A2-Zellen beobachtet werden. Bereits ab einer Konzentration von 1 µM Estragol im Kulturmedium konnte eine höchst signifikante Erhöhung der gebildeten Mikrokerne beobachtet werden, wobei die Mikrokernrate konzentrationsabhängig zunahm.

Studien zum Metabolismus und der Bildung von DNA-Addukten zeigen, dass Estragol metabolisch aktiviert werden muss. Dazu ist eine CYP450-katalysierte 1'-Hydroxylierung z. B. durch CYP1A2 und anschließende Sulfonierung nötig. (Smith et al., 2002; Jeurissen et al., 2007) Daher eignet sich der Vergleich der HepG2-Zellen zu den HepG2-CYP1A2-Zellen, um die Rolle des Fremdstoffmetabolismus im Bezug auf die Genotoxizität zu untersuchen. Die HepG2-CYP1A2-Zellen überexprimieren CYP1A2, wobei eine 700–800fache Enzymaktivität im Vergleich zu HepG2-Zellen beobachtet wurde (Steinbrecht et al., 2020). Untersuchungen mittels Western-Blot (durchgeführt von Dr. Nina Seiwert; Fachbereich Lebensmittelchemie und Toxikologie, Arbeitsgruppe Fahrer, Technischen Universität Kaiserslautern) konnten bestätigen, dass CYP1A2 in den Zellen exprimiert wird, während in den verwendeten HepG2-Zellen Expression von CYP1A2 detektiert werden konnte. Zudem ist bekannt, dass HepG2-Zellen auch die für die metabolische Aktivierung essentiellen SULTs exprimieren (Brandon et al., 2006; Chen et al., 2008).

Die Ergebnisse des Mikrokerntests bestätigen, dass die metabolische Aktivierung von Estragol, speziell die 1'-Hydroxylierung, für die genotoxische Wirkung verantwortlich ist. Aufgrund der geringen Aktivitäten von CYP1A2 in den nicht transfizierten Zellen ist davon auszugehen, dass in diesen Zellen nur ein geringer Anteil des Estragol zu 1'-Hydroxyestragol metabolisiert wird. Dadurch wird das ultimale Kanzerogen, welches nach Sulfonierung von 1'-Hydroxyestragol entsteht, vermutlich nicht bzw. in geringerem Ausmaß gebildet. In den nicht transfizierten HepG2-Zellen könnten andere Routen des Metabolismus, wie die Detoxifizierung über O-Demethylierung bevorzugt werden.

Ein Vergleich der Daten des Mikrokerntest Literatur war nicht möglich. Ein Vergleich mit anderen Assays zur Testung der Mutagenität bzw. Genotoxizität zeigt, dass die Datenlage uneinheitlich ist.

Im Ames-Mutationstest konnte für die meisten Bakterienstämme weder mit noch ohne metabolische Aktivierung für Estragol ein mutagenes Potential beobachtet werden. Unter Verwendung des Stammes TA100 trat mit und ohne metabolische Aktivierung ein mutagener Effekt auf (Swanson et al., 1979). Auch 1'-Hydroxyestragol ist in diesem Stamm mutagen (Swanson et al., 1979; Drinkwater et al., 1976). Dabei handelt es sich um einen Bakterienstamm, der vor allem für die Detektion von Basenpaarmutationen geeignet ist (Maron und Ames, 1983). Einige andere Metaboliten von Estragol wie 3'-Hydroxyisoeestragol, Estragol-2',3'-epoxid und 1'-Hydroxyestragol-2',3'-epoxid waren ebenfalls positiv im Ames-Mutationstest (Swanson et al., 1979; To et al., 1982).

In V79-Zellen kann nach metabolischer Aktivierung nach 24 h Inkubationszeit ein Anstieg der SCE beobachtet werden (Martins et al., 2012). Eine andere Studie zeigte nach 18 h Inkubation weder nach metabolischer Aktivierung noch ohne metabolischer Aktivierung einen Anstieg der Chromosomenaberration (Müller et al., 1994). Sowohl in HepG2-Zellen als auch in V79-Zellen führte Estragol zu einem Anstieg von DNA-Doppelstrangbrüchen (Martins et al., 2012; Probert et al., 2016). In primären Rattenhepatozyten konnte mittels ungeplanter DNA-Synthese (UDS) eine Erhöhung der DNA-Reparatur nach Inkubation mit Estragol gezeigt werden (Howes et al., 1990; Chan und Caldwell, 1992).

Für die metabolische Aktivierung außerhalb der Zelle wird meist ein S9-Mix bzw. S13-Mix verwendet. Diese können in Zellsystemen mit Bakterien, wie dem Ames-Mutationstest, oder mit Säugerzellen eingesetzt werden. Der S9-Mix besteht aus Fragmenten der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Diese enthalten vor allem CYP450-Enzyme und membrangebundene Phase-II-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus (Dekant, 2017). Die am Fremdstoffmetabolismus beteiligten SULTs sind lösliche Proteine, die im Zytoplasma zu finden sind (Arand und Oesch, 2013). Im S9-Mix ist die SULT-Aktivität daher gering. In dieser Arbeit konnte mittels Mikrokerntest gezeigt werden, dass Estragol in HepG2-CYP1A2-Zellen genotoxisch ist. Somit konnte durch den Mikrokerntest das genotoxische Potential von Estragol in Säugerzellen bestätigt werden. Aufgrund der geringeren CYP1A2-Aktivität in den nicht transfizierten HepG2-Zellen wird in HepG2-Zellen im Verhältnis vermutlich weniger 1'-Hydroxyestragol gebildet. Dabei handelt es sich um den initialen Schritt im Metabolismus zur Toxifizierung von Estragol und Bildung des ultimalen Kanzerogen. (Rietjens et al., 2014) Darüber lässt sich vermutlich der Unterschied des mutagenen Potentials in HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen über die unterschiedliche metabolische Aktivität erklären.

Bei metabolischer Aktivierung mittels S9-Mix im Ames-Mutationstest entstehen die potenziell reaktiven Metaboliten außerhalb der Zelle. Der reaktive Metabolit muss daher erst in die Zelle gelangen, um DNA-Schäden zu verursachen. Im Fall von Estragol kann das möglicherweise gebildete Carbeniumion bzw. der reaktive Metabolit allerdings bereits mit Mediumbestandteilen oder anderen Zellbestandteilen reagieren. Außerdem enthält der S9-Mix keine SULT, welche für die Bildung des ultimalen Kanzerogens notwendig ist. Damit lassen sich die negativen Ergebnisse des Ames-Mutationstest im Vergleich zum hier durchgeführten Mikrokerntest erklären. Am

Beispiel von *Salmonella typhimurium* (Stamm TA1538) konnte gezeigt werden, dass SULTs eine wichtige Rolle bei der Mutagenität spielen. Der Ames-Mutationstest war im Wildtyp negativ, während in transfizierten Bakterien, die eine humane SULT1A3-Aktivität aufwiesen, der Ames-Mutationstest positiv war. (Oda et al., 2012)

Untersuchungen im niedrigen Konzentrationsbereich (0,01–1 µM) zeigten die Tendenz, dass auch im niedrigen Konzentrationsbereich die Mikrokernrate in HepG2-CYP1A2-Zellen erhöht ist. Dieser Effekt war allerdings nicht signifikant (Daten von Anna Schildwächter, erstellt in Verlauf eines Forschungspraktikums unter Betreuung von Julia Fuhlbrueck; Schildwächter, 2020). Aufgrund der hohen Abweichung der Mikrokernrate bei der Positivkontrolle und der Konzentration von 1 µM Estragol zwischen beiden Versuchsreihen ist ein direkter Vergleich der Daten nicht möglich. Diese entsteht unter anderem, durch das subjektive Auszählen der Mikrokerne sowie die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Passage und der Kulturbedingung der Zellen.

### **5.5 Untersuchung der Bildung von E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit Estragol**

In der vorliegenden Arbeit konnten die beiden DNA-Addukte N<sup>2</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin und N<sup>6</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin in pRH nach Inkubation mit Estragol detektiert und quantifiziert werden. E3'N<sup>2</sup>dG war zu allen Inkubationszeitpunkten und Inkubationskonzentrationen das Hauptaddukt und konnte nach einer Inkubationszeit von 24 h ab einer Inkubationskonzentration von 0,5 µM Estragol detektiert und quantifiziert werden. Ab einer Inkubationskonzentration von 1 µM konnte zu allen Zeitpunkten E3'N<sup>2</sup>dG detektiert werden. Nach einer Inkubationszeit von 6 h war bei dieser Konzentration ein signifikanter Anstieg der Addukte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zu beobachten. Nach einer Inkubationszeit von 1 h konnte ein statistisch signifikanter Anstieg der gebildeten Addukte ab einer Konzentration von 10 µM gegenüber der Lösungsmittelkontrolle beobachtet werden. Die Adduktlevel von E3'N<sup>6</sup>dA waren bei allen Inkubationen geringer. E3'N<sup>6</sup>dA konnten nach einer Inkubationszeit von 1 h erst ab einer Konzentration von 10 µM sowie ab einer Konzentration von 1 µM und einer Inkubationszeit von 6 h, 24 h bzw. 48 h detektiert werden. Die Daten sind in den Abbildungen 30/31 dargestellt.

Für beide Addukte war zu beobachten, dass bis zu einer Konzentration von 1 µM über den kompletten Zeitraum eine Zunahme der Addukte beobachtet werden konnte. Bei einer Konzentration von 10 µM Estragol im Kulturmedium kommt es zu einem starken Anstieg der Adduktlevel von E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA zwischen einer Inkubationszeit von 1 h und 6 h. Die Adduktlevel bleiben im weiteren Zeitverlauf relativ konstant. Ab einer Inkubationskonzentration von 100 µM ist der Trend zu beobachten, dass die Adduktlevel nach einem Maximum nach 6 h Inkubationszeit mit steigender Inkubationszeit abnehmen, wobei keine statistische Signifikanz gezeigt werden konnte. Der Rückgang könnte sich zum einen mit der steigenden Zytotoxizität erklären lassen. Die Untersuchung der Zytotoxizität mittels Resazurin-Reduktionstest zeigte eine

Zellvitalität von ca. 80 % bei einer Inkubationskonzentration von 300  $\mu\text{M}$  Estragol. Daher ist die Abnahme der Addukte vermutlich nicht ausschließlich auf zytotoxische Effekte zurückzuführen. Weiterhin kann die Anzahl der DNA-Addukte in der Zelle durch DNA-Reparaturmechanismen reduziert werden. Yang et al. (2020a) konnten zeigen, dass in HepaRG-Zellen nach der Entfernung des Estragol aus dem Kulturmedium die Adduktlevel von E3'N<sup>2</sup>dG abnehmen, wobei nach 72 h noch 77 % der ursprünglichen Addukte detektiert werden konnten. In CHO-Zellen fand eine signifikante Reduzierung der Adduktlevel von E3'N<sup>2</sup>dG innerhalb von 4 h nach der Induktion von DNA-Addukte durch 1'-Hydroxyestragol statt, wobei nach 24 h noch ca. 80 % der ursprünglichen Addukte nachgewiesen werden konnten. In Zellen mit einer defekten NER konnte keine Reduzierung der DNA-Addukte gezeigt werden. Diese Daten weisen darauf hin, dass die gebildeten Addukte mit dG über die NER repariert werden. Dabei wird nur ein geringer Teil des DNA-Addukt repariert und es bilden sich möglicherweise persistente DNA-Addukte. Aufgrund des hier gezeigten Zeitverlauf der DNA-Adduktbildung kann vermutet werden, dass bei hohen Inkubationskonzentrationen ein Großteil die DNA-Addukte innerhalb der ersten 6 h gebildet wurden. Ein Teil der Addukte könnte nach der Bildung durch DNA-Reparaturmechanismen, wie z. B. der Nukleotid-Exzisionsreparatur repariert. Bei hohen Konzentrationen Estragol ab 100  $\mu\text{M}$  reduzieren sich in dieser Studie die Adduktlevel von E3'N<sup>2</sup>dG zwischen einer Inkubationszeit von 6 h und 24 h um ca. 18 % (Schwankung 15–20 %) und zwischen 6 h und 48 h um ca. 17 % (Schwankung 11–22 %). Der Rückgang der DNA-Adduktlevel ist vergleichbar mit den Ergebnissen in CHO-Zellen und HepaRG-Zellen. Die Level von E3'N<sup>6</sup>dA sanken zwischen der Inkubationszeit von 6 h und 24 h um ca. 31 % (Schwankung 28–30 %) und zwischen 6 h und 48 h um ca. 37 % (Schwankung 34–39 %). Die Reparatur von E3'N<sup>6</sup>dA wurde in der Literatur nicht genauer untersucht.

Um die Konzentrationsabhängigkeit der Adduktbildung beurteilen zu können sind in Abbildung 41/42 die Adduktlevel für den Konzentrationsbereich von 1  $\mu\text{M}$  bis 300  $\mu\text{M}$  und die einzelnen Inkubationszeitpunkte dargestellt. Ab einer Inkubationszeit von 6 h ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg im Konzentrationsbereich von 10  $\mu\text{M}$  bis 300  $\mu\text{M}$  zu beobachten. Diese Beobachtung trifft sowohl auf die Bildung von E3'N<sup>2</sup>dG als auch von E3'N<sup>6</sup>dA in pRH nach Inkubation mit Estragol zu. Bei einer Inkubationszeit von 1 h war für beide Addukte nur ein signifikanter Unterschied zwischen der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  zu zeigen. Es ist auch hier der Trend zu beobachten, dass die Adduktlevel mit steigender Konzentration zunahmten.

In verschiedenen *in-vivo*-Studien konnte gezeigt werden, dass nach der Behandlung von Nagern mit Estragol die DNA-Adduktlevel konzentrationsabhängig zunahmten. (Ding et al., 2015; Suzuki et al., 2012b; Suzuki et al., 2012a) In diesen Studien wurden den Tieren hohe Dosen Estragol verabreicht. Die Ergebnisse der Untersuchung der DNA-Adduktbildung in pRH nach Inkubation mit Estragol kann *in vitro* für den hohen Konzentrationsbereich die konzentrationsabhängige Bildung von DNA-Addukten bestätigen.

## 5 Diskussion

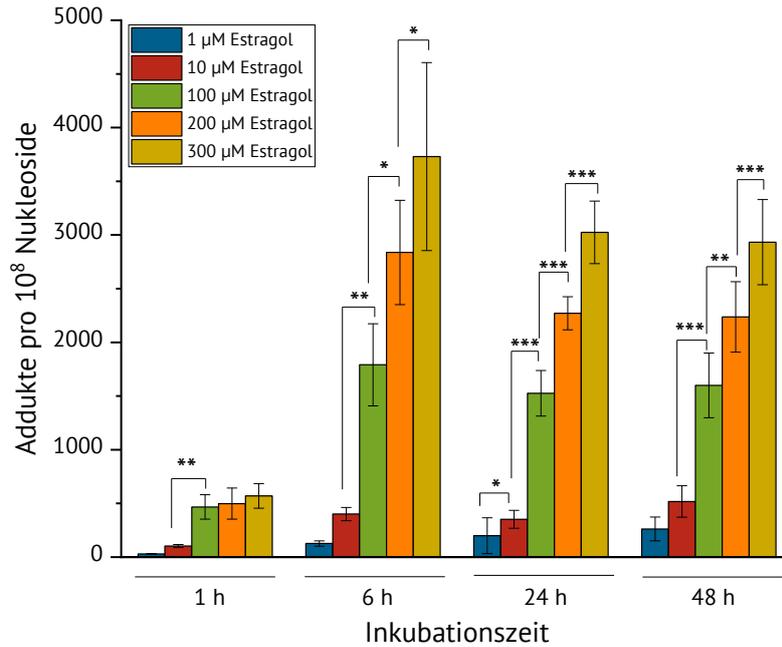


Abbildung 41: Bildung von E3'N<sup>2</sup>dG in pRH nach Inkubation mit Estragol für 1, 6, 24, und 48 h über einen Konzentrationsbereich von 1 µM bis 300 µM. Bei der Angabe der Daten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3). Die Messung erfolgte in Duplikaten, welche jeweils zweimal gemessen wurden. Die statistische Signifikanz wurde auf die niedrigere Konzentration. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student-Newman-Keuls-Test.

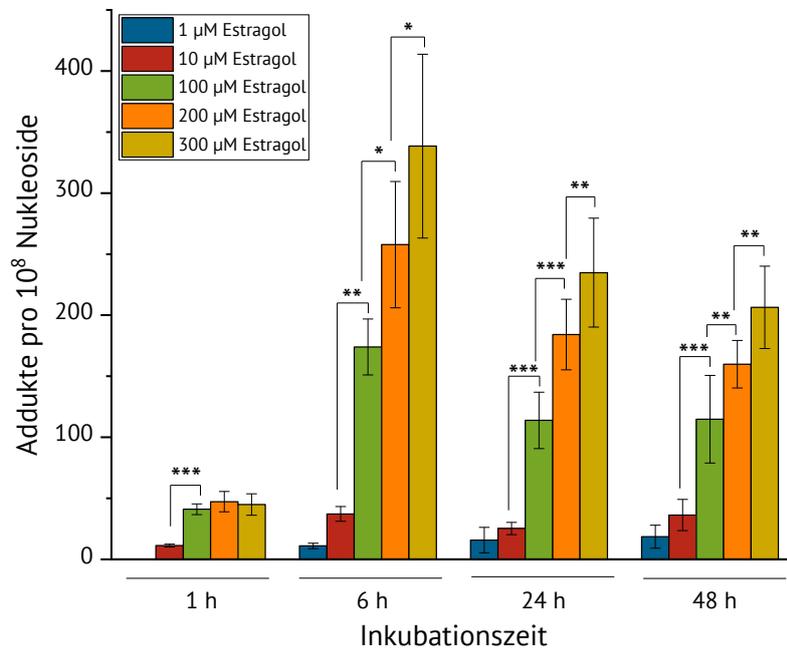


Abbildung 42: Bildung von E3'N<sup>6</sup>dA in pRH nach Inkubation mit Estragol für 1, 6, 24, und 48 h über einen Konzentrationsbereich von 1 µM bis 300 µM. Bei der Angabe der Daten handelt es sich um Mittelwerte ± Standardabweichung (n=3). Die Messung erfolgte in Duplikaten, welche jeweils zweimal gemessen wurden. Die statistische Signifikanz wurde auf die niedrigere Konzentration. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student-Newman-Keuls-Test.

## 5 Diskussion

Ein Vergleich der Adduktlevel für die Bildung von E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA in pRH für die unterschiedlichen Inkubationszeitpunkte ist in Abbildung 43 dargestellt. Bei allen Inkubationszeitpunkten handelt es sich bei E3'N<sup>2</sup>dG um das Hauptaddukt. In Tabelle 29 sind die Verhältnisse der beiden Addukte zueinander für die einzelnen Inkubationskonzentrationen und Inkubationszeitpunkte dargestellt. Generell ist der Trend zu beobachten, dass mit steigender Inkubationszeit im Verhältnis mehr E3'N<sup>2</sup>dG detektiert wurde. Im Mittel wurden für die einzelnen Inkubationszeitpunkte folgende Verhältnisse bestimmt: 1 h Inkubationszeit  $11,0 \pm 1,2$ ; 6 h Inkubationszeit  $10,9 \pm 0,4$ ; 24 h Inkubationszeit  $13,0 \pm 0,7$ ; 48 h Inkubationszeit  $14,0 \pm 0,2$ . Hier ist zu beobachten, dass nach einer Inkubationszeit von 1 h und 6 h das Verhältnis beider DNA-Addukte zueinander relativ konstant bleibt. Im weiteren Zeitverlauf kommt es zu einer Erhöhung dieses Verhältnisses. Somit wurden das Verhältnis der Addukte im Zeitverlauf zugunsten von E3'N<sup>2</sup>dG verschoben. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bei hohen Konzentrationen im Zeitverlauf die Level von E3'N<sup>6</sup>dA stärker abnehmen als die Level von E3'N<sup>2</sup>dG.

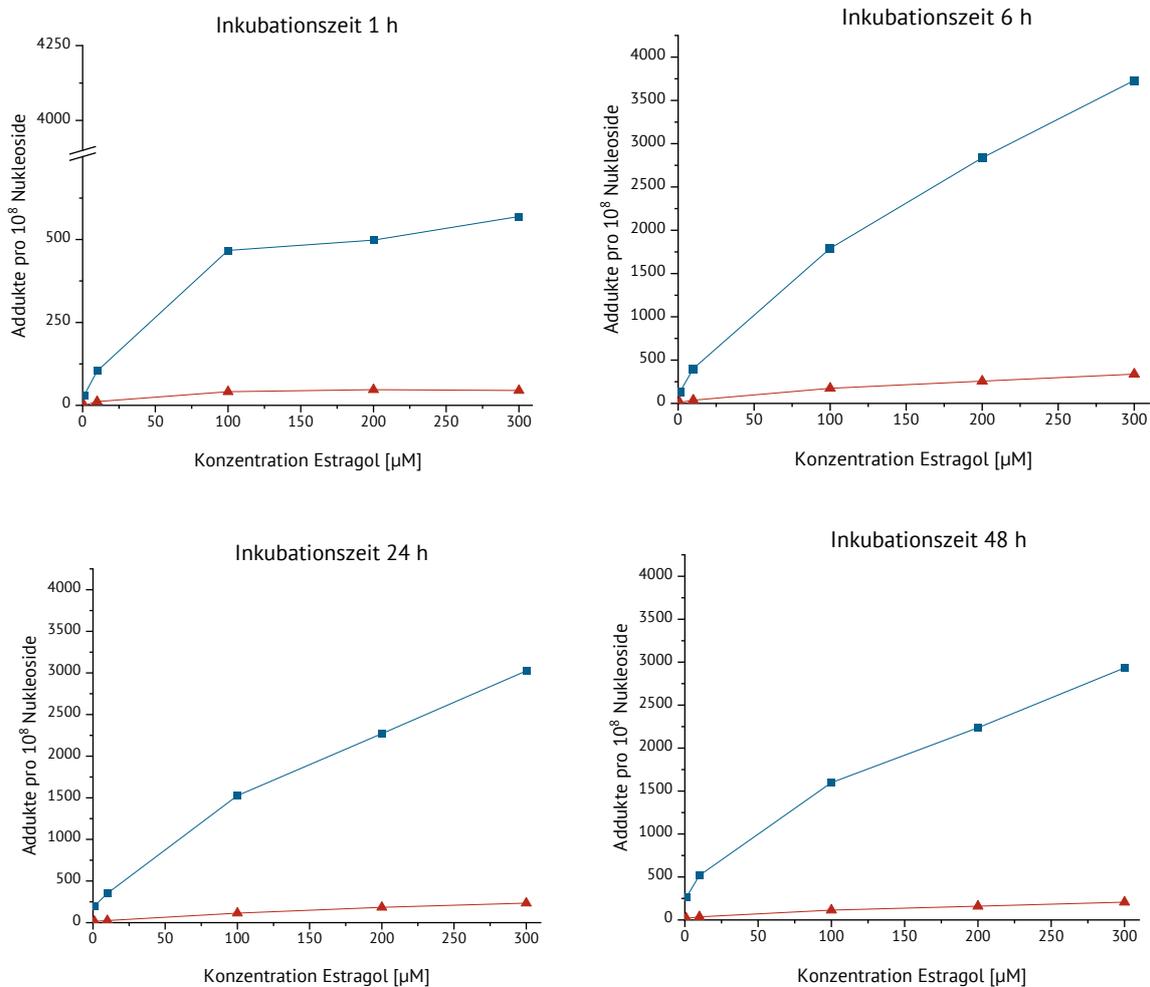


Abbildung 43: Vergleich der Adduktlevel von E3'N<sup>2</sup>dG (blau) und E3'N<sup>6</sup>dA (rot) in pRH nach der Inkubation mit Estragol für den Konzentrationsbereich von 1–300 µM

## 5 Diskussion

Tabelle 29: Verhältnis von E3'N<sup>2</sup>dG zu E3'N<sup>6</sup>dA zu den verschiedenen Inkubationskonzentration und Inkubationszeitpunkten

Konzentration	Verhältnis E3'N <sup>2</sup> dG zu E3'N <sup>6</sup> dA			
	1 h	6 h	24 h	48 h
1 µM	-	11,5	12,4	13,8
10 µM	9,4	10,8	14,1	14,3
100 µM	11,3	10,3	13,4	13,9
200 µM	10,6	11,1	12,3	14,0
300 µM	12,6	11,0	12,9	14,2

*In vitro* wurden meist nur die Adduktlevel von E3'N<sup>2</sup>dG bestimmt. Verschiedene *in-vivo*-Studien konnten bestätigen, dass es sich bei den dG-Addukt um das Hauptaddukt handelt. Randerath et al. (1984) zeigt, dass in der Leber von Mäusen nach Gabe von Estragol die Addukte N<sup>2</sup>-(*trans*-isoestragol-3'-yl)-desoxyguanosin bzw. N<sup>2</sup>-(*trans*-Estragol-1'-yl)-desoxyguanosin als Hauptaddukte gebildet wurden. Das N<sup>6</sup>-Adenosinaddukt wurde mit einem Anteil von 2–3 % der gebildeten Addukte als Nebenaddukt identifiziert. Phillips et al. (1984) identifizierte ebenfalls bei B6C3F<sub>1</sub>-Mäusen in der Leber die Addukte mit dG als Hauptaddukte, während es sich bei dem dA-Addukt um das Nebenaddukt handelte. Im Gegensatz dazu identifizierten Ishii et al. (2011) und Suzuki et al. (2012a) in der Leber von F344-Ratten das dA-Addukt als Hauptaddukt, während es sich bei dem dG-Addukt um das Nebenaddukt handelte.

In der vorliegenden Arbeit lag der Anteil von E3'N<sup>6</sup>dA an den Gesamtaddukten abhängig von der Inkubationskonzentration bei 8,9 % (1 h), 8,5 % (6 h), 7,1 % (24 h) und 6,6 % (48 h). Der Anteil von E3'N<sup>6</sup>dA lag im Vergleich zu den *in-vivo*-Daten von Randerath et al. (1984) deutlich höher. Allerdings wurde in dieser Studie neben dem hier quantifizierten E3'N<sup>2</sup>dG auch das N<sup>2</sup>-(*trans*-Estragol-1'-yl)-desoxyguanosin quantifiziert. Die Unterschiede im Verhältnis der Bildung von dem dA-Addukt und dG-Addukt sind vermutlich auch auf die Spezies bzw. Unterschiede in den Enzymaktivitäten Fremdstoff-metabolisierender Enzyme *in vivo* und *in vitro* zurückzuführen.

In der Literatur wurde in verschiedenen Zellsystemen die Bildung von E3'N<sup>2</sup>dG *in vitro* untersucht. Nach 2 h Inkubation von pRH mit 50 µM Estragol wurden ca. 100 Addukte/10<sup>8</sup> Nucleosiden nachgewiesen (Yang et al., 2020a). Im Vergleich zu den Adduktleveln, die in der vorliegenden Arbeit detektiert wurden, sind die Level, die von Yang et al. (2020a) nachgewiesen wurden wesentlich geringer. Da die Inkubationskonzentration von 50 µM Estragol nicht getestet wurde ist ein direkter Vergleich der Daten nicht möglich. Zudem wurde von Yang et al. (2020a) die Zellen in einer Suspensionskultur statt als adhärenente Kultur auf einer kollagenierten Wachstumsfläche sowie in einem anderen Medium kultiviert. In der vorliegenden Arbeit konnten bereits nach 1 h Inkubationszeit ähnliche Adduktlevel bei einer Inkubationskonzentration von 10 µM detektiert werden

In einer Suspensionskultur verlieren die Zellen schneller leberspezifische Eigenschaften, was für die unterschiedlichen Adduktlevel relevant sein könnte. Bei den höheren Inkubationszeiten von

6, 24 und 48 h lassen sich die höheren Adduktlevel auch durch die längere Inkubationszeit erklären.

Mittels eines mathematischen Modells sollte überprüft werden ob eine lineare oder gebrochen-lineare Konzentrations-Wirkungsbeziehung vorliegt. Das Modellieren der Daten sowie die Bestimmung einer mögliche Schwellenwert-Konzentration wurden mittels *Broken-Stick*-Analyse durchgeführt. (Lutz und Lutz, 2009) Die *Broken-Stick*-Analyse wurde durchgeführt von Dr. Adam D. Thomas (Centre for Research in Bioscience, Department of Applied Science, University of the West of England, Bristol), wobei die Daten zum einen für den gesamten Konzentrationsbereich von 0,01–300  $\mu\text{M}$  Estragol und zum anderen für den niedrigen Konzentrationsbereich von 0,01–1  $\mu\text{M}$  modelliert wurden. Für den Konzentrationsbereich von 0,01–300  $\mu\text{M}$  konnte sowohl für E3'N<sup>2</sup>dG als auch für E3'N<sup>6</sup>dA eine lineare Konzentrations-Wirkungsbeziehung gezeigt werden. Im niedrigen Konzentrationsbereich zeigte sich eine gebrochen-lineare Funktion für beide Addukte. Dadurch konnte ein möglicher Schwellenwert für die DNA-Adduktbildung in primären Rattenhepatozyten abgeleitet werden, unter dem keine Erhöhung der Adduktlevel bzw. kein Effekt von Estragol beobachtet wurde. Für alle Inkubationszeitpunkte und beide Addukte liegt der Schwellenwert in einem ähnlichen Bereich und schwankt zwischen 0,45  $\mu\text{M}$  Estragol und 0,55  $\mu\text{M}$  Estragol (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Bestimmte Schwellenwerte aus der *Broken-Stick*-Analyse für den Konzentrationsbereich von 0,01–1  $\mu\text{M}$  Estragol der DNA-Adduktbildung in pRH nach Inkubation mit Estragol. Die Berechnung erfolgte durch Dr. Adem D. Thomas (Center for Research in Bioscience, Department of Applied Science).

	E3'N <sup>2</sup> dG Schwellenwertkonzentration [ $\mu\text{M}$ ] (95 % Konfidenzintervall [ $\mu\text{M}$ ])	E3'N <sup>6</sup> dA Schwellenwertkonzentration [ $\mu\text{M}$ ] (95 % Konfidenzintervall [ $\mu\text{M}$ ])
24 h	0,45092 (0,3180682–0,9999351)	0,51212 (0,4151795–0,999883)
48 h	0,46993 (0,4281241–0,9999356)	0,55109 (0,4690750–0,9998908)

Diese Daten bestätigen die Ergebnisse von *in-vivo*-Studien, die bei Mäusen eine lineare Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Bildung von DNA-Addukten in der Leber nach Behandlung mit Estragol zeigten (Suzuki et al., 2012b). Der mögliche Schwellenwert bei niedrigen Konzentrationen von Estragol im Kulturmedium könnte auf eine Reparatur der DNA-Addukte im niedrigen Konzentrationsbereich zurückzuführen sein. Zudem spielt bei der Bildung der DNA-Addukte der Metabolismus von Estragol eine große Rolle. Der Hauptweg des Metabolismus von Estragol verläuft über die *O*-Demethylierung von Estragol zu 4-Allylphenol (Smith et al., 2002). Dabei handelt es sich um eine Entgiftungsreaktion. Verschiedene Studien zum Metabolismus von Estragol in Mäusen zeigten, dass bei einer geringeren Estragoldosis ein höherer prozentualer Anteil der Gesamtdosis *O*-demethyliert wird. Gleichzeitig ist der Anteil der 1'-Hydroxylierung, und somit der metabolischen Aktivierung, geringer. Mit steigender Dosis wird ein höher prozentualer

Anteil der Gesamtdosis zu dem Metaboliten 1'-Hydroxyestragol umgewandelt, der die Vorstufe für die Bildung des ultimalen Kanzerogen bildet (Anthony et al., 1987; Zangouras et al., 1981). Untersuchungen des Humane Metabolismus bestätigten, dass nur ein geringer Teil der oral Aufgenommenen Dosis von Estragol zu 1'-Hydroxyestragol metabolisiert wird (Solheim und Scheline, 1973; Sangster et al., 1987; Zeller et al., 2009). Berechnungen des Metabolitenspektrums mittels PBBK-Modeling zeigten, dass es bei Ratten vermutlich nach Aufnahme von hohen Dosen Estragol zu einer Sättigung der *O*-Demethylierung kommt, wodurch die Bildung des prozentualen Anteils an 1'-Hydroxyestragol steigt (Punt et al., 2008). Die Verschiebung des Metabolismus zugunsten der 1'-Hydroxylierung bei Nagern mit steigender Dosis ist eine weitere mögliche Erklärung für den Schwellenwert und den gebrochen-linearen Verlauf der Konzentration-Wirkungsbeziehung der DNA-Adduktbildung im niedrigen Konzentrationsbereich nach Inkubation von pRH mit Estragol.

### **5.6 Zusammenfassung**

Die humane Exposition mit Estragol findet vor allem über die Nahrung statt, wobei Estragol im etherischen Öl von Kräutern und Gewürzen zu finden ist. Der BMDL<sub>10</sub> für Estragol wurde aufgrund der Daten von Miller et al (1983) für eine Fütterungsstudie an CD-1-Mäusen für die Erhöhung der Tumorinzidenz in der Leber in verschiedenen Studien bestimmt. Die Studie von van den Berg et al. (2011) berechneten eine BMDL<sub>10</sub> von 3,3–6,5 mg/kg KG/d während die BMDL<sub>10</sub> nach Mihats et al. (2017) im Bereich von 9–99 mg/kg KG/d lag. Sowohl van den Berg et al. (2011) als auch Mihats et al. (2017) kamen nach der Klakulation des MoE für pflanzliche Lebensmittel bzw. Fencheltee zu dem Schluss, dass es sich bei Ertragol um eine Substant mit „*high concern*“ für die Risikobewerung handelt, da der MoE in den Berechnungen unter 10.000 lag. Die Exposition wird in den USA auf ca. 10 µg/kg KG/d und in Europa auf 8,87 µg/kg KG/d geschätzt (Smith et al., 2002; Martins et al., 2018). Legt man die oben genannten Werte für den BMDL<sub>10</sub> zugrunde handelte es sich in beiden Fällen für Estragol um eine Substanz von „*high concern*“.

Studien zur Toxikokinetik zeigen, dass in Ratten bei geringen Dosen vor allem die *O*-Demethylierung und somit die Entgiftung von Estragol der Hauptweg des Metabolismus ist. Mit steigender Estragoldosis nimmt der Anteil der Hydroxylierung an der 1'-Position zu. Dadurch wird ein höherer Prozentsatz 1'-Hydroxyestragol gebildet, welche durch SULT zu dem reaktiven 1'-Sulfoxyestragol metabolisiert werden kann. (Anthony et al., 1987; Zangouras et al., 1981) Der Vergleich von Probanden, die Estragol über den Konsum von Fencheltee oral aufnahmen, zeigte die Tendenz, dass mit steigender Dosis ein größerer prozentualer Anteil zu 1'-Hydroxyestragol metabolisiert wird (Zeller et al., 2009). Das PBBK-Modeling konnte für Ratten bestätigen, dass mit steigender Dosis ein höherer Anteil Estragol zu 1'-Hydroxyestragol metabolisiert wird, wobei es vermutlich zu einer Sättigung der *O*-Demethylierung kommt (Punt et al., 2008). Die Daten des PBBK-Modeling von Punt et al. (2009) für den humanen Metabolismus widersprechen den *in vivo* beobachtet Daten, wobei eine Verringerung der 1'-Hydroxylierung mit Erhöhung der Estragoldosis vorhergesagt wurden. Neben der Metabolisierung in der Leber wurde in Ratten auch eine geringe

Beteiligung der Niere und Lunge am Metabolismus vorhergesagt, welche im humanen Metabolismus keine Rolle spielt (Punt et al., 2009; Punt et al., 2008). Ein PBBK-Modeling von Ning et al. (2017) sagte auch für den humanen Metabolismus einer Verringerung der prozentualen Bildung von 1'-Hydroxyestragol mit steigender Estragoldosis voraus, was sich mit den Ergebnissen der Studie von Zeller et al. (2009) deckt.

DNA-Addukte von Estragol konnten in *in-vitro*-Studien sowohl in pRH als auch in Zelllinien nachgewiesen werden (Probert et al., 2016; Yang et al., 2020a). Nach Behandlung von Nagern mit hohen Dosen Estragol konnten DNA-Addukte in der Leber detektiert werden. Geringe Adduktlevel waren auch in der Niere und der Lunge zu detektieren. (Suzuki et al., 2012a; Suzuki et al., 2012b). Abhängig von der Spezies handelt es sich in *in-vivo*-Studien bei dem Addukt mit dA bzw. dem Addukt mit dG um das Hauptaddukt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in primären Rattenhepatozyten isoliert aus Wistar-Ratten E3'N<sup>2</sup>dG als Hauptaddukt gebildet wird. Studien zur NER zeigten, dass nur ein geringer Anteil der gebildeten Addukte (E3'N<sup>2</sup>dG) wird werden. (Yang et al., 2020a) Die Daten des Zeitverlaufs der DNA-Adduktbildung in pRH zeigen einen starken Anstieg der Adduktlevel zwischen einer Inkubationszeit von 1 h und 6 h. Die anschließende geringe Abnahme der Addukte könnte einen Hinweis auf eine stattfindende Reparatur von DNA-Addukten sein.

Die Bildung von DNA-Addukte und daraus resultierende Mutationen können für chemische Kanzerogene ein früher PoD sein. (Thomas et al., 2015). Die Bildung von DNA-Addukten von Estragol ist somit vermutlich ein wichtiger Punkt in der Genotoxizität von Estragol. Da die Leber das Hauptzielorgan der Toxizität ist, könnte die DNA-Adduktbildung nach metabolischer Aktivierung von Estragol Schlüsselpunkt in der Initiation von Lebertumoren bei Mäusen und Ratten sein. Eine *in-vivo*-Studie konnte zeigen, dass nur ein geringer Anteil der gebildeten DNA-Addukte in der Zelle repariert wird (Yang et al., 2020a). Zudem konnte eine Akkumulation der Addukte in HepaRG Zellen gezeigt werden (Yang et al., 2020b). In der vorliegenden Arbeit, konnte gezeigt werden, dass die DNA-Adduktbildung in pRH zeit- und konzentrationsabhängig ist. Dabei zeigte sich bei hohen Dosen eine lineare Konzentration-Wirkungsbeziehung. Im niedrigen Konzentrationsbereich konnte eine gebrochen-lineare Konzentrations-Wirkungsbeziehung gezeigt werden, die Hinweise darauf gibt, dass ein Schwellenwert für die Bildung der DNA-Addukte vorliegen könnte. Die gebrochen-lineare Konzentrations-Wirkungsbeziehung im niedrigen Konzentrationsbereich könnte zum einen auf die Effizienz der DNA-Reparatur und zum anderen auf die Kapazität der Detoxifizierung von Estragol zurückzuführen sein.

Die Daten zum Mikrokerntest zeigten, dass Estragol in HepG2-CYP1A2 in einem Konzentrationsbereich von 1–300 µM genotoxisch ist, während in den HepG2-Zellen kein genotoxischer Effekt zu beobachten war. Dies deutet auf eine Beteiligung der CYP1A2-katalysierten 1'-Hydroxylierung bei der Genotoxizität und somit der Kanzerogenese hin. Im niedrigen Konzentrationsbereich von 0,01–1 µM konnten ebenfalls Hinweise auf genotoxische Effekte in den HepG2-CYP1A2-Zellen beobachten werden (Schildwächter, 2020).

---

## 6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

---

In der vorliegenden Arbeit konnten die beiden DNA-Addukte  $N^2$ -(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin und  $N^6$ -(Isoestragol-3'-yl)-3'-desoxyadenosin erfolgreich synthetisiert werden. Ebenso konnte die Synthesen für einen Mikroansatz mit 1 mg der entsprechenden Stabilisotopen-markierten Base optimiert werden und somit die Stabilisotopen-markierten Analoga  $^{15}\text{N}_5$ -E3'N<sup>6</sup>dA und  $^{15}\text{N}_5$ -E3'N<sup>2</sup>dG synthetisiert werden. Mithilfe der synthetisierten Referenzsubstanzen und der Stabilisotopen-markierten Standards konnte eine sensitive UHPLC-ESI-MS/MS-Methode entwickelt werden, um die beiden Addukte E3'N<sup>6</sup>dA und E3'N<sup>2</sup>dG in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit Estragol mittels Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse quantifizieren zu können.

In primären Rattenhepatozyten und verschiedenen Zelllinien konnte bestätigt werden, dass Estragol nur eine geringe Zytotoxizität aufweist. Außerdem konnte in einer *in-vitro*-Studie gezeigt werden, dass in primären Rattenhepatozyten die DNA-Addukte E3'N<sup>6</sup>dA und E3'N<sup>2</sup>dG nach Inkubation mit Estragol gebildet wurden. Dabei zeigte sich, dass die Bildung beider Addukte zeit- und konzentrationsabhängig ist. Für den niedrigen Konzentrationsbereich von 0,01–1  $\mu\text{M}$  Estragol zeigten sich Hinweise, dass eine gebrochen-lineare Konzentrations-Wirkungsbeziehung vorliegt. Dies ist ein Indiz dafür, dass ein Schwellenwert für die Bildung von DNA-Addukte *in vitro* existieren könnte. Über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich von 0,01–300  $\mu\text{M}$  Estragol wurde eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung beobachtet.

Im Mikrokerntest konnte in HepG2-CYP1A2-Zellen gezeigt werden, dass Estragol in Säugerzellen ein genotoxisches Potential aufweist. Dabei konnte in HepG2-Zellen kein genotoxischer Effekt gezeigt werden. In transfizierten HepG2-CYP1A2-Zellen, die CYP1A2 überexprimieren, ist Estragol bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Estragol im Kulturmedium genotoxisch.

In weiteren Studien sollte die Reparatur der DNA-Addukte in primären Rattenhepatozyten untersucht werden. Dazu sollten Inkubationen mit einer anschließender Nachinkubation ohne Testsubstanz durchgeführt werden.

Zudem sollte die Genotoxizität im niedrigen Konzentrationsbereich von 0,01–1  $\mu\text{M}$  genauer untersucht werden. Erste Versuche zeigten, dass auch bei Inkubation mit geringeren Estragolkonzentrationen von 0,01  $\mu\text{M}$  bis 1  $\mu\text{M}$  Estragol die Mikrokernrate erhöht war (Schildwächter, 2020).

Weiterhin wäre ein Vergleich der Genotoxizität bzw. der DNA-Adduktbildung von Estragol mit den Metaboliten 1'-Hydroxyestragol sinnvoll. Insbesondere sollte der Mikrokerntest in HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen mit 1'-Hydroxyestragol durchgeführt werden, um zu bestätigen, ob es sich dabei um den reaktiven Metaboliten handelt.

# 7 MATERIAL UND METHODEN

## 7.1 Allgemeines

Alle Standardchemikalien und Lösungsmittel wurden in entsprechender Reinheit von der Chemikalienausgabe der Technischen Universität Kaiserslautern bezogen. Die DNA-Basen 2'-Desoxygunanosin (dG), 2'-Desoxyadenosin (dA), 2'-Desoxycytosin (dC) und 2'-Desoxythymidin (dT) wurden von AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland) oder TCI (Eschborn, Deutschland) bezogen. Die isotope markierten Basen  $^{15}\text{N}_5$ -dG und  $^{15}\text{N}_5$ -dA wurden von Silantes GmbH (München, Deutschland) mit einer Isotopenmarkierung von > 98 % bezogen. Methanol (LC-MS Grade) wurde von VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen, als Wasser wurde doppelt destilliertes Wasser verwendet. Alle Verbrauchsmaterialien wurden von Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) bezogen. Die Bezugsquellen für die in der Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31: verwendete Enzyme und Bezugsquelle

Enzyme	Hersteller
Proteinase K	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
RNase	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Phosphodiesterase II (PDE)	Worthington (Lakewood, NJ, USA)
Micrococcale Nuclease (MN)	Worthington (Lakewood, NJ, USA)
Alkalische Phosphatase (CIP)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kollagenase	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypsin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Alle verwendeten Zellen sind in folgender Tabelle dargestellt

Tabelle 32: verwendetet Zellen und Bezugsquelle

Kultur	Bezogen von
V79-Zellen	DSMZ (Heidelberg, Deutschland)
HepG2-Zellen	DSMZ (Heidelberg, Deutschland)
HepG2-CYP1A2-Zellen	AG Küpper (Fachgebiet Molekulare Zellbiologie, Brandenburgische Technische Universität, Cottbus-Senftenberg, Deutschland)
primäre Rattenhepatozyten (pRH)	männliche Wistar-Ratten (Janvier Labs; LeGenest-Saint-Isle, Frankreich), 150–250 g, Isolation modifiziert nach Seglen (1976)

## **7.2 Zellkultur**

Zur Untersuchung der Zytotoxizität und Genotoxizität wurden verschiedene Zellkulturlinien basierend auf HepG2-Zellen eingesetzt. Außerdem wurde die Zytotoxizität ebenfalls in V79-Zellen bestimmt. Im Folgenden werden die verwendeten Zelllinien genauer beschrieben.

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt und die Zellen wurden unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden vor Verwendung auf 37 °C vorgewärmt. Dem Medium wurden zusätzlich FKS und Penicillin/Streptomycin zugesetzt (siehe Tabelle 33). Abhängig von den verwendeten Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen und mit oder ohne Pyruvat verwendet. Zusätzlich wurde neben den Zelllinien für die Untersuchung der DNA-Adduktbildung primäre Rattenhepatozyten verwendet. Diese wurden unter den gleichen Kulturbedingungen und der gleichen Mediumzusammensetzung kultiviert, wie die genannten Zelllinien.

Tabelle 33: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien für die Kultivierung der Zellen.

Substanz	Volumen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	500 ml (entspricht 89 %)
FKS	56 ml (entspricht 10 %)
Penicillin/Streptomycin	5,6 ml (entspricht 1 %)

### **7.2.1 Inkubation von Zellen**

Für die Inkubation der Zellen wurden Estragol sowie MMC (Positivkontrolle für den Mikrokerntest) in DMSO und Saponin (Positivkontrolle für den Resazurin-Reduktionstest) in Wasser gelöst. Die Inkubationslösungen wurden in 1000facher Konzentration angesetzt, sodass sich eine Endkonzentration von DMSO im Kulturmedium von 0,1 % ergab. Saponin wurde in 100facher Konzentration angesetzt. Die für die verschiedenen Tests verwendeten Pipettierolumina und Konzentrationen sind in Tabelle 34 dargestellt.

Zur Inkubation der Zelllinien (V79-Zellen, HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen) wurden die Zellen in Well-Platten bzw. Gewebekulturschalen ausgesät. Nach einer Anwachszeit von 24 h wird das Kulturmedium abgesaugt und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Anschließend werden die Zellen wie in Tabelle 34 inkubiert. Die pRH werden nach der Isolation in kollagierten Well-Platten bzw. Gewebekulturschalen ausgesät. Der Mediumwechsel und die Inkubation erfolgte nach einer Anwachszeit von 3–4 h.

Für den Resazurin-Reduktionstest wurden die Zellen mit den in Tabelle 38 aufgeführten Zelldichte ausgesät. Für den Mikrokerntest betrug die Zelldichte sowohl für HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen 700.000 Zellen/2 ml Kulturmedium in 60 mm Gewebekulturschalen, für die DNA-Adduktbildung in pRH 7 Mio. Zellen/7 ml Kulturmedium in 100 mm Gewebekulturschalen.

Tabelle 34: Pipettierschema für Zellkultur

	Konzentration		Pipettiervolumen Well-Platten		Pipettiervolumen Gewegekulturschalen	
	Inkubations- lösung	Medium	24 Well (V = 1 ml)	48 Well (V = 0,5 ml)	60 mm (V = 2 ml)	100 mm (V = 7 ml)
<b>Saponin</b>	10 %	0,1 %	10 µl	5 µl	-	-
<b>MMC</b>	0,5 mM	0,5 µM	-	0,5 µl	2 µl	-
	0,5 mM	0,6 µM	-	0,6 µl	2,4 µl	-
<b>DMSO</b>	100 %	0,1 %	1 µl	0,5 µl	2 µl	7 µl
<b>Estragol</b>	0,01 mM	0,01 µM	-	-	-	7 µl
	0,05 mM	0,05 µM	-	-	-	7 µl
	0,1 mM	0,1 µM	-	-	-	7 µl
	0,5 mM	0,5 µM	-	-	-	7 µl
	1 mM	1 µM	-	-	2 µl	7 µl
	10 mM	10 µM	1 µl	0,5 µl	2 µl	7 µl
	30 mM	30 µM	1 µl	0,5 µl	-	-
	50 mM	50 µM	1 µl	0,5 µl	2 µl	7 µl
	60 mM	60 µM	1 µl	0,5 µl	-	-
	100 mM	100 µM	1 µl	0,5 µl	2 µl	7 µl
	200 mM	200 µM	1 µl	0,5 µl	2 µl	7 µl
	300 mM	300 µM	1 µl	0,5 µl	2 µl	7 µl
	600 mM	600 µM	1 µl	0,5 µl	-	-
	1.000 mM	1.000 µM	1 µl	0,5 µl	-	-
2.000 mM	2.000 µM	1 µl	0,5 µl	-	-	

### 7.2.2 HepG2-Zellen

Bei HepG2-Zellen handelt es sich um eine immortalisierte humane Hepatomzelllinie, die von Aden et al. (1979) etabliert wurde. Die Zellen wurden aus einem humanen hepatozellulären Karzinom eines 15jährigen kaukasischen Jungen isoliert.

HepG2-Zellen gehören zu den meist genutzten und am besten charakterisierten Zelllinien (Aden et al., 1979; Brandon et al., 2003; Wilkening et al., 2003). Die Zellen weisen eine Epithelzell-artige Morphologie auf und wachsen adhärent, wobei die Morphologie vergleichbar mit Leberparenchymzellen ist. HepG2-Zellen haben eine Chromosomenanzahl von 48–54 Chromosomen pro Zelle und eine relativ lange Generationszeit von 20–28 h. (Wilkening et al., 2003; Knasmüller et al., 1998)

Da HepG2-Zellen viele leberspezifische Eigenschaften aufweisen, kommt die Zelllinie oft bei der Untersuchung des Metabolismus zum Einsatz (Brandon et al., 2006). Die Zellen exprimieren viele, für humanen Leberzellen charakteristische Plasmaproteine. Außerdem exprimieren HepG2-Zellen sowohl Phase-I-Enzyme, wie CYP450-Enzyme, als auch Phase-II-Enzyme, wie Sulfotransferasen. (Knasmüller et al., 1998; Brandon et al., 2006). HepG2-Zellen sind gut geeignet für die Testung der Genotoxizität direkter und direkter Mutagene. Dabei kann auf die Verwendung des S9-Mix zur metabolischen Aktivierung der Testsubstanz verzichtet werden (Natarajan und Darroudi, 1991).

Im Vergleich zu primären humanen Hepatozyten zeigen sich im Bezug auf die am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Enzyme zum Teil große Unterschiede in der Aktivität. Viele CYP450-Enzyme zeigen in HepG2-Zellen eine verringerte Aktivität, während einige Phase-II-Enzyme überexprimiert werden (Knasmüller et al., 1998; Gerets et al., 2012). Die Enzymaktivität und die basalen Level von CYP450 können durch die Kulturbedingungen beeinflusst werden. Außerdem ist eine Induktion der Enzymaktivität durch verschiedene CYP450-Induktoren möglich (Hewitt und Hewitt, 2004; Brandon et al., 2003). Eine Studie zum genetischen Polymorphismus von HepG2-Zellen zeigt, dass unter anderem die Fremdstoff-metabolisierenden CYP450-Enzyme CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP2E1 in den Zellen exprimiert werden. Zusätzlich wurde auch der Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) und die Enzymaktivität der SNPs untersucht. Für CYP1A2 war je nach SNP eine verringerte bis normale Enzymaktivität zu beobachten, wobei die Enzymaktivität von CYP1A2 in HepG2-Zellen induziert werden kann. Die Enzyme CYP2A6, CYP2C19, und CYP2D6 zeigten keine Enzymaktivität, während CYP2C9 eine verringerte und CYP2E1 eine erhöhte Aktivität aufzeigten. Untersuchungen der Phase-II-Enzyme zeigten, dass sowohl SULT1A1 als auch SULT1A2 in den Zellen exprimiert wird, wobei die Enzymaktivität beider Enzyme verringert ist (Brandon et al., 2006). SULT1A1 und SULT2A1 können in HepG2-Zellen durch Medienzusätze, wie z. B. Genestein, induziert werden (Chen et al., 2008). Im Kontext dieser Arbeit wurden HepG2-Zellen aufgrund ihrer metabolischen Kompetenz für den Mikrokerntest ausgewählt. Studien zum Metabolismus von Estragol haben gezeigt, dass die Toxifizierung von Estragol über eine CYP450-katalysierte Hydroxylierung und anschließende Sulfonierung verläuft. Dabei spielen vor allem CYP1A2 und CYP2E6 eine Rolle, welche beide von HepG2-Zellen exprimiert werden. (Jeurissen et al., 2007)

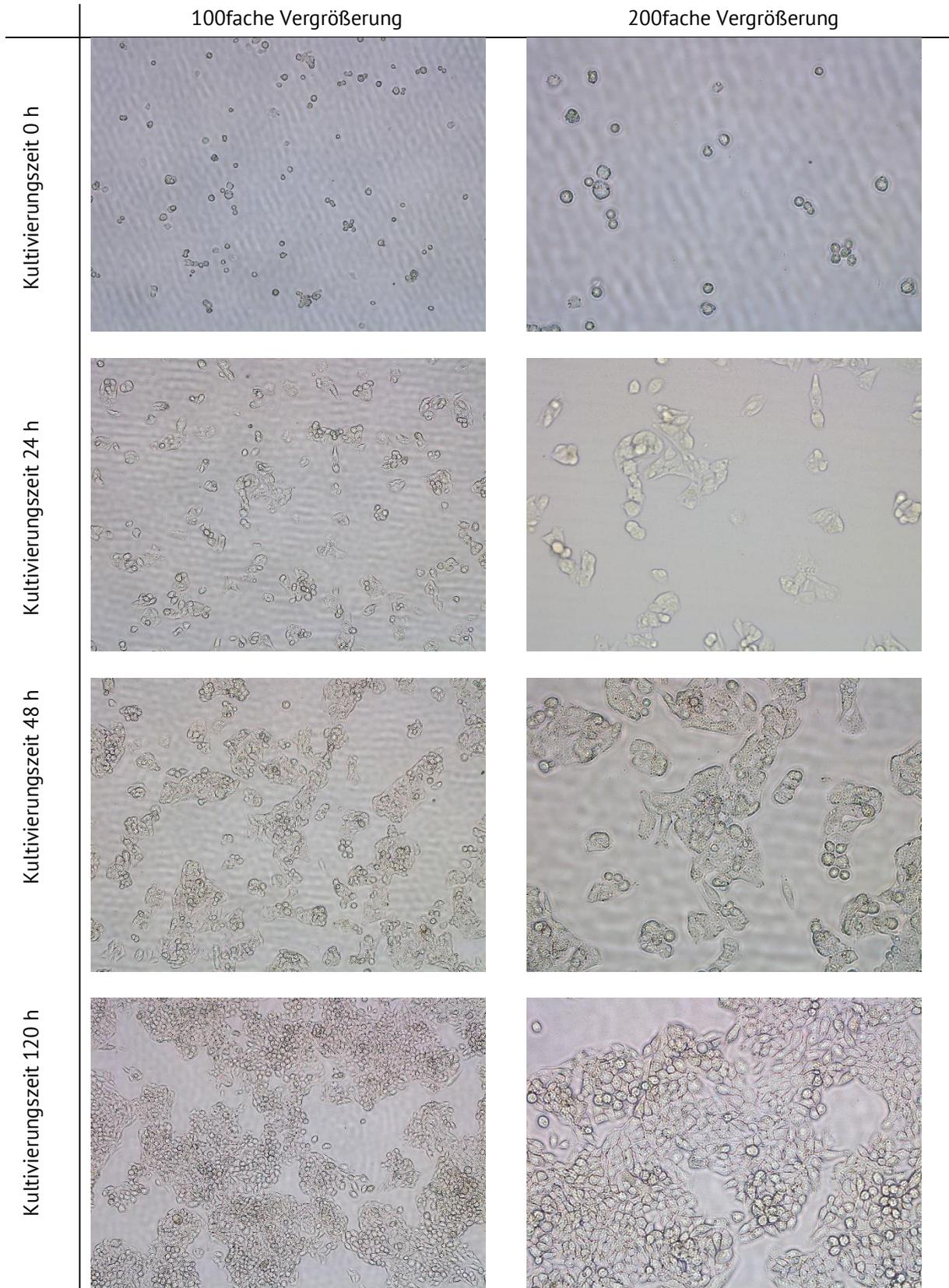
### **7.2.3 HepG2-CYP1A2-Zellen**

Die HepG2-CYP1A2-Zellen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Küpper (Fachgebiet Molekulare Zellbiologie, Brandenburgische Technische Universität, Cottbus-Senftenberg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die HepG2-CYP1A2-Zellen wurden durch die Transduktion von humaner CYP1A2 cDNA (Donor cDNA: *Homo sapiens*) in HepG2-Zellen erzeugt. Die Übertragung der humanen CYP1A2 cDNA erfolgte über Lentiviren als Vektorsystem und anschließender Selektion mit dem Antibiotika Zeocin. (Steinbrecht et al., 2020)

Die Zellmorphologie der HepG2-CYP1A2-Zellen ist vergleichbar mit Hepatozyten. Die Verdopplungszeit unterscheidet sich nicht von der der HepG2-Zellen. Untersuchungen der mRNA Expression mittels qRT-PCR und der Proteinexpression mittels Western Blot zeigten eine signifikante Erhöhung der Expression von CYP1A2 im Vergleich zu den HepG2-Zellen. Die Untersuchung der Enzymaktivität zeigt ein 700–800fache Aktivität von CYP1A2 in HepG2-CYP1A2-Zellen im Vergleich zu den Mutterzellen. (Steinbrecht et al., 2020)

## 7 Material und Methoden

Tabelle 35: Wachstum von HepG2-CYP1A2-Zellen. Ausgesät wurden 700.000 Zellen in einer 60 mm Gewebekulturschale (Bedingungen des Mikrokerntest)



Die Proteinexpression von CYP1A2 wurde durch Nina Seiwert (Fachbereich Lebensmittelchemie und Toxikologie, Arbeitsgruppe Fahrer, Technischen Universität Kaiserslautern) mittels Western Blot überprüft. Der Vergleich von HepG2-Zellen zu HepG2-CYP1A2-Zellen zeigte, dass die HepG2-CYP1A2-Zellen CYP1A2 exprimieren. Für die HepG2-Zellen konnten keine Bande im Western Blot beobachtet werden. Der Vergleich zwischen HepG2-CYP1A2-Zellen (Anwuchszeit 24 h) und primären Rattenhepatozyten (Anwuchszeit 4 h) zeigt eine vergleichbare Expression von CYP1A2. HepG2-CYP1A2-Zellen wurden zum einen für die Testung der Zytotoxizität und zum anderen für die Testung der Genotoxizität mittels Mikrokerntestes eingesetzt. Ziel war es zu untersuchen, ob eine höhere CYP1A2-Aktivität der Zellen einen Einfluss auf die Zytotoxizität bzw. Genotoxizität hat.

### **7.2.4 V79-Zellen**

Bei V79-Zellen handelt es sich um Lungenfibroblasten. Die Zelllinie wurde von Ford und Yergamian (1958) aus der Lunge von chinesischen Hamstern isoliert und charakterisiert. V79-Zellen besitzen eine schnelle Verdopplungszeit von 12–16 h sowie eine hohe Klonierungseffizienz von 75–95 %. V79-Zellen besitzen einen homogenen Karyotyp mit einer Chromosomenzahl von  $22 \pm 1$ . (Bradley et al., 1981; Krahn, 1983; Ford und Yergamian, 1958)

Die Zellen eignen sich zur Untersuchung der Zytotoxizität und Mutagenität. Die kurze Verdopplungszeit von 12–16 h sowie der stabile Karyotyp begünstigen die Verwendung der Zellen für Mutagenitätsuntersuchungen. Zudem ähnelt der Aufbau der DNA sowie die DNA-Reparaturmechanismen denen humaner Zellen. (Bradley et al., 1981; Doehmer, 1993; Krahn, 1983)

Viele Kanzerogene und Mutagene müssen metabolisch aktiviert werden. V79-Zellen exprimieren keine CYP450-Enzyme und sind daher metabolisch nicht kompetent. Um auch Mutagene und Kanzerogene nach metabolischer Aktivierung zu erfassen, kann dem Medium S9-Mix zugesetzt werden bzw. eine Co-Kultur von primären Zellen mit V79-Zellen durchgeführt werden. (Doehmer, 1993; Krahn, 1983)

In dieser Arbeit wurde die Zytotoxizität von Estragol in V79-Zellen untersucht. Dabei lag der Fokus auf der Toxizität von Estragol als Muttersubstanz, da V79-Zellen nicht metabolisch aktiv sind. Da bekannt ist, dass Estragol metabolisch aktiviert werden muss, um Kanzerogen zu wirken, wurde die Genotoxizität mittel Mikrokerntest von Estragol nicht in V79-Zellen getestet.

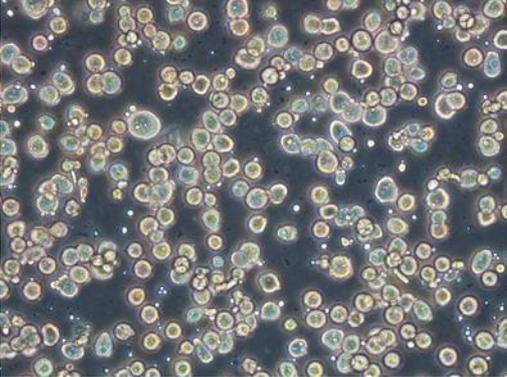
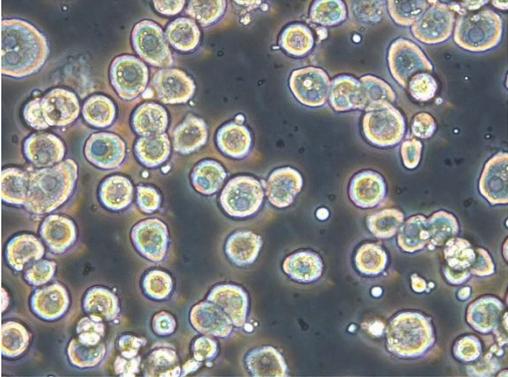
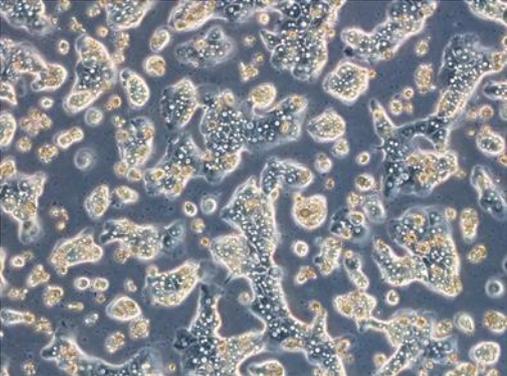
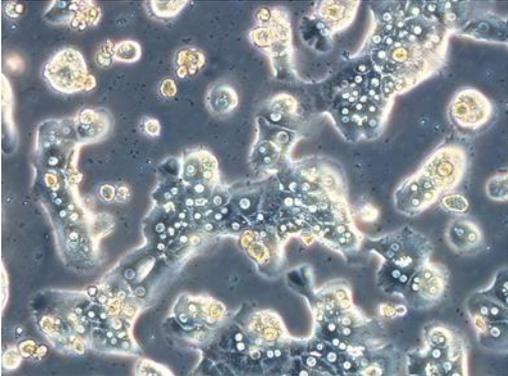
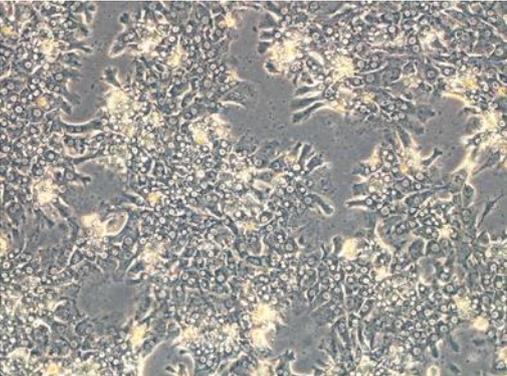
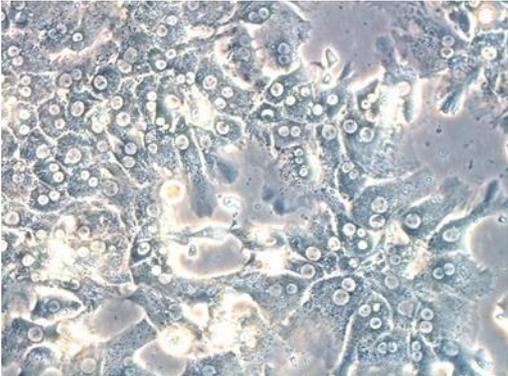
### **7.2.5 Primäre Rattenhepatozyten**

Bei primäre Rattenhepatozyten handelt es sich um Leberparenchymzellen, die durch eine Leberperfusion isoliert und in Kultur genommen werden können. Die Isolation der Hepatozyten führt zu Schädigung membranständiger Rezeptoren und Antigenen, Zell-Zell-Verbindungen, Zellmembranen und z. T. zu oxidativem Stress. Durch den Verlust der Zell-Zell-Verbindungen kommt es zum Verlust der Zellpolarität, Zellintegrität und Zelldifferenzierung. (Soldatow et al., 2013)

## 7 Material und Methoden

Frisch isolierte Hepatozyten sind nur wenige Stunden in einer Suspensionskultur vital (Agius et al., 1985). Für eine längere Kultivierung müssen die Zellen auf einer kollagenierten Oberfläche ausgesät werden, wobei sich Gruppen von zwei bis drei Zellen bilden. Im Verlauf der Kultivierung verändert sich die Zellmorphologie der Hepatozyten. Nach ca. ein bis zwei Stunden sind 50–60 % der Zellen auf der kollagenierten Fläche angewachsen. Mit längerer Kultivierungsdauer flachen die Zellen immer weiter ab und es bilden sich Zell-Zell-Verbindungen aus (Michalopoulos und Pitot, 1975). Die Morphologie der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten ist in Tabelle 36 dargestellt.

Tabelle 36: Zellmorphologie pRH zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Isolierung zu verschiedenen Kultivierungszeiten. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 7 Mio. Zellen/7 ml Kulturmedium in einer 100 mm Gewebekulturschale ausgesät

	100fache Vergrößerung	200fache Vergrößerung
Kultivierungszeit 3 h		
Kultivierungszeit 27 h		
Kultivierungszeit 51 h		

Die metabolische Kompetenz und Morphologie der Zellen ähneln den *in-vivo*-Bedingungen. Dabei eignen sich die Zellen vor allem für kurzzeitige Untersuchungen zur Biochemie, Pharmakologie oder Toxikologie. Nachdem die Zellen in Kultur genommen wurden verlieren pRH schnell leberspezifische Funktionen und es ist ein Verlust der Enzymaktivität zu beobachten. Die EROD-Aktivität von pRH nimmt innerhalb der ersten 48 h um bis zu 80 % ab, die PROD-Aktivität innerhalb der ersten 72 h um 90 %. Auch die BROD-Aktivität, die die Enzymaktivität von CYP1A2, CYP2B1, CYP3A1 und CYP3A2 widerspiegelt, nimmt innerhalb der ersten 48 h stark ab. Nach 72 h ist keine BROD Aktivität mehr zu detektieren. Durch Optimierung der Kulturbedingungen durch den Zusatz von Dexamethason und DMSO konnte die Enzymaktivität über sechs Tage aufrechterhalten werden. (Agius et al., 1985; Swift et al., 2010; Liu et al., 2017; Zurlo und Arterburn, 1996; Gao et al., 2020) Somit können die leberspezifischen Eigenschaften von pRH durch Abpassung der Kulturbedingungen länger aufrechterhalten werden.

Neben Phase-I-Enzymen des Fremdstoffmetabolismus exprimieren primäre Rattenhepatozyten auch Enzyme des Phase-II-Metabolismus. Die Aktivität der UGT sowie von GST konnte in pRH über 6 Tage in Kultur nachgewiesen werden (Zurlo und Arterburn, 1996). Auch die Aktivität von SULTs der primärer Hepatozyten ist in der Kultur stabil. (Smith et al., 2012)

### **7.3 Handling von Zellen**

#### **7.3.1 Auftauen von Zellen**

##### **Chemikalien und Lösungen**

Lösung	Substanz	Menge
FKS	ThermoFisher Scientific	
Pen/Strep	Penicillin	10.000 u/ml
(Fertiglösung Sigma-Aldrich, Bestellnummer P4333)	Streptomycin	10 mg/ml
Kulturmedium	DMEM hg mit Natriumpyruvat	500 ml
(HepG2-Zellen, V79-Zellen)	FKS	56 ml
	Pen/Strep	5,6 ml
Kulturmedium	DMEM hg ohne Natriumpyruvat	500 ml
(HepG2-CYP1A2-Zellen)	FKS	56 ml
	Pen/Strep	5,6 ml

##### **Durchführung**

Die Zellen werden aus dem Biofreezer (- 80 °C) entnommen und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Nachdem die Zellen resuspendiert wurden, werden die Zellen in 13 ml Kulturmedium überführt und in einem Zentrifugenröhrchen bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 3 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wird in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt. Zu der Zellsuspension wird 4 ml Zellkulturmedium

und 500 µl FKS gegeben. Die Zellen werden unter Standardbedingungen im Brutschrank kultiviert, nach 24 h wird das Kulturmedium gewechselt. Nachdem der Zellrasen konfluent ist werden die Zellen passagiert und in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen überführt.

### **7.3.2. Kultivierung und Passagieren von Zelllinien**

#### **Chemikalien und Lösungen**

Lösung	Substanz	Menge
PBS	NaCl	8,006 g (137 mM)
	KCl	0,201 g (2,7 mM)
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,923 g (6,5 mM)
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,204 g (1,5 mM)
	pH = 7,4; Lagerung bei RT	ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
FKS	ThermoFisher Scientific	
Pen/Strep (Fertiglösung Sigma-Aldrich, Bestellnummer P4333)	Penicillin	10.000 u/ml
	Streptomycin	10 mg/ml
Kulturmedium (HepG2-Zellen, V79-Zellen)	DMEM hg mit Natriumpyruvat	500 ml
	FKS	56 ml
	Pen/Strep	5,6 ml
Kulturmedium (HepG2-CYP1A2-Zellen)	DMEM hg ohne Natriumpyruvat	500 ml
	FKS	56 ml
	Pen/Strep	5,6 ml
Trypsin/EDTA (Fertiglösung Sigma-Aldrich, Bestellnummer T4049)	Tyrosin	2,5 g/l
	EDTA	0,2 g/l EDTA
	in HBSS mit Phenylrot	

#### **Durchführung**

Alle Zelllinien werden im Brutschrank unter Standardbedingungen in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 20 ml Kulturmedium kultiviert. Nach 48 h wird das Kulturmedium durch frisches Kulturmedium ersetzt. Das verwendete Kulturmedium variiert je nach Zelllinie. HepG2-Zellen und V79-Zellen werden in DMEM (*hg* mit Phenylrot und Natriumpyruvat) kultiviert während HepG2-CYP1A2-Zellen in DMEM (*hg* mit Phenylrot ohne Natriumpyruvat) kultiviert werden.

Die Zellen werden beim Erreichen von 100 % Konfluenz passagiert. Das Kulturmedium wird abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Es werden 1,5 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und die Zellen abhängig von der Zelllinie für unterschiedliche Zeiten inkubiert (siehe Tabelle 37). Die Trypsin-Reaktion wird mit 9 ml Kulturmedium abgestoppt und anschließend werden die Zellen resuspendiert.

## 7 Material und Methoden

Tabelle 37: Inkubationsdauer von verschiedenen Zelllinien mit Trypsin zum Passagieren

Zelllinie	Inkubationszeit mit Trypsin/EDTA
HepG2-Zellen	10 min
HepG2/1A2-Zellen	10 min
V79-Zellen	2 min

Zur Zellzahlbestimmung wird die Zellsuspension im Verhältnis 1:5 mit Trypanblau-Lösung versetzt (20 µl Zellsuspension und 80 µl Trypanblau-Lösung) und resuspendiert. 20 µl der Zellsuspension werden in eine Neubauer Zählkammer pipettiert und die nicht gefärbten Zellen ausgezählt. Die Zellzahl berechnet sich wie folgt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{GZ} \cdot \text{VF} \cdot 10000$$

mit: GZ Mittelwert Gesamtzellzahl (ausgezählt 4 Großquadrate)  
10000 Umrechnung µl in ml  
VF Verdünnungsfaktor (5)

Für die weitere Kultivierung werden die Zellen in 20 ml Kulturmedium in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät. Dabei wird die Zelldichte so gewählt, dass die Zellen nach 7 Tagen konfluent sind.

### **7.3.3. Einfrieren von Zellen**

#### **Chemikalien und Lösungen**

Lösung	Substanz	Menge
FKS	ThermoFisher Scientific	
Einfriermedium	FKS	880 µl
	DMSO	120 µl

#### **Durchführung**

Die Zellen werden nach Erreichen der vollständigen Konfluenz wie unter 7.3.2 beschrieben trypsinisiert und in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellesuspension wird für 5 min bei 300 g zentrifugiert und das Zellpellet wird in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wird in einem mit Isopropanol gefüllten *Mister Frosty Freezing Container* über Nacht im Biofreezer auf – 80 °C heruntergekühlt. Die Lagerung der Zellen erfolgt bei – 80 °C im Biofreezer.

## **7.4 Primäre Rattenhepatozyten**

Die primären Rattenhepatozyten werden durch eine Collagenaseperfusion modifiziert nach Seglen (1976) aus der Leber von männlichen Wistar-Ratten (Gewicht ca. 180–230 g) isoliert. Für die durchgeführten Assay wurde darauf geachtet, dass die Zellvitalität nach der Isolierung der Zellen über 95 % lag.

### **7.4.1 Isolierung von primären Rattenhepatozyten**

#### **Chemikalien und Lösungen**

Lösung	Substanz	Menge
Heparin-Lösung	Heparin-Natriumsalz (H4784 Sigma Aldrich)	1.000 U/ml in 0,9 % NaCl-Lösung
	Lagerung bei + 4 °C; sterilfiltriert	
Pentobarbital-Lösung (Priest und Geisbuhler, 2015)	Natriumpentobarbital	5 g
	Propylenglycol	40 ml
	Ethanol	10 ml
	Wasser	50 ml
HEPES	HEPES	23,83 g (1 M)
	pH = 7,4; sterilfiltriert; Lagerung bei + 4 °C	ad 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
EGTA	EGTA	3,80 g (100 mM)
	sterilfiltriert; Lagerung bei + 4 °C	ad 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
BSA (30 %)	BSA	30 g
	sterilfiltriert; Lagerung bei + 4 °C	ad 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Perfusionspuffer-Stammlösung (10x)	NaCl	81,82 g (1,4 M)
	KCl	3,73 g (50 mM)
	MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	1,63 g (8 mM)
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,85 g (20 mM)
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,544 g (4 mM)
	pH = 7,4; Lagerung bei + 4 °C	ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Perfusionsmedium I	HBSS	500 ml
	HEPES (1 M)	5 ml (10 mM)
	EGTA (100 mM)	500 µl (0,1 mM)
Perfusionsmedium II	DMEM Ig mit Phenolrot	500 ml
	HEPES (1 M)	5 ml (10 mM)
	Collagenase	

## 7 Material und Methoden

Lösung	Substanz	Menge
Waschpuffer	DMEM Ig ohne Phenolrot	500 ml
	BSA (30 %)	3,5 ml
	HEPES (1 M)	5,2 ml
	Pen/Strep	5,2 ml
Percoll-Lösung	Percoll® (GE Healthcare/Sigma Aldrich)	27,8 ml
	Perfusionspuffer-Stammlösung (10x)	4,2 ml
	sterilfiltriert; Lagerung bei + 4 °C	
Kollagenase	100 CDU/ml	Einwaage je nach angegebener Aktivität der Charge

### Durchführung

Die Ratte wird durch eine i. p. Injektion von 200 µl Pentobarbital-Lösung/100 g KG (Dosis: 100 mg/kg KG) betäubt und die Narkose durch den Bauchdecken-Schwanz-Reflex überprüft. Das Abdomen der Ratte wird geöffnet und die Leber freigelegt. In die untere Hohlvene (*vena cava inferior*) wird 100 µl Heparin-Lösung injiziert. In die Pfortader (*vena porta hepatica*) wird eine Braunüle gelegt, welche mit einer Ligatur und Klemme fixiert wird. Die Leber wird mit Perfusionsmedium I entblutet (Flussrate 40 ml/min), wobei die Hohlvene durchtrennt wird. Nach dem Entbluten der Leber wird das Zwerchfell geöffnet und die Hohlvene mittels einer Ligatur verschlossen. Der rechte Vorhof des Herzens wird eingeschnitten und eine Braunüle eingeführt. Die Leber wird für 5–10 min mit einer Durchflussrate von 40 ml/min rezirkulierend perfundiert. Nach beendeter Perfusion wird die Leber herauspräpariert, die Leberkapsel unter der Sicherheitswerkbank über einem Nylonnetz mit einer Maschenweite von 250 µm geöffnet und die Zellen mit Waschpuffer (insgesamt 200 ml) herausgeschwemmt. Die Zellen werden über ein weiteres Nylonnetz mit einer Maschenweite von 100 µm filtriert und anschließend bei 18 g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, die Zellpellets mit Waschpuffer resuspendiert und bei 18 g für 3 min zentrifugiert. Dieser Schritt wird mit einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 30 g wiederholt. Die Zellpellets werden in einem Zentrifugationsröhrchen in 6 ml Waschpuffer vereinigt und mit 32 ml Percoll-Lösung versetzt. Nach Invertieren wird die Zellsuspension bei 840 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 20 ml Waschpuffer resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl wird die Zellsuspension 1:100 mit Waschpuffer verdünnt und 10 µl der verdünnten Zellsuspension mit 190 µl Trypanblau angefärbt. Die angefärbte Zellsuspension wird in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer mittels Trypanblau-Ausschlusstest ausgezählt. Die Zellzahl berechnet sich wie folgt:

## 7 Material und Methoden

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{GZ} \cdot 80 \cdot 1000 \cdot \text{VF}}{16}$$

mit:	GZ	Mittelwert Gesamtzellzahl (ausgezählt 3 Großquadrate)
	80;16	Faktoren Zählkammer
	1000	Umrechnung µl in ml
	VF	Verdünnungsfaktor (2.000)

Zusätzlich wird neben der Zellzahl der Vitalitätsfaktor bestimmt:

$$\text{Vitalitätsfaktor} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{\text{Anzahl lebender Zellen} + \text{Anzahl toter Zellen}}$$

### **7.4.2 Kultivierung von primären Rattenhepatozyten**

#### **Chemikalien und Lösungen**

Lösung	Substanz	Menge
Kollagen-Lösung	Kollagen (aus Rattenschwänzen)	62,5 µg/ml in 0,1 % Essigsäure
	Lagerung bei + 4 °C	
FKS	ThermoFisher Scientific	
Pen/Strep	Penicillin	10.000 u/ml
(Fertiglösung Sigma-Aldrich Bestellnummer P4333)	Streptomycin	10 mg/ml
Kulturmedium	DMEM Ig	500 ml
	FKS	56 ml
	Pen/Strep	5,6 ml

#### **Durchführung**

Vor dem Aussäen der Zellen werden die verwendeten Zellkulturschalen und Wellplatten kollageniert. Die kollagenierten Platten werden über Nacht unter der Sicherheitswerkbank bei angeschaltetem UV-Licht getrocknet.

Die gewünschte Zelledichte wird durch Verdünnen der Zellsuspension mit Kulturmedium eingestellt. Die Zellen werden unter Standardbedingungen im Brutschrank kultiviert. Nach einer Anwachszeit von 4 h wird das Kulturmedium gewechselt und die Zellen inkubiert.

### **7.5 Resazurin-Reduktionstest**

Der Resazurin-Reduktionstest, auch Alamar Blue Assay, ist eine einfache, sensitive, schnelle und kosteneffiziente Methode zur Testung der Zellproliferation und Zytotoxizität *in vitro*. Dabei ist der Test in Bakterien, Zelllinien und primären Zellen anwendbar. Der Assay kann zum einen zur Endpunktbestimmung und zum anderen zur Messung von Kinetiken genutzt werden. Da Resazurin

nicht toxisch ist, können die Zellen für weitere Assays eingesetzt werden. (O'Brien et al., 2000; Nociari et al., 1998; Ahmed et al., 1994)

Das Prinzip des Resazurin-Reduktionstests basiert auf der Reduktion von Resazurin (blau, nicht fluoreszierend) zu Resorufin (pink, fluoreszierend) durch vitale Zellen (siehe Abbildung 44). Die Zellmembranen sind permeabel für Resazurin. In der Zelle kann Resazurin durch NADPH, NADH, FADH und FMNH reduziert werden. Außerdem können verschiedene Enzyme, die in den Mitochondrien oder im Zytosol lokalisiert sind, Resazurin reduzieren. Die Reduktion von Resazurin korreliert mit der Zellzahl bzw. der Zellproliferation. Durch weitere Reduktion des Resorufin entsteht Dihydroresorufin, welches farblos ist. Die Messung kann fluorometrisch oder kolorimetrisch erfolgen, wobei die fluorometrische Messung sensitiver ist. (O'Brien et al., 2000; Rampersad, 2012)

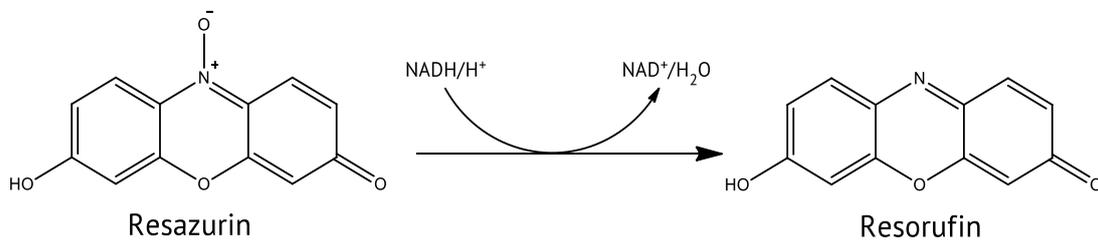


Abbildung 44: Reduktion von Resazurin zu Resorufin in Zellen unter Verbrauch von NADH/H<sup>+</sup>; modifiziert nach O'Brien et al. (2000)

Untersuchungen zeigten, dass Resazurin auch mit Bestandteilen des Mediums reagieren kann, wobei sich das fluoreszierende Resorufin bildet. Diese Reaktion ist zeitabhängig und abhängig von dem verwendeten Medium. Um die Ergebnisse des Assay nicht zu verfälschen, sollte daher immer eine Kontrolle ohne Zellen (Leerwert) mitgeführt werden, deren Fluoreszenz von der Fluoreszenz der Wells abgezogen wird, die Zellen enthalten. (Munshi et al., 2014)

Der Assay wurde zur Bestimmung der Zytotoxizität von Estragol in pRH sowie den verwendeten Zelllinien durchgeführt. Neben der Bestimmung der Zytotoxizität sollte der Konzentrationsbereich für die weiteren Assays bestimmt werden.

**Chemikalien und Lösungen**

Lösung	Substanz	Menge
Resazurin-Stammlösung	Resazurin-Natriumsalz	110,5 mg (440 mM)
	Dimethylformamid	1 ml
	Lagerung bei + 4 °C; max. 7 Tage	
NaCl/P <sub>i</sub> -Puffer	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,144 g (1,1 mM)
	NaCl	9 g (154 mM)
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,595 g (3,7 mM)
	Lagerung bei + 4 °C	ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Resazurin- NaCl/P <sub>i</sub> -Lösung	Resazurin-Stammlösung	1 ml
	NaCl/P <sub>i</sub> -Puffer	1.000 ml
	440 µM Resazurin; Lagerung bei + 4 °C; max. 4 Wochen	
Resazurin-Arbeitslösung	Resazurin- NaCl/P <sub>i</sub> -Lösung	3 ml
	DMEM Ig	27 ml
	44 µM Resazurin	
	Herstellung unmittelbar vor Gebrauch	
PBS	NaCl	8,006 g (137 mM)
	KCl	0,201 g (2,7 mM)
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,923 g (6,5 mM)
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,204 g (1,5 mM)
	pH = 7,4; Lagerung bei RT	ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Saponin-Lösung	Saponin	100 mg (10%)
	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	1 ml

**Durchführung**

Bei allen Arbeiten mit Resazurin ist darauf zu achten, dass unter lichtgeschützten Bedingungen gearbeitet wird.

Die Zellen werden in 24-Well-Platten bzw. 48-Well-Platten mit den in Tabelle 35 aufgeführten Zelldichten ausgesät und im Brutschrank unter Standardbedingungen kultiviert. Nach einer Anwachszeit von 4 h für pRH und 24 h für Zelllinien wird das Kulturmedium gewechselt und die Zellen werden mit den Testsubstanzen in Duplikaten (24-Well-Platte) oder Triplikaten (48-Well-Platte) inkubiert. Zusätzlich wird eine Positivkontrolle mit Saponin (0,1 % Endkonzentration), eine Mediumkontrolle, eine Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) sowie ein Leerwert (Wells ohne Zellen) mitgeführt. Nach beendeter Inkubationszeit wird das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen

## 7 Material und Methoden

mit 1 ml PBS gewaschen und mit 1 ml Resazurin-Arbeitslösung inkubiert. Nach Inkubation der Zellen im Brutschrank (pRH: 90 min; Zelllinien: 60 min) unter Standardbedingungen werden die Platten im Fluoroskan bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm vermessen.

Tabelle 38: Aussaatdichte verschiedener Zellsysteme für Resazurin-Reduktionstest

Zellsystem	Inkubationszeit	Plattenformat	Zellzahl
primäre Rattenhepatozyten	24 h	24 Well	200.000 Z/ml
HepG2-Zellen	24 h	24-Well	150.000 Z/ml
	24 h + 72 h	24-Well	80.000 Z/ml
HepG2-CYP1A2-Zellen	24 h	48 Well	80.000 Z/0,5 ml
	24 h + 72 h	48 Well	50.000 Z/0,5 ml
V79-Zellen	24 h	24-Well	50.000 Z/ml
	24 h + 18 h	24-Well	25.000 Z/ml

Die Zellvitalität wird auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen und berechnet sich wie folgt:

$$V(\%) = \frac{M_P - M_{LW}}{M_{LK} - M_{LW}}$$

mit

Messwert Testsubstanz

Messwert Leerwert

Messwert Lösungsmittelkontrolle

### **7.6 Mikrokerntest**

Bei dem Mikrokerntest handelt es sich um eine Methode zur Detektion von DNA-Schädigung und genotoxischen Effekten in eukaryotischen Zellen. Der Assay kann *in vitro*, *in vivo* und *ex vivo* durchgeführt werden. Voraussetzung für die Anwendung des Mikrokerntest ist, dass die Zellen sich teilen können. Bei Mikrokerneln handelt es sich um chromatinhaltige DNA-Fragmente, die neben dem Zellkern der Zelle auftreten. Dabei sind Mikrokerne ebenfalls von einer Membran umgeben. Beim Mikrokerntest werden zum einen der Verlust ganzer Chromosomen (aneugener Effekt) und Chromosomenbruchstücke (klastogener Effekt) detektiert. Chromosomenbruchstücke führen zu azentrischen Chromosomenfragmenten, weshalb über die Anfärbung des Zentromer zwischen den beiden Effekten unterschieden werden kann. (Kirsch-Volders et al., 1997; Jiang et al., 2019; Fenech; Fenech, 2000)

Als Positivkontrolle für den Mikrokerntest wurde Mitomycin C (MMC) eingesetzt. MMC führt unter anderem zu DNA-Addukten und *Crosslinks* zwischen den komplementären DNA-Strängen oder innerhalb eines DNA-Strangs. Zuvor muss MMC durch Reduktion metabolisch aktiviert werden. (Kumar et al., 1997; Bargonetti et al., 2010)

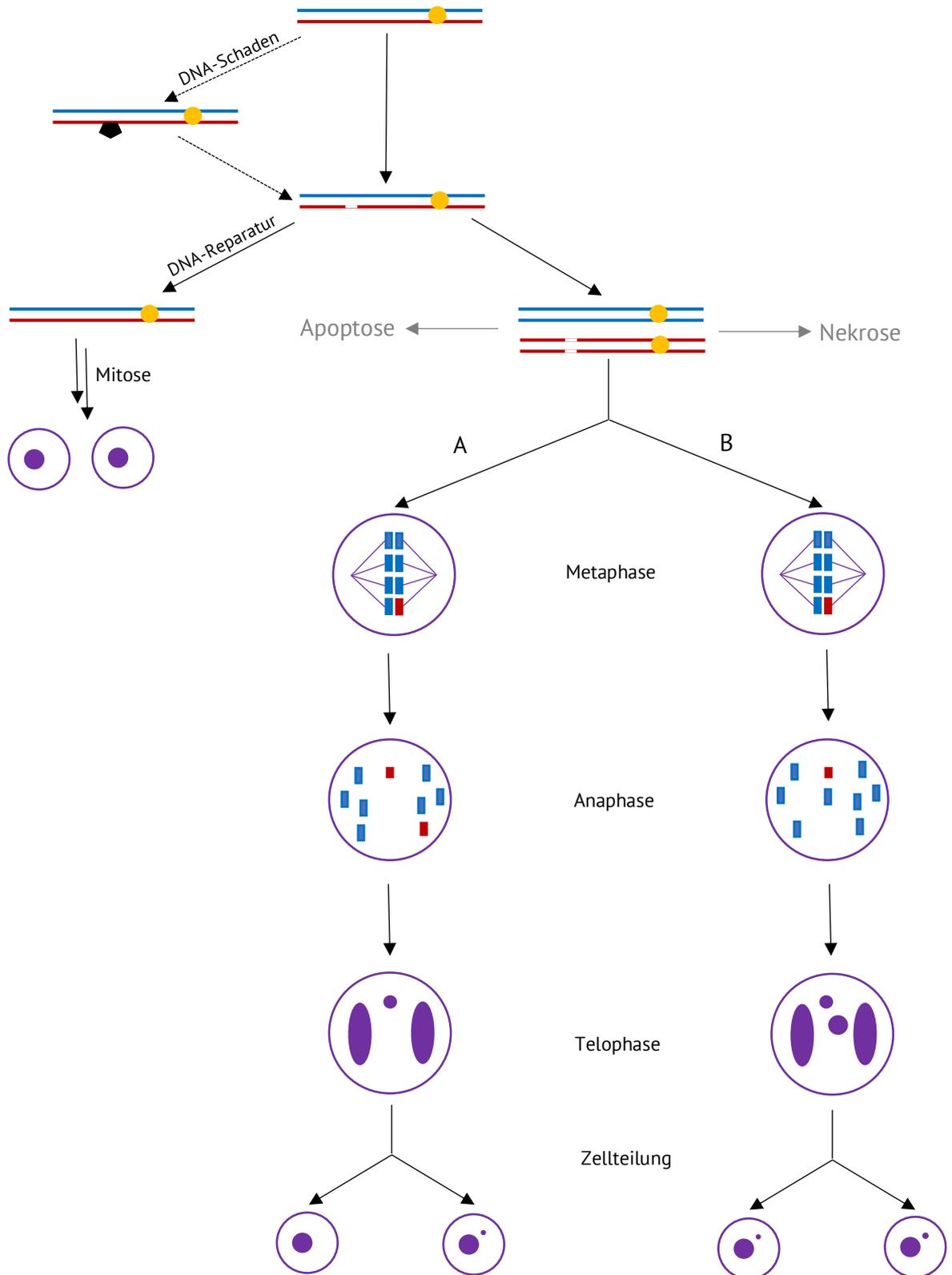


Abbildung 45: Schematischer Ablauf der Bildung von Mikrokernen. A: Bildung eines azentrischen Chromosomenfragment, B: Bildung eines azentrischen Chromosomenfragment sowie ganzen Chromosoms (Jiang et al., 2019; Fenech, 2008)

## 7 Material und Methoden

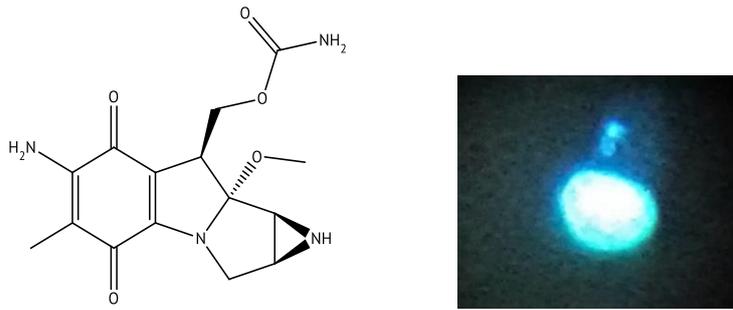


Abbildung 46: Struktur MMC (Kumar et al., 1997) (links) und Beispiele für gebildete Mikrokerne (rechts)

### Chemikalien und Lösungen

Lösung	Substanz	Menge
Färbepuffer	Tris	1,2114 g (100 mM)
	NaCl	0,8766 g (150 mM)
	CaCl <sub>2</sub>	11,1 mg (1 mM)
	MgCl <sub>2</sub>	10,6 mg (1 mM)
	Nonident P-40	0,1 %
	pH = 7,4; Lagerung bei + 4 °C	ad 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
DAPI-Stammlösung	DAPI	10 mg (16,5 mM)
		Lagerung bei + 4 °C; lichtgeschützt
DAPI-Färbelösung	Färbepuffer	750 µl
	DAPI-Stammlösung	2,25 µl
PBS	NaCl	8,006 g (137 mM)
	KCl	0,201 g (2,7 mM)
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,923 g (6,5 mM)
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,204 g (1,5 mM)
		pH = 7,4; Lagerung bei RT
Trypsin (Fertiglösung Sigma-Aldrich, Bestellnummer T4049)	Tyrosin	2,5 g/l
	EDTA	0,2 g/l EDTA
		in HBSS mit Phenylrot
Ethanol (p.a.)		100 %
0,5 mM MMC	MMC	167 µg
	DMSO	1 ml
	Lagerung bei + 4 °C	

**Durchführung**

Die HepG2- bzw. HepG2-CYP1A2-Zellen werden in 60 mm Gewebekulturschalen (700.000 Zellen/2 ml) ausgesät und nach einer Anwachszeit von 24 h wird das Kulturmedium gewechselt. Die Zellen werden für 24 h mit den Testsubstanzen und 0,5 µM MMC als Positivkontrolle inkubiert. Nach weiteren 24 h Inkubation werden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und 2 ml frischen Kulturmedium zugesetzt. Nach 72 h Kultivierung werden die Zellen mit 300 µl Trypsin 15 min unter Standardbedingung im Brutschrank inkubiert und die Trypsin-Reaktion mit 700 µl Kulturmedium abgestoppt. Nach dem Vereinzeln der Zellen wird die Zellsuspension bei 500 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 1 ml PBS resuspendiert und in 3 ml eisgekühlten Ethanol gegeben und gevortext. Nach mind. 30 min Inkubation bei - 20 °C wird die Suspension bei 1.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet bei - 20 °C bis zum Auszählen gelagert.

Zum Auszählen wird das Zellpellet in 750 µl DAPI-Färbelösung resuspendiert und gevortext. Die Suspension wird unter Lichtausschluss für 15 min inkubiert. 10 µl der Suspension werden auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas (50 x 24 mm) abgedeckt. Nachdem ein Tropfen Immersionsöl auf das Deckglas gegeben wurde, werden 1.000 Zellkerne bei 64facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Das Ergebnis wird in Mikrokernen pro 1.000 Zellen angegeben.

Für die Mikrokern wurden folgende Kriterien angewendet (OECD, 2016):

- maximal 1/3 des Zellkerndurchmesser
- Farbintensität des Mikrokern ist geringer als die des Zellkerns
- Mikrokern ist einem Zellkern zuzuordnen
- keine DNA-Brücke zum Zellkern
- gleiche Fokussierungsebene wie der Zellkern
- glatte und rund bzw. ovale Form

**7.7 Chloroform-Phenol-Extraktion****Chemikalien und Lösungen**

Lösung	Substanz	Menge
TAE-Puffer	Tris	4,844 g (40 mM)
	Na <sub>2</sub> EDTA	186 mg (500 µM)
	Essigsäure (100 %)	1,144 ml
	pH = 8,3; Lagerung bei + 4 °C	ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
SDS-Lösung (10 %)	SDS-Lösung (20 %)	20 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	20 ml
Triton-X-100-Lösung (10 %)	Triton-X-100	2 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	18 ml

## 7 Material und Methoden

Lösung	Substanz	Menge
Lysepuffer	TAE-Puffer	400 ml
	SDS-Lösung (10 %)	40 ml
	Triton-X-100-Lösung (10)	20 ml
Proteinase K	Proteinase K	10 mg
RNase	Lagerung bei – 20 °C	ad 1 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
	RNase	10 mg
	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	1 ml
Extraktionslösung I	Lagerung bei – 20 °C	
	Phenol	25 ml
	Chloroform	24 ml
Extraktionslösung II	Isoamylalkohol	1 ml
	Chloroform	24 ml
	Isoamylalkohol	1 ml
Natriumacetat-Lösung	Natriumacetat	24,6103 g (3 M)
Ethanol (100 %)		ad 1 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Ethanol (70 %)	Ethanol	35 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	15 ml
Isopropanol (100 %)		

### Durchführung

Nach beendeter Inkubation werden die Zellen mit PBS gewaschen, das PBS wird abgesaugt und die Platten werden bis zur weiteren Aufarbeitung bei – 80 °C gelagert.

Die Gewebekulturschalen werden auf Eis gelagert und die Zellen durch Zugabe von 800 µl Lysepuffers mithilfe eines Zellschabers geerntet. Die Zellsuspension wird in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, in welches 15 µl Proteinase K vorgelegt wurde. Dem Lysat werden 5 µl RNase zugesetzt und nach durchmischen wird das Lysat für 3–4 h auf 55 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird dem Lysat 800 µl Extraktionslösung I zugesetzt und 10 s gevortext. Die Lysate werden 10 min bei 4 °C und 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird 20 min bei Raumtemperatur mit 5 µl RNase-Lösung inkubiert und anschließend mit 700 µl Extraktionslösung II versetzt. Nach 10 s vortexen wird die Suspension für 10 min bei 4 °C und 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die DNA wird mit 1,2 ml kaltem Ethanol (100 %) gefällt. Nach Zentrifugation (10 min bei 4 °C und 13.000 g) wird das Pellet in 250 µl Wasser gelöst und mit 500 µl Isopropanol erneut gefällt. Das Pellet wird nach Zentrifugation (10 min bei 4 °C und 14.000 rpm) in 700 µl, 70 % Ethanol suspendiert und gevortext. Nach Zentrifugation (10 min bei 4 °C und 13.000 g) wird das Pellet in 50 µl Wasser gelöst. Die Proben werden bis zur weiteren Verwendung bei + 4 °C gelagert.

Der DNA-Gehalt wurde spektrometrisch bei einer Absorption von 260 nm mittels Nanodrop1000 bestimmt. Zusätzlich wurden die Verhältnisse der Wellenlängen 260 nm zu 280 nm und 260 nm

zu 230 nm bestimmt. Das Verhältnis 260 nm zu 280 nm gibt die Reinheit der DNA an, wobei 1,8 für reine DNA angenommen wird. Das Verhältnis von 260 nm zu 230 nm gibt Hinweise auf mögliche Proteinverunreinigungen. DNA-Proben wurden nur für die Hydrolyse eingesetzt, wenn das 260/280-Verhältnis zwischen 1,75 und 1,85 und das 260/230-Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0 lag.

## 7.8 Enzymatische DNA-Hydrolyse

### Chemikalien und Lösungen

Lösung	Substanz	Menge
BSA (0,1 %)	BSA	10 mg
		ad 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Storage buffer	Tris-HCl	157,6 mg (10 mM)
	KCl	372,6 mg (50 mM)
	MgCl <sub>2</sub>	9,52 mg (1 mM)
	ZnCl <sub>2</sub>	1,36 mg (0,1 mM)
	Glycerin	50 ml (50 %)
	pH = 8,4;	ad 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
	Lagerung bei + 4 °C	
Micrococcale Nuklease (MN)	Micrococcale Nuklease	1 U/5 µl
	Lagerung bei + 4 °C	ad 0,1 % BSA
Phosphodiesterase II (PDE)	Phosphodiesterase II	10 U/2 ml
	Lagerung bei – 20 °C	ad 2 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Alkalische Phosphatase (CIP)	Sigma-Aldrich (aus <i>calf intestine</i> )	10.000 U/ml
Alkalische Phosphatase	CIP (10.000 U/ml)	1 µl
10 mU/µl	Storage buffer	1 ml
Alkalische Phosphatase	CIP (10.000 U/ml)	100 µl
1 mU/µl	Storage buffer	900 µl
Puffer	Natriumsuccinat	1,6205 g (100 mM)
	CaCl <sub>2</sub>	0,5549 g (50 mM)
	pH = 8,4;	ad 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
	Lagerung bei + 4 °C	
TRIS Puffer	Tris	60,575 g (0,5 M)
	Lagerung bei – 20 °C	ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

Für die DNA-Hydrolyse wird der DNA-Gehalt auf 30 µg DNA/135 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> eingestellt, wobei jeder Probe 50 fmol der isotopenmarkierten Addukte <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>2</sup>dG und <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>6</sup>dA sowie 1 nmol <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-dG zugesetzt werden. Für die Hydrolyse werden folgende Volumina der übrigen Reagenzien eingesetzt:

## 7 Material und Methoden

Tabelle 39: eingesetzte Volumina von Enzymen und Puffern für DNA-Hydrolyse

Lösung	Volumen	Menge
Puffer	39 µl	
MN	7,95 µl	1,59 U
PDE	12,6 µl	63 U
TRIS Puffer	93 µl	
CIP	18 µl	10 mU

Die DNA-Proben werden mit Puffer, MN und PDE versetzt und für 24 h im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von TRIS-Puffer und CIP werden die Proben über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Die Proteine werden mit 500 µl Ethanol ausgefällt und abzentrifugiert (10 min, 22.000 g, 4 °C). Der Überstand wird in der Vakuumzentrifuge getrocknet und der Rückstand in 50 µl Methanol (LC-MS grade) aufgenommen. Die Proben werden zentrifugiert (10 min, 22.000 g, 4 °C) und der Überstand zur Messung eingesetzt.

Die Proben wurden mittels HPLC-ESI-MS/MS und SIVA vermessen. Zur Bestimmung der DNA-Adduktlevel wurde die Anzahl der Addukte auf  $10^8$  Nukleoside bezogen. Dazu wurde mittels UHPLC-ESI-MS/MS die Konzentration der DNA-Addukten E3'N<sup>6</sup>dA und E3'N<sup>2</sup>dG (Methode siehe Kapitel 7.9.2.3) und mittels HPLC-ESI-MS/MS die Konzentration der DNA-Base 2'-Desoxyguanosin (Methode siehe Kapitel 7.9.2.4) bestimmt. Für die Berechnung der Addukte/ $10^8$  Nukleoside wurde aus der Konzentration der Addukte sowie der Konzentration des 2'-Desoxyguanosin die Teilchenzahl berechnet. Nach der Berechnung der Teilchenzahl wird die die Anzahl der Addukte wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Addukte}}{10^8 \text{ Nukleoside}} = \frac{\text{Teilchenzahl (DNA-Addukt)} \cdot 0,22}{\text{Teilchenzahl (dG)}} \cdot 10^8$$

Der Faktor 0,22 wird für den spezifischen GC-Gehalt der DNA von Ratten mit einbezogen.

### **7.9 Analytische Methoden**

Bei allen im Folgenden beschriebenen Methoden handelt es sich um die finalen Methoden. Im Verlauf der Arbeit wurden, sowohl für die HPLC-UV/Vis-Methoden als auch für die HPLC-ESI-MS/MS-Methoden eine Vielzahl an Methoden eingesetzt, um eine optimale Trennung der Analyten zu erreichen. Bei der Optimierung kamen neben verschiedenen Gradienten auch unterschiedliche Säulen bzw. Fließmittel zum Einsatz.

Für die präparativen Trennungen wurden die Gradienten erst an einer analytischen HPLC optimiert und anschließend auf den präparativen Maßstab übertragen. Für jedes Trennproblem wurde die Methode vor der eigentlichen Trennung im präparativen Maßstab überprüft und gegebenenfalls optimiert. Außerdem diente die Überprüfung der Methode für die Festlegung der Sammelzeitpunkte für die Fraktionierung.

Bei der Entwicklung der Methode zur Bestimmung der DNA-Addukte wurden die substanzspezifischen Parameter jedes Analyten mittel *manual tuning* ermittelt. Das Lösungsmittel wurde entsprechend der erwarteten Lösungsmittelzusammensetzung bei der Retentionszeit angepasst. Die gerätespezifischen Parameter wurden mittels Fließinjektionsanalyse (FIA) ermittelt. Bei der Methodenentwicklung wurden die mittels FIA ermittelten Parameter so gewählt, dass die Sensitivität für E3'N<sup>6</sup>dA möglichst hoch ist, bei gleichzeitig hoher Sensitivität für E3'N<sup>2</sup>dG. Der Fokus auf die möglichst hohe Sensitivität des E3'N<sup>6</sup>dA wurde gelegt, da aus Vorversuchen bekannt war, dass E3'N<sup>6</sup>dA im Verhältnis zu E3'N<sup>2</sup>dG in geringerem Maße gebildet wird. Die Methode für die Bestimmung des dG-Gehaltes war bereits im Arbeitskreis Schrenk etabliert und nicht weiter optimiert.

### 7.9.1 HPLC Analytik

#### 7.9.1.1 Präparative HPLC

Die Reaktionsgemische der Synthesen für die Standards E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA sowie der jeweiligen Stabilisotopen-markierten Standards wurden mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die Trennungen wurde mit einer Agilent 1200 Series HPLC (Agilent Technologies, Kronberg, Deutschland) mit zwei präparativen Pumpen (G1361A), einem automatischen Fraktionensammler (G1364B) und einem *Multi-Wavelength*-Detektor (MWD, MWD G1315A) durchgeführt. Als Säule wurde eine RP18-Säule (VDSpher PUR C18-SE, 5 µm, 250 mm × 20 mm, VDS Optilab, Berlin, Germany) für alle Trennungen eingesetzt. Die weiteren Parameter sind in Tabelle 40 dargestellt. Für die Messungen und Auswertung wurde die Software ChemStation für LC-Systeme (Version B04.01, Agilent Technologies, Waldkirch, Deutschland) verwendet.

Tabelle 40: allgemeine Parameter für präparative HPLC

Fließmittel A	Wasser (ddH <sub>2</sub> O)
Fließmittel B	Methanol (HPLC grade) (MeOH) Acetonitril (HPLC grade) (MeCN)
UV/Vis-Detektion <sup>1)</sup> [ $\lambda$ ( $\lambda_{ref}$ )]	230 (360); 261 (360); 275 (360); 280 (360); 340 (360)
Säulentemperatur	Raumtemperatur
Injektionsvolumen	10 ml über Probenschliefe; Metall
Fraktionensammler	Tray mit 60 Vials (max. Volumen 36 ml)
Hinterkolbenspülung	Wasser:Isopropanol ( <i>p. a.</i> ), Verhältnis 9:1

<sup>1)</sup> Angabe der Wellenlänge  $\lambda$  und Referenzwellenlänge  $\lambda_{ref}$  in nm

Alle präparativen Gradienten sowie die Sammelzeitpunkte für die Fraktionierung sind in Tabelle 41 abgebildet. Bei der Aufreinigung von <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-E3'N<sup>2</sup>dG wurde das Reaktionsgemisch erst mit Gradient 1 aufgetrennt. Da die Produkt-enthaltenden Fraktionen der ersten Trennung Verunreinigungen enthielten, wurde die Fraktionen vereinigt und mit Hilfe des Gradient 2 in einem zweiten Schritt aufgereinigt.

## 7 Material und Methoden

Tabelle 41: verwendete Gradienten für die präparativen Trennungen

Gradient zur Aufreinigung der Synthese von E <sub>3</sub> 'N <sup>2</sup> dG									
Zeit [min]	0	3	5	50	55	60			
B (MeOH) [%]	40	40	40	90	90	40			
Flow [ml/min]	3	3	15	15	15	15			
Fraktionierung	<u>Reaktionsansatz mit 1'-Acetoxyestragnol:</u> Minute 16–26; Fraktionsbreite 0,25 min Minute 36–38,5; Fraktionsbreite 0,25 min <u>Reaktionsansatz mit 3'-Acetoxyisoestragnol:</u> Minute 19–28; Fraktionsbreite 0,25 min Minute 34–39; Fraktionsbreite 0,25 min								
Gradient zur Aufreinigung der Synthese von E <sub>3</sub> 'N <sup>6</sup> dA									
Zeit [min]	0	3	5	50	55	60			
B (MeOH) [%]	20	20	20	80	80	20			
Flow [ml/min]	3	3	15	15	15	15			
Fraktionierung	<u>Reaktionsansatz mit 1'-Acetoxyestragnol:</u> Minute 30–40; Fraktionsbreite 0,25 min Minute 48–50; Fraktionsbreite 0,5 min <u>Reaktionsansatz mit 3'-Acetoxyisoestragnol:</u> Minute 33–38; Fraktionsbreite 0,25 min Minute 40–44; Fraktionsbreite 0,25 min Minute 46–51; Fraktionsbreite 0,25 min								
Gradient 1 zur Aufreinigung der Synthese von <sup>15</sup> N <sub>5</sub> -E3'N <sup>2</sup> dG									
Zeit [min]	0	3	5	50	55	60			
B (MeOH) [%]	40	40	40	90	90	40			
Flow [ml/min]	3	3	15	15	15	15			
Fraktionierung	Minute 6-8; Fraktionsbreite 1 min Minute 18-26; Fraktionsbreite 0,5 min								
Gradient 2 zur Aufreinigung der Synthese von <sup>15</sup> N <sub>5</sub> -E3'N <sup>2</sup> dG									
Zeit [min]	0	15	65	70	75	76	86	87	100
B (MeCN) [%]	1	1	50	80	80	95	95	1	1
Flow [ml/min]	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Fraktionierung	Minute 42–46; Fraktionsbreite 1 min Minute 46–60; Fraktionsbreite 0,5 min Minute 60–70; Fraktionsbreite 1 min								
Gradient zur Aufreinigung der Synthese von <sup>15</sup> N <sub>5</sub> -E3'N <sup>6</sup> dA									
Zeit [min]	0	3	5	50	55	60			
B (MeOH) [%]	20	20	20	80	80	20			
Flow [ml/min]	3	3	15	15	15	15			
Fraktionierung	Minute 5-8; Fraktionsbreite 1 min Minute 36-45; Fraktionsbreite 0,5 min								

### 7.9.1.2 Analytische HPLC-HPLC-UV/Vis-Methoden

Für die analytischen Messungen wurden zwei HPLC-UV/Vis-Systeme verwendet. Zum einen wurde ein HPLC-System von Waters (Milford, USA) bestehend aus einer quaternären Pumpe (600 Controller) und einem Autosampler (717plus) verwendet. Als Detektor diente ein UV/Vis-Detektor der Firma Jasco (Detector (UV 975, Pfungstadt, Germany). Zur Steuerung des Systems kam die Software Clarity Lite Software (Version 5.05.98, DataApex, Prag, Tschechien) zum Einsatz. Die weiteren HPLC Parameter sind in Tabelle 42 dargestellt.

Tabelle 42: allgemeine Parameter für analytische HPLC-Methoden gemessen mit Waters HPLC-System

Fließmittel A	0,1 % Ameisensäure
Fließmittel B	Methanol (HPLC grade)
UV/Vis-Detektion <sup>1)</sup> [ $\lambda$ ( $\lambda_{\text{ref}}$ )]	275 (360)
Säulentemperatur	Raumtemperatur
Flow	1 ml/min
Injektionsvolumen	50 $\mu\text{l}$
Probengefäß	5 ml Probengefäß (Braunglas bzw. Weißglas) mit Gummiseptum, bei kleinen Probenvolumina 300 $\mu\text{l}$ Glasinsert

<sup>1)</sup> Angabe der Wellenlänge  $\lambda$  und Referenzwellenlänge  $\lambda_{\text{ref}}$  in nm

Als zweites analytisches HPLC-System wurde eine Agilent 1200 Series HPLC (Agilent Technologies, Kronberg, Deutschland) mit einem Degasser (G1322A), einer quaternären Pumpe (G1311A), einem Autosampler (G1329A), einem Säulenofen (G1316A) und einen Diodenarray-Detektor (DAD, DAD G1315A) eingesetzt. Für die Messungen und Auswertung wurde die Software ChemStation für LC-Systeme (Version B04.01, Agilent Technologies, Waldkirch, Deutschland) verwendet. Die weiteren Parameter sind in Tabelle 43 dargestellt.

Tabelle 43 allgemeine Parameter für HPLC-Methoden gemessen mit Agilent Series 1200 System

Fließmittel A	0,1 % Ameisensäure
Fließmittel B	Methanol (HPLC grade)
Fließmittel C	Acetonitril (HPLC grade)
Hinterkolbenspülung	Wasser:Isopropanol ( <i>p. a.</i> ); Verhältnis 9:1 periodisch alle 40 min für 0,1 min
UV/Vis-Detektion <sup>1)</sup> [ $\lambda$ ( $\lambda_{\text{ref}}$ )]	230 (360); 261 (360); 275 (360); 310 (450); 340 (450)
Säulentemperatur	a) 30 °C b) 25 °C
Flow	a) 750 $\mu\text{l}/\text{ml}$ b) 1 ml/min
Injektionsvolumen	50 $\mu\text{l}$
Probengefäß	1,5 ml Braunglas Vial mit Gummiseptum und bei kleinen Probenvolumina 200 $\mu\text{l}$ Glasinsert

<sup>1)</sup> Angabe der Wellenlänge  $\lambda$  und Referenzwellenlänge  $\lambda_{\text{ref}}$  in nm

## 7 Material und Methoden

Für alle HPLC-UV/Vis-Methoden wurde eine RP18-Säule (LiChrospher®, 5 µm, 125,0 mm×4,0 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland) mit entsprechender Vorsäule (RP18, LiChrospher®, 5 µm, 4,0 mm×4,0 mm, Merck, Darmstadt, Germany) verwendet. Die verwendeten HPLC-Gradienten sind in Tabelle 44 abgebildet.

Tabelle 44: verwendete Gradienten für analytische Trennung mit Waters HPLC-System und Agilent 1200 Series HPLC-System

Zeitverläufe der Reaktion von dT/dC (Waters-HPLC-System)									
Zeit [min]	0	1	20	25	25,1	30	30,1	40	
B (MeOH) [%]	1	1	70	70	95	95	1	1	
Konzentrationsbestimmung von <sup>15</sup> N <sub>5</sub> -E3'N <sup>6</sup> dA (Waters-HPLC-System)									
Zeit [min]	0	1	20	25	25,1	30	30,1	40	
B (MeOH) [%]	1	1	70	70	95	95	1	1	
Zeitverläufe der Reaktion von dG/dA (Agilent Series 1200-HPLC-System) <sup>a)</sup>									
Zeit [min]	0	1	20	25	25,1	30	30,1	40	
B (MeOH) [%]	1	1	70	70	95	95	1	1	
Konzentrationsbestimmung von <sup>15</sup> N <sub>5</sub> -3'N <sup>2</sup> dG (Agilent Series 1200 HPLC-System) <sup>b)</sup>									
Zeit [min]	0	5	20	21	24	29	34	34,1	40
B (MeOH) [%]	1	1	50	80	80	85	85	1	1

a) Säulentemperatur 30 °C, Flow 750 µl/min, b) Säulentemperatur 25 °C, Flow 1 ml/min

### 7.9.2 HPLC-ESI-MS/MS

#### 7.9.2.1 Überprüfung der Reaktionsgemische

Die Reaktionsgemische wurden mittels HPLC-ESI-MS/MS überprüft. Das HPLC-System bestand aus einem Agilent 1100 System (Agilent Technologies, Kronberg, Deutschland) welches sich aus einem Degasser (6133A), einer quaternären Pumpe (G1311A), einem Autosampler (G1313A) und einem Säulenofen (G1316A) zusammensetzte. Als Säule diente eine RP18-Säule (LiChrospher®, 5 µm, 4,0 mm×125 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland) mit entsprechender Vorsäule (LiChrospher®, 5 µm, 4,0 mm×4,0 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland). Alle weiteren Parameter sind in Tabelle 45 dargestellt.

Die HPLC wurde gekoppelt mit einem TripleQuad-Massenspektrometer API2000 (AB Sciex, Framingham, USA). Für die Messung wurde die Software Analyst Software 1.4.2 (Applied Biosystem, MDS Sciex, USA) verwendet.

Zur Überprüfung der Reaktionsgemische für die Synthesen der DNA-Addukte E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA sowie der Reaktionsgemische mit den Basen dT und dC wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Außerdem wurden die relevanten Fraktionen nach präparativer Trennung der Reaktionsgemische von dG bzw. dA mit beiden reaktiven Vorstufen mit Hilfe dieser Methoden vermessen. Die HPLC-Methode (siehe Tabelle 45) wurde bei der Durchführung der unterschiedlichen HPLC-ESI-MS/MS Experimente nicht variiert.

## 7 Material und Methoden

Tabelle 45: Geräteeinstellungen für die HPLC zur Überprüfung der Reaktionsmischungen mittels HPLC-ESI-MS/MS Methoden

Fließmittel A	0,1 % Ameisensäure	
Fließmittel B	Methanol (HPLC grade)	
Hinterkolbenspülung	Wasser:Isopropanol ( <i>p. a.</i> ), Verhältnis 9:1 konstanter Durchfluss	
Säulentemperatur	20°C	
Flow	750 µl/ml	
Injektionsvolumen	10 µl	
Probengefäß	1,5 ml Braunglas Vial mit Gummiseptum, bei kleinen Probenvolumina 200 µl Glasinsert	
Einstellung Valco Valve	0 min A; 5 min B; 28 min A	
Gradient	0,0 min	1 % B
	1,0 min	1 % B
	20,0 min	70 % B
	25,0 min	70 % B
	25,1 min	95 % B
	30,0 min	95 % B
	30,1 min	1 % B
	40,0 min	1 % B

Alle Reaktionsmischungen wurden mittels Q1-Scan im positiven Messmodus überprüft. Für alle Reaktionsgemische und Fraktionen wurden folgende MS-Parameter verwendet:

Tabelle 46: gerätespezifischen Parament für die Messungen der Q1-Scans der Reaktionsansätze

Massenbereich	50,00–600,00 Da
<i>curtain gas</i> (CUR)	20 psi
<i>ion spray voltage</i> (IS)	4200 V
<i>ion source temperature</i> (TEM)	400 °C
<i>nebulizer gas</i> (GS1)	30 psi
<i>heater gas</i> (GS2)	35 psi
<i>declustering potential</i> (DP)	60 V
<i>focussing potential</i> (FP)	400 V
<i>entrance potential</i> (EP)	5 V

Um mögliche DNA-Addukte zu identifizieren wurden zudem *Neutral-Loss*-Experimente durchgeführt. Ein Neutralverlust von 116 entspricht dem Verlust der Desoxyribose und ist typisch für DNA-Basen und die vermuteten DNA-Addukte. Mit dieser Methode wurden alle Reaktionsansätze im positiven Messmodus überprüft. Die MS-Parameter sind in Tabelle 47 dargestellt.

## 7 Material und Methoden

Tabelle 47: MS-Parameter für die Überprüfung der Reaktionsansätze mittels *Neutral Loss*-Experimente

Neutralverlust	116,00 Da
Massenbereich für Precursorion	150,000–600,00 Da
<i>curtain gas</i> (CUR)	20 psi
<i>ion spray voltage</i> (IS)	4200 V
<i>ion source temperature</i> (TEM)	400 °C
<i>nebulizer gas</i> (GS1)	30 psi
<i>heater gas</i> (GS2)	35 psi
<i>collisionally activated dissociation</i> (CAD)	2 psi
<i>declustering potential</i> (DP)	60 V
<i>focussing potential</i> (FP)	400 V
<i>entrance potential</i> (EP)	5 V
<i>collision energy</i> (CE)	30 V
<i>cell exit potential</i> (CXP)	15 V

Die Syntheseansätze für die Synthese von E3'N<sup>2</sup>dG und E3'N<sup>6</sup>dA wurden zusätzlich mittels PIS vermessen. Als Precursorion wurden die aus dem Q1-Scan und den *Neutral-Loss*-Experimenten identifizierten *m/z*-Verhältnisse gewählt, die auf gebildete DNA-Addukte hinweisen. Alle weiteren Parameter sind in Tabelle 48 dargestellt.

Tabelle 48: MS-Parameter für die Messungen im PIS Modus

	E3'N <sup>2</sup> dG	E3'N <sup>6</sup> dA
Precursorion	414,16	398,18
Massenbereich (Fragmente)	50,00–420,00	50,00–400,00
<i>curtain gas</i> (CUR)	20 psi	20 psi
<i>ion spray voltage</i> (IS)	4200 V	4200 V
<i>ion source temperature</i> (TEM)	400 °C	400 °C
<i>nebulizer gas</i> (GS1)	30 psi	30 psi
<i>heater gas</i> (GS2)	35 psi	35 psi
<i>collisionally activated dissociation</i> (CAD)	2 psi	2 psi
<i>declustering potential</i> (DP)	60 V	60 V
<i>focussing potential</i> (FP)	400 V	400 V
<i>entrance potential</i> (EP)	5 V	5 V
<i>collision cell entrance potential</i> (CEP)	18,88 V	18,88 V
<i>collision energy</i> (CE)	30 V	30 V
<i>cell exit potential</i> (CXP)	15 V	15 V

### 7.9.2.2 Quantifizierung der DNA-Addukte

Die Quantifizierung der DNA-Addukte erfolgt mittels HPLC-ESI-MS/MS Analytik. Das HPLC System bestehend aus einem Agilent 1290 UHPLC-System (Agilent Technologies, Kronberg, Deutschland) welches sich aus einem Degasser (6133A), einer binären Pumpe (G4220A), einem Autosampler (G1316C) und einem Säulenofen (G1316C) zusammensetzt. Als Säule wurde eine UHPLC-Säule mit RP18-Phase (U-VDSpher PUR C18-E 1,8 µm; 50×4,6 mm) mit entsprechender Vorsäule (PUR C-18-E, 1,8 µm 5×4 mm) verwendet. Alle weiteren Parameter sind in Tabelle 49 dargestellt.

## 7 Material und Methoden

Die HPLC wurde gekoppelt mit einem Sciex QTrap 5500 MS Massenspektrometer (AB Sciex, Framingham, USA). Für die Messung wurde die Software Analyst 1.7.0 (Applied Biosystem, MDS Sciex, USA) und für die Auswertung die Software Multiquant Software 1.7.1 (Applied Biosystem, MDS Sciex, USA) verwendet. Die Ionisation erfolgt mittels Elektrospray-Ionisation im positiven Modus (ESI), die Messung im *Multiplie Reaktion Monitoring* (MRM). Die gerätespezifischen Parameter sind in Tabelle 49 dargestellt, die substanzspezifischen Parameter in Tabelle 50.

Tabelle 49: Parameter für HPLC-Methode und gerätespezifische Parameter der MS für die Quantifizierung der DNA-Addukte

Fließmittel A	0,1 % Essigsäure (LC-MS Grade)	
Fließmittel B	Methanol (LC-MS Grade) mit 0,1 % Essigsäure (LC-MS Grade)	
Hinterkolbenspülung	Wasser:Isopropanol ( <i>p. a.</i> ), Verhältnis 9:1 Periodisch alle 20 min 0,1 min	
Needle Wash	Acetonitril (LC-MS Grade):Isopropanol ( <i>p. a.</i> ) Verhältnis 1:1, mit 0,1% Essigsäure (LC-MS Grade) Periodisch alle 40 min für 0,1 min	
Säulentemperatur	25 °C	
Flow	800 µl/min	
Injektionsvolumen	5 µl	
Probengefäß	1,5 ml Braunglas Vial mit Gummiseptum und 200 µl Glasinsert	
Gradient	0 min	10 % B
	1 min	10 % B
	1,2 min	50 % B
	4,3 min	90 % B
	4,31 min	95 % B
	6 min	95 % B
	6,01 min	10 % B
	8 min	10 % B
Gerätespezifische Parameter QTrap 5500	CUR	45 psi
	IS	5000 V
	TEM	500 °C
	GS1	55 psi
	GS2	50 psi
	CAD	Medium
	<i>dwell time</i>	50 ms

CUR: *curtain gas*, IS: *ion spray voltage*, TEM: *ion source temperature*, GS1: *nebulizer gas*, GS2: *heater gas*, CAD: *collisionally activated dissociation*

Tabelle 50: substanzspezifische Parameter für die Bestimmung von dG und den DNA-Addukte

	Q1	Q3	DP	EP	CEP	CE	CXP
dG	268,13	152,10	26	6	16	19	4
	268,13	135,10	26	6	16	47	4
	268,13	19,90	26	6	16	49	4
<sup>15</sup> N <sub>5</sub> -dG	273,08	157,20	86	5	18	17	4
	273,08	139,10	86	5	18	47	4
	273,08	113,10	86	5	18	49	4
E3'N <sup>2</sup> dG	414,143	298,100	101	10	-	15	16
	414,143	164,000	101	10	-	41	14
<sup>15</sup> N <sub>5</sub> -E3'N <sup>2</sup> dG	419,051	303,100	46	10	-	33	12
	419,051	147,000	46	10	-	21	16
E3'N <sup>6</sup> dA	398,132	147,000	76	10	-	33	12
	398,132	282,100	76	10	-	21	16
<sup>15</sup> N <sub>5</sub> -E3'N <sup>6</sup> dA	403,227	147,200	61	10	-	37	4
	403,227	287,200	61	10	-	21	24

Q1: Quadrupol 1 [m/z]; Q2: Quadrupol 3 [m/z]; DP: *declustering potential* [V]; FP: *focussing potential* [V]; EP: *entrance potential* [V]; CEP: *collision cell entrance potential* [V]; CE: *collision energy* [V]; CXP: *cell exit potential* [V]

### 7.9.2.3 Quantifizierung 2'-Desoxyguanosin-Gehalt

Die Quantifizierung des 2'-Desoxyguanosin erfolgte mittels HPLC-ESI-MS/MS Analytik. Das HPLC-System bestand aus einer Agilent 1200 HPLC (Agilent Technologies, Kronberg, Deutschland), welche sich aus einem Degasser (6133A), einer binären Pumpe (G1213B), einem Autosampler (G1367C) und einem Säulenofen (G1316B) zusammensetzte. Als Säule wurde eine RP18-Säule (LiChrospher®, 5µm, 4,0 mm×125 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland) mit entsprechender Vorsäule (LiChrospher®, 5 µm, 4,0 mm×4,0 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Alle weiteren Parameter sind in Tabelle 51 dargestellt.

Die HPLC wurde gekoppelt mit einem TripleQuad-Massenspektrometer API3200 (AB Sciex, Framingham, USA). Für die Messung wurde die Software Analyst Software 1.6.1 (Applied Biosystem, MDS Sciex, USA) und für die Auswertung die Software Multiquant Software (Applied Biosystem, MDS Sciex, USA) verwendet. Die Ionisation erfolgte mit einer Elektrospray-Ionisation im positiven Modus (ESI), die Messung im *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Die gerätespezifischen Parameter sind Tabelle 51 und die substanzspezifischen Parameter in Tabelle 50.

## 7 Material und Methoden

Tabelle 51: Gradient und gerätespezifische Parameter zu Bestimmung des dG-Gehalt

Fließmittel A	0,1 % Ameisensäure	
Fließmittel B	Methanol (HPLC Grade)	
Hinterkolbenspülung	Wasser:Isopropanol ( <i>p. a.</i> ), Verhältnis 9:1 periodisch alle 40 min für 0,1 min	
Säulentemperatur	20 °C	
Flow	700 µl/min	
Injektionsvolumen	2,5 µl	
Probengefäß	1,5 ml Braunglas Vial mit Gummiseptum und 200 µl Glasinsert	
Gradient	0 min	1 % B
	7 min	70 % B
	12 min	70 % B
	12,1 min	95 % B
	17 min	95 % B
	17,1 min	1 % B
	20 min	1 % B
Gerätespezifische Parameter API3200	CUR	50 psi
	IS	4500 V
	TEM	450 °C
	GS1	45 psi
	GS2	50 psi
	Dwell Time	100 ms

CUR: curtain gas, IS: ion spray voltage, TEM: ion source temperature, GS1: nebulizer gas, GS2: heater gas

### 7.10 Synthesen

#### 7.10.1 Nomenklatur

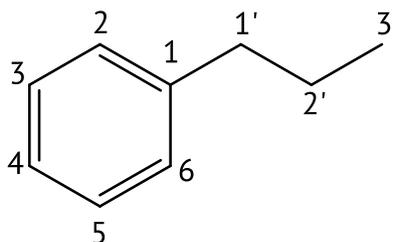


Abbildung 47: Nomenklatur Strukturformeln

Die Nomenklatur der Substanzen ist an die Struktur der Phenylpropanoide angelehnt und entspricht nicht der allgemein gültigen IUPAC-Nomenklatur. Die verwendete Nummerierung ist in Abbildung 47 definiert. Bei allen Synthesevorschriften der Vorstufen zu den DNA-Addukten ist zusätzlich die IUPAC-Nomenklatur mit angegeben.

### **7.10.2 Allgemeine Arbeitstechniken**

Hydrolyse und sauerstoffempfindliche Reaktionen wurden unter Schutzgas (Argonatmosphäre) mit Hilfe von Septen und Kanülen durchgeführt. Hydrolyseempfindliche Synthesen wurden mit, über Standardverfahren bzw. Destillation, getrockneten Lösungsmitteln durchgeführt, die bei Raumtemperatur unter Schutzgasatmosphäre aufbewahrt wurden.

### **7.10.3 Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie**

Die Reaktionskontrolle und Kontrolle der säulenchromatographischen Aufreinigung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC). Zum Einsatz kamen zugeschnittene DC-Fertigfolien mit Fluoreszenzindikator (6,7 cm x 4 cm; Kieselgel; Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Das Fließmittel wurde an das entsprechende Trennproblem angepasst und ist bei der Synthesevorschrift angegeben.

### **7.10.4 Aufreinigung von Syntheseprodukten**

Die Aufreinigung großer Mengen Substanzgemische erfolgte durch Säulenchromatographie. Als Säulenmaterial wurde Kieselgel60 verwendet und das Fließmittel an das entsprechende Trennproblem angepasst. Die Fraktionierung erfolgte unter DC-Kontrolle. Die relevanten Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

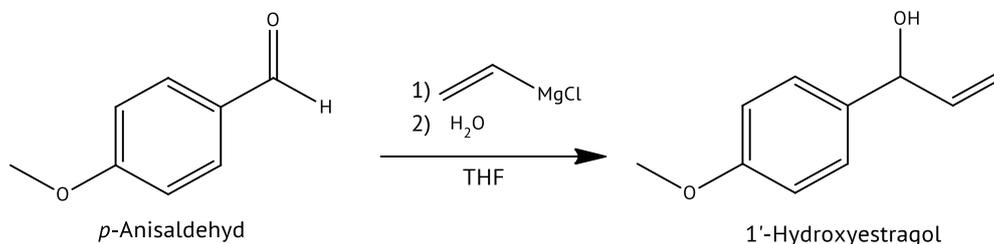
Bei der Synthese der DNA-Addukte, sowie der isotopenmarkierten Standards wurde das Reaktionsgemisch, aufgrund des kleinen Reaktionsansatzes, mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Die verwendeten Methoden sind in Abschnitt 7.9.1.1 dargestellt.

### **7.10.5 NMR**

NMR-Spektren wurde mit einem Bruker (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) Avance 400 oder Avance 600 MHz Spektrometer in DMSO-d<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  2.49 ppm) bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit ACD/Spectrus Processor2020.1.2 (ACDLab, Toronto, Canada)

**7.10.5 Synthese von 1'-Hydroxyestragol**

1-(4-Methoxyphenyl)prop-2-en-1-ol

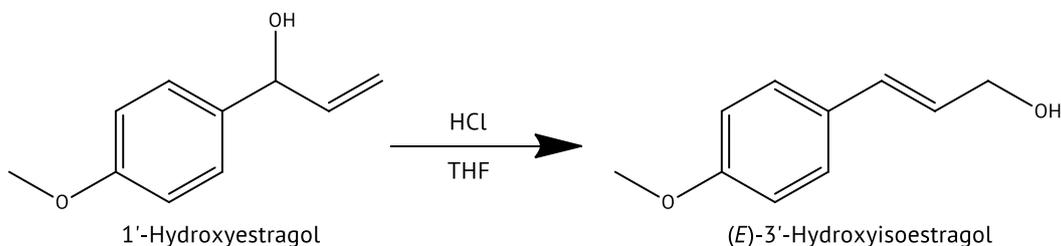
**Reaktionsschema****Synthesevorschrift**

*p*-Anisaldehyd (5 ml, 5,594 g, 40,9 mmol) wird in einer ausgeheizten und mehrfach mit Argon gefluteten Apparatur in 100 ml trockenem THF gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt und Vinylmagnesiumchlorid (30 ml, 1,6 M in THF; 47,2 mmol) zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird für 90 min auf 50–60 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird zu dem Reaktionsgemisch 250 ml gesättigte Ammoniumacetatlösung gegeben und die Lösung dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Ethylacetat unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 94 % eines gelbbraunen Öls, Reinheit abgeschätzt durch NMR 85 %

**Charakterisierung**

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm]: 1,98 (s; 1H; OH), 3,72 (s; 3 H; OCH<sub>3</sub>), 4,96–5,06 (m; 2 H; CH<sub>2</sub>), 5,21 (dt; <sup>3</sup>J<sub>H1',H2'</sub>=16,94 Hz, <sup>4</sup>J<sub>H1',H3'</sub>=1,76 Hz; 1 H; H1'), 5,93 (ddd; <sup>3</sup>J<sub>H2',H1'</sub>=16,94 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H3',H1'</sub>=10,20 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2',H3'</sub>=5,83 Hz; 1 H; H2'), 6,84–6,90 (m; 2 H; H3/H5), 7,20–7,26 (m; 2 H; H2/H6) **DC:** R<sub>f</sub>(1'-Hydroxyestragol)=0,49 (Hexan:Ethylacetat, Verhältnis 3:1), 0,62 (Hexan:Ethylacetat, Verhältnis 5:2)

**7.10.6 Synthese von (*E*)-3'-Hydroxyisoestragol**(2*E*)-3-(4-Methoxyphenyl)prop-1-en-3-ol**Reaktionsschema****Synthesevorschrift**

1'-Hydroxyestragol (2,088 g; 12,7 mmol) wird in 80 ml THF gelöst und mit Salzsäure (80 ml; 0,05 M) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 90 min unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und mit 150 ml Ethylacetat extrahiert. Die wässrige Phase wird anschließend dreimal mit 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird säulenchromatographisch (Säulenmaterial: Kieselgel; Fließmittel: Hexan/Ethylacetat in Verhältnis 5/2) aufgereinigt.

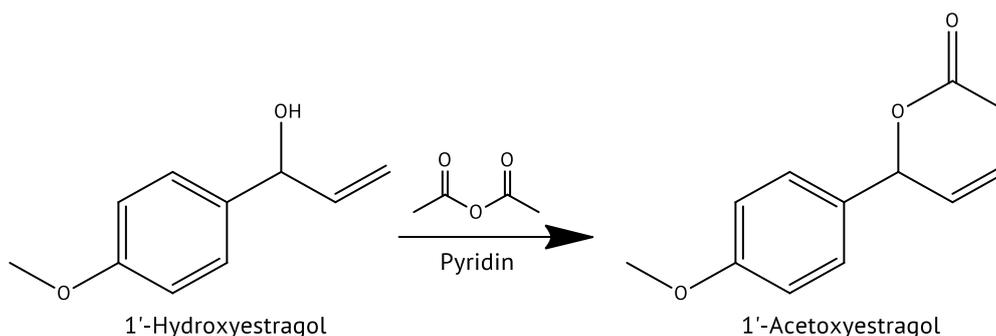
**Ausbeute:** 18 % eines gelben Feststoff  
 Reinheit abgeschätzt durch NMR 100 %

**Charakterisierung**

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm]: 3,73 (s; 3 H; OCH<sub>3</sub>), 4,07 (s; 2 H; H<sub>3'</sub>), 4,79 (s; 1 H; OH), 6,20 (dt; <sup>3</sup>J<sub>H1',H2'</sub>=15,96 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H1',H3'</sub>=5,23 Hz; 1 H; H<sub>2'</sub>), 6,46 (d; <sup>3</sup>J<sub>H2',H1'</sub>=16,14 Hz; 1 H; H<sub>1'</sub>), 6,87 (d; <sup>3</sup>J<sub>H3,H2/H5,H6</sub>=8,80 Hz; 2 H; H<sub>3/H5</sub>), 7,34 (d; <sup>3</sup>J<sub>H2,H3/H5,H6</sub>=8,44 Hz; 2 H; H<sub>2/H6</sub>) **DC:** R<sub>f</sub>(3'-Hydroxyisoestragol)=0,10 (Hexan:Ethylacetat, Verhältnis 3:1), 0,48 (Hexan:Ethylacetat, Verhältnis 5:2); R<sub>f</sub>(1'-Hydroxyestragol)=0,49 (Hexan:Ethylacetat, Verhältnis 3:1), 0,62 (Hexan:Ethylacetat, Verhältnis 5:2)

**7.10.7 Synthese von 1'-Acetoxyestragol**

1-(4-Methoxyphenyl)prop-2-en-1-ylacetat

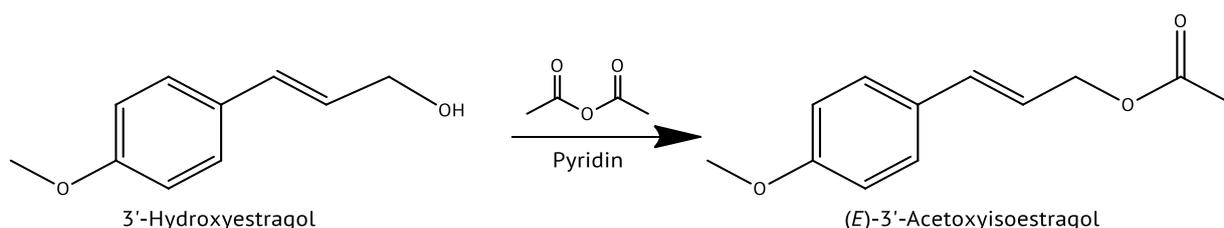
**Reaktionsschema****Synthesevorschrift**

1'-Hydroxyestragol (1,328 g; 6,4 mmol) wird in 2 ml Pyridin gelöst und Essigsäureanhydrid (2 ml; 21,0 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur gerührt bis 1'-Hydroxyestragol mittels DC-Reaktionskontrolle nicht mehr nachgewiesen werden kann. Dem Reaktionsgemisch wird 75 ml Dichlormethan zugesetzt und der pH-Wert auf 2-3 eingestellt. Die organische Phase wird mit gesättigter Natriumcarbonatlösung extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 79 % eines gelbbraunen Öls (Annahme: Dichte von Öl: 0,998 g/ml)  
Reinheit abgeschätzt durch NMR 100 %

**Charakterisierung**

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ [ppm]: 2,04 (s; 3 H; CH<sub>3</sub>), 3,73 (s; 3 H; OCH<sub>3</sub>), 5,19 (dt; <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>,H<sub>2</sub>'</sub>=10,42 Hz, <sup>2</sup>J<sub>CH<sub>2</sub></sub>=1,38 Hz; 1 H; CH<sub>2</sub>), 5,24 (dt; <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>,H<sub>2</sub>'</sub>=17,07 Hz, <sup>2</sup>J<sub>CH<sub>2</sub></sub>=1,44 Hz; 1 H; CH<sub>2</sub>), 6,02 (ddd; <sup>3</sup>J<sub>H<sub>2</sub>',CH<sub>2</sub></sub>=17,07 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H<sub>2</sub>',CH<sub>2</sub></sub>=10,42 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H<sub>2</sub>',H<sub>1</sub>'</sub>=5,90 Hz; 1 H; H<sub>2</sub>'), 6,14 (d; <sup>3</sup>J<sub>H<sub>1</sub>',H<sub>2</sub>'</sub>=5,90 Hz; 1 H; H<sub>1</sub>'), 6,91 (td; <sup>3</sup>J<sub>H<sub>3</sub>,H<sub>2</sub>/H<sub>5</sub>,H<sub>6</sub></sub>=1,00 Hz; 2 H; H<sub>3</sub>/H<sub>5</sub>), 7,26 (td; <sup>3</sup>J<sub>H<sub>2</sub>,H<sub>3</sub>/H<sub>4</sub>,H<sub>5</sub></sub>=1,00 Hz; 2 H; H<sub>2</sub>/H<sub>6</sub>) **DC:** R<sub>f</sub>(1'-Acetoxyestragol)=0,71 (Hexan:Ethylacetat, Verhältnis 3:1); R<sub>f</sub>(1'-Hydroxyestragol)=0,52 (Hexan:Ethylacetat, Verhältnis 3:1) **HPLC:** t<sub>R(UV/Vis)</sub>=21,8 min

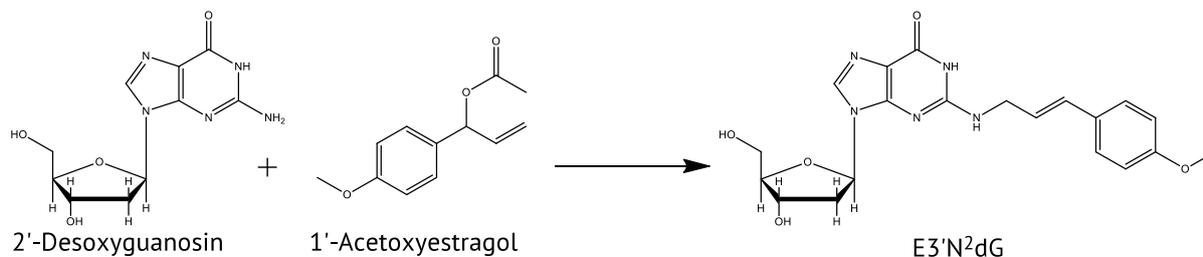
**7.10.8 Synthese von (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol**(2*E*)-3-(4-Methoxyphenyl)prop-2-en-1-ylacetat**Reaktionsschema****Synthesevorschrift**

3'-Hydroxyisoestragol (215 mg; 1,3 mmol) wird in 1,5 ml Pyridin gelöst und Essigsäureanhydrid (500  $\mu$ l; 8,4 mmol) zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird bei Raumtemperatur 3 h gerührt. Dem Reaktionsgemisch wird 75 ml Dichlormethan zugesetzt und der pH-Wert auf 2-3 eingestellt. Die organische Phase wird mit gesättigter Natriumcarbonatlösung extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt.

**Ausbeute:** 56 % eines gelbbraunen Öls (Annahme Dichte von Öl: 0,998 g/ml)  
Reinheit abgeschätzt durch NMR 100 %

**Charakterisierung**

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm]: 2,03 (s; 3 H; CH<sub>3</sub>), 3,74 (s; 3 H; OCH<sub>3</sub>), 4,64 (dd; <sup>3</sup>*J*<sub>H3',H2'</sub>=6,60 Hz <sup>4</sup>*J*<sub>H3',H1'</sub>=1,10 Hz; 2 H; H3'), 6,19 (dt; <sup>3</sup>*J*<sub>H2',H1'</sub>=15,96 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H2',H3'</sub>=6,33 Hz; 1 H; H2'), 6,57–6,63 (m; 1 H; H1'), 6,88–6,91 (m; 2 H; H3/H5), 7,36–7,40 (m; 2 H; H2/H6) **DC:** *R*<sub>f</sub>(3'-Acetoxyisoestragol)=0,72 (Hexan:Ethylacetat, Verhältnis 3:1); *R*<sub>f</sub>(3'-Hydroxyestragol)=0,36 (Hexan:Ethylacetat, Verhältnis 3:1); **HPLC:** *t*<sub>R(UV/Vis)</sub>=25,7 min

**7.10.9 Synthese von *N*<sup>2</sup>-(Isoestragnol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin aus 1'-Acetoxyestragnol****Reaktionsschema****Synthesevorschrift**

2'-Desoxyguanosin (100 mg, 351  $\mu\text{mol}$ ) wird in 47,5 ml Ammoniumcarbonatpuffer (10 mM) und 1'-Acetoxyestragnol (180  $\mu\text{l}$ , 179,6 mg, 870  $\mu\text{mol}$ ) wird in 2,5 ml Acetonitril gelöst. Die Lösungen werden im Schüttelinkubator auf 37 °C erhitzt und zusammengeführt. Nach 72 h Inkubation wird das Reaktionsgemisch präparativ aufgereinigt (HPLC-Methode siehe Kapitel 7.9.1.1). Mittels analytischer HPLC wird die Reinheit der Fraktionen überprüft. Die Produkt-enthaltenden Fraktionen werden am Rotationsverdampfer eingengt und lyophilisiert.

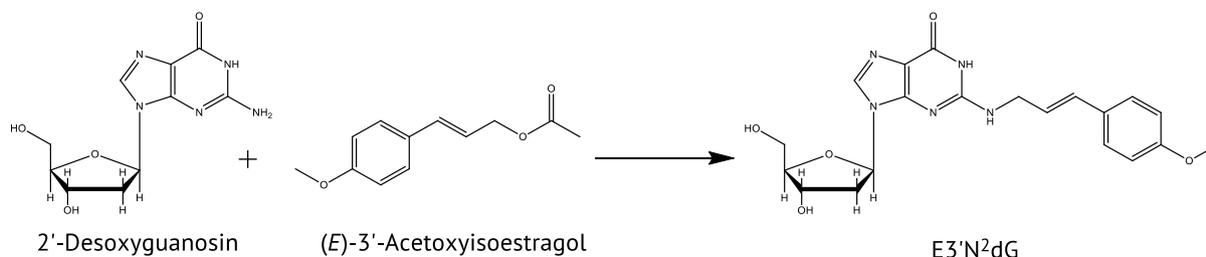
**Ausbeute:** 7 % eines weißen Feststoff

**Charakterisierung**

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] 2,06–2,16 (m; 1 H; 2'dR), 2,79–2,90 (m; 1 H; 2'dR), 3,54–3,57 (m; 2 H; 5'dR), 3,72 (m; 3 H; OCH<sub>3</sub>), 3,77–3,82 (m; 1 H; 4'dR), 4,30–4,42 (m, 1H, OH5'dR), 4,87–4,94 (m, 1H, OH3'dR), 5,18–5,18 (m; 1 H; H3'), 5,18–5,25 (m; 1 H; H3'), 5,25–5,33 (m; 1 H; 3'dR), 5,99–6,13 (m; 1 H; 1'dR), 6,23–6,32 (m; 1 H; H2'), 6,23–6,23 (m; 1H; H1'), 6,39 (s; 1 H; NH), 6,87 (d; <sup>3</sup>*J*<sub>H3,H2/H5,H6</sub>=1,00 Hz; 1 H; H3/H5), 6,91 (d; <sup>3</sup>*J*<sub>H3,H2/H5,H6</sub>=1,00 Hz; 1 H; H3/H5), 7,27 (d; <sup>3</sup>*J*<sub>H2,H3/H6,H5</sub>=1,00 Hz; 1 H; H2/H6), 7,33 (d; <sup>3</sup>*J*<sub>H2,H3/H6,H5</sub>=1,00 Hz; 1 H; H2/H6), 7,83–7,89 (m; 1 H; C8-dG), 10,54–11,04 (m; 1 H; NH) **HPLC:** *t*<sub>R(UV/Vis)</sub>=22,0 min; *t*<sub>R(MS/MS)</sub>=3,06 min **MS-Spektrum:** *m/z*: 414,3 ([M+H]<sup>+</sup>), 298,1, 164,1, 147,0

### 7.10.10 Synthese von $N^2$ -(Isoestracol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin aus ( $E$ )-3'-Acetoxyisoestracol

#### Reaktionsschema



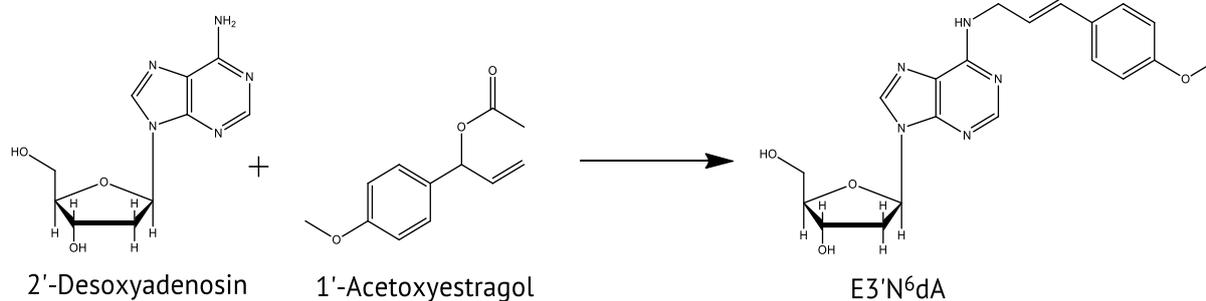
#### Synthesevorschrift

$2'$ -Desoxyguanosin (101,8 mg, 356  $\mu$ mol) wird in 45 ml Ammoniumcarbonatpuffer (10 mM) und ( $E$ )-3'-Acetoxyisoestracol (185  $\mu$ l, 184,6 mg, 895  $\mu$ mol) wird in 4 ml Acetonitril gelöst. Die Lösungen werden im Schüttelinkubator auf 37 °C erhitzt und zusammengeführt. Nach 72 h Inkubation wird das Reaktionsgemisch präparativ aufgereinigt (HPLC-Methode siehe Kapitel 7.9.1.1). Mittels analytischer HPLC wird die Reinheit der Fraktionen überprüft. Die Produktenthaltenden Fraktionen werden am Rotationsverdampfer eingengt und lyophilisiert.

**Ausbeute:** 6 % eines weißen Feststoff

#### Charakterisierung

**$^1\text{H-NMR}$ :** (600 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  [ppm]: 2,07–2,15 (m; 1 H; 2'dR), 2,81–2,89 (m; 1 H; 2'dR), 3,47–3,60 (m; 2 H; 5'dR), 3,71–3,75 (m; Hz; 3 H; OCH<sub>3</sub>), 3,77–3,83 (m; 1 H; 4'dR), 4,32–4,38 (m; 1 H; OH5'dR), 4,85–4,94 (m; 1 H; OH5'dR), 5,11–5,17 (m; 1 H; H3'), 5,17–5,24 (m; 1 H; H3'), 5,25–5,32 (m; 1 H; 3'dR), 6,05 (m, 1 H, 1'dR), 6,08–6,18 (m; 1 H; H2'), 6,24–6,31 (m; 1 H; H1'), 6,34–6,41 (m; 1 H; NH), 6,87 (d;  $^3J_{\text{H}3,\text{H}2/\text{H}5,\text{H}6}=1,00$  Hz; 1 H; H3/H5), 6,90 (d;  $^3J_{\text{H}3,\text{H}2/\text{H}5,\text{H}6}=1,00$  Hz; 1 H; H3/H5), 7,27 (d;  $^3J_{\text{H}2,\text{H}3/\text{H}6,\text{H}5}=1,00$  Hz; 1 H; H2/H6), 7,33 (d;  $^3J_{\text{H}2,\text{H}3/\text{H}6,\text{H}5}=1,00$  Hz; 1 H; H2/H6), 7,80–7,90 (m; 1 H; C8-dG), 10,52–10,99 (m; 1 H; NH) **HPLC:**  $t_{\text{R(UV/Vis)}}$ =22,0 min,  $t_{\text{R(MS/MS)}}$ =3,06 min **MS-Spektrum:**  $m/z$ =414,3 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 298,1, 164,1, 147,0

**7.10.11 Synthese von *N*<sup>6</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin aus 1'-Acetoxyestragol****Reaktionsschema****Synthesevorschrift**

2'-Desoxyadenosin (100 mg, 371  $\mu\text{mol}$ ) wird in 47,5 ml Ammoniumcarbonatpuffer (10 mM) und 1'-Acetoxyestragol (192  $\mu\text{l}$ , 191,6 mg, 929  $\mu\text{mol}$ ) wird in 2,5 ml Acetonitril gelöst. Die Lösungen werden im Schüttelinkubator auf 37 °C erhitzt und zusammengeführt. Nach 72 h Inkubation wird das Reaktionsgemisch präparativ aufgereinigt (HPLC-Methode siehe Kapitel 7.9.1.1). Mittels analytischer HPLC wird die Reinheit der Fraktionen überprüft. Die Produkt-enthaltenden Fraktionen werden am Rotationsverdampfer eingengt und lyophilisiert.

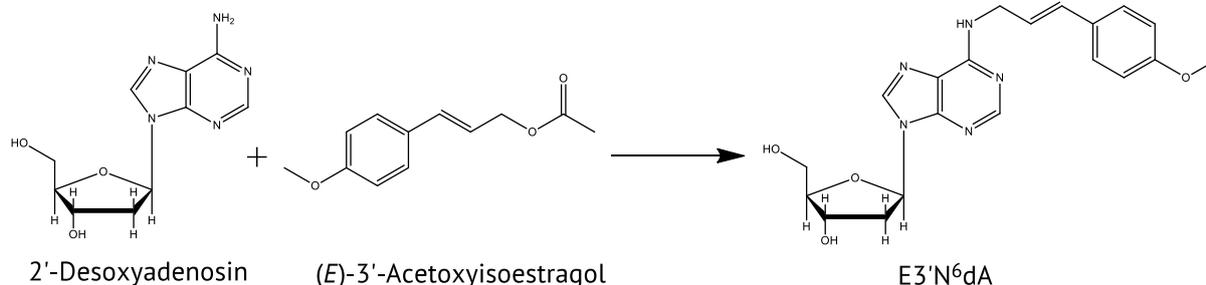
**Ausbeute:** 2 %

**Charakterisierung**

**<sup>1</sup>H-NMR:** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] 2,20–2,29 (m; 1 H; 2'dR), 2,67–2,77 (m; 1 H; 2'dR), 3,47–3,54 (m; 1 H; 5'dR), 3,57–3,65 (m; 1 H; 5'dR), 3,71 (s; 3 H; OCH<sub>3</sub>), 3,83–3,90 (m; 1 H; 4'dR), 4,25 (s; 1 H; H3'), 4,40 (s; 1 H; 3'dR), 5,16–5,27 (m; 2 H; OH5'dR), 5,32 (s; 1 H; OH3'dR), 6,15–6,27 (m; 1 H; H2'), 6,30–6,37 (m; 1 H; 1'dR), 6,45 (d; 1 H; H1'), 6,83–6,87 (m; 2 H; H3/H5), 7,29–7,34 (m; 2 H; H2/H6), 8,02–8,12 (m; 1 H; NH), 8,19 (d; 1 H; C2-dA), 8,35 (d; 1 H; C8-dA) **HPLC:**  $t_{R(\text{UV/Vis})}$ =24,6 min,  $t_{R(\text{MS/MS})}$ =3,70 min **MS-Spektrum:**  $m/z$ =398,33 ([M+H]<sup>+</sup>), 282,2, 147,1, 117,1

### 7.10.12 Synthese von N<sup>6</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin aus (E)-3'-Acetoxyisoestragol

#### Reaktionsschema



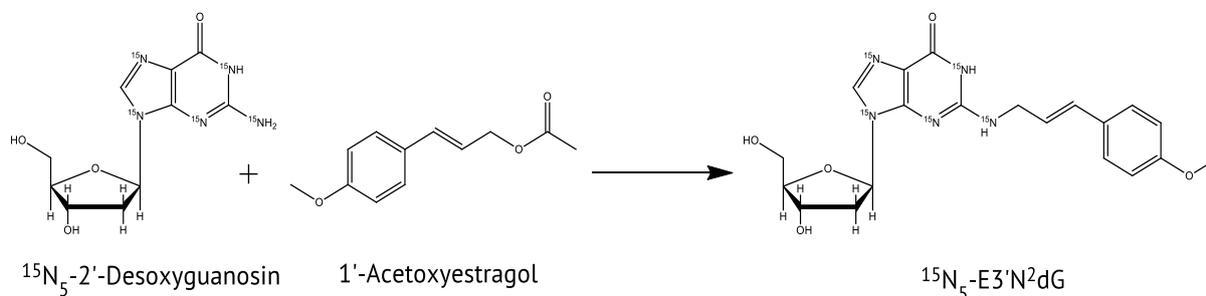
#### Synthesevorschrift

2'-Desoxyadenosin (101,4 mg, 376  $\mu\text{mol}$ ) wird in 45 ml Ammoniumcarbonatpuffer (10 mM) und (E)-3'-Acetoxyisoestragol (195  $\mu\text{l}$ , 194,6 mg, 943,6  $\mu\text{mol}$ ) wird in 4 ml Acetonitril gelöst. Die Lösungen werden im Schüttelinkubator auf 37 °C erhitzt und zusammengeführt. Nach 72 h Inkubation wird das Reaktionsgemisch präparativ aufgereinigt (HPLC-Methode siehe Kapitel 7.9.1.1). Mittels analytischer HPLC wird die Reinheit der Fraktionen überprüft. Die Produktenthaltenden Fraktionen werden am Rotationsverdampfer eingengt und lyophilisiert.

**Ausbeute:** 3 %

#### Charakterisierung

**<sup>1</sup>H-NMR:** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  [ppm] 2,20–2,28 (m; 1 H; 2'dR), 2,67–2,75 (m; 1 H; 2'dR), 3,47–3,53 (m; 1 H; 5'dR), 3,56–3,63 (m; 1 H; 5'dR), 3,72 (s; 3 H; OCH<sub>3</sub>), 3,84–3,89 (m; 1 H; 4'dR), 4,23 (s; 1 H; H3'), 4,40 (s; 1 H; 3'dR), 5,17–5,26 (m; 2 H; OH5'dR), 5,32 (s; 1 H; OH3'dR), 6,18–6,25 (m; 1 H; H2'), 6,30–6,36 (m; 1 H; 1'dR), 6,45 (d; 1 H; H1'), 6,83–6,88 (m; 2 H; H3'/H5), 7,29–7,34 (m; 2 H; H2'/H6), 8,03–8,10 (m; 1 H; NH), 8,20 (d; 1 H; C2-dA), 8,35 (d; 1 H; C8-dA) **HPLC:**  $t_{R(UV/Vis)}$ =24,6 min,  $t_{R(MS/MS)}$ =3,70 min **MS-Spektrum:**  $m/z$ =398,33 ([M+H]<sup>+</sup>), 282,2, 147,1, 117,1

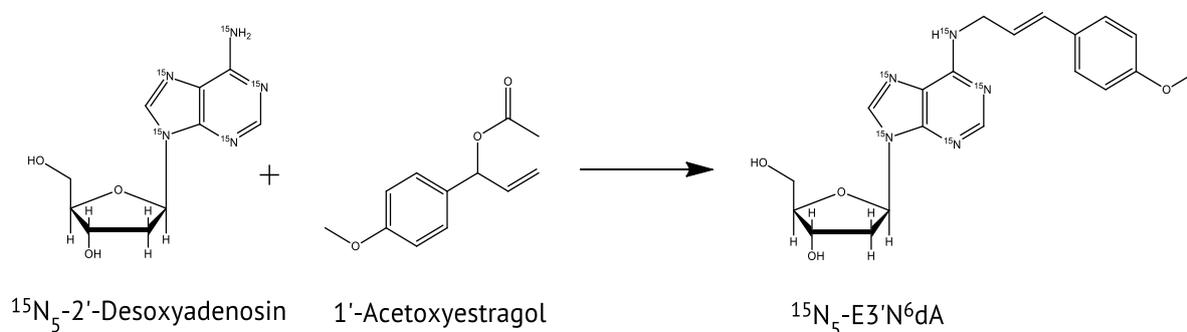
**7.10.13 Synthese von  $^{15}\text{N}_5$ -E3'N<sup>2</sup>dG aus 1'-Acetoxyestragol****Reaktionsschema****Synthesevorschrift**

$^{15}\text{N}_5$ -2'-Desoxyguanosin (1,121 mg, 4,12  $\mu\text{mol}$ ) wird in 440  $\mu\text{l}$  Ammoniumcarbonatpuffer (10 mM) und 1'-Acetoxyestragol (8  $\mu\text{l}$ , 7,98 mg, 38,7  $\mu\text{mol}$ ) wird in 60  $\mu\text{l}$  Acetonitril gelöst. Die Lösungen werden im Schüttelinkubator auf 37 °C erhitzt und zusammengeführt. Nach 72 h Inkubation wird das Reaktionsgemisch präparativ aufgereinigt (HPLC-Methode siehe Kapitel 7.9.1.1). Das organische Lösungsmittel wird aus den Produkt-enthaltenden Fraktionen unter verminderten Druck entfernt. Die Fraktionen werden vereinigt und mit Wasser auf ein Volumen von ca. 10 ml eingengt. Die Lösung wird mittels eines zweiten präparativen Gradienten (HPLC-Methode siehe Kapitel 7.9.1.1) aufgereinigt. Aus den Produkt-enthaltenden Fraktionen wird unter verminderten Druck das organische Lösungsmittel entfernt und die Konzentration des Produktes mittels HPLC-UV/Vis und externer Kalibriergerade bestimmt.

**Ausbeute:** 1 %

**Charakterisierung**

**HPLC:**  $t_{R(\text{UV/Vis})}=22,0$  min,  $t_{R(\text{MS/MS})}=3,06$  min **MS-Spektrum:**  $m/z=419,227$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 303,100, 147,000

**7.10.14 Synthese von  $^{15}\text{N}_5$ -E3'N<sup>6</sup>dA aus 1'-Acetoxyestragnol****Reaktionsschema****Synthesevorschrift**

$^{15}\text{N}_5$ -2'-Desoxyadenosin (1,046 mg, 4,08  $\mu\text{mol}$ ) wird in 440  $\mu\text{l}$  Ammoniumcarbonatpuffer (10 mM) und 1'-Acetoxyestragnol (8  $\mu\text{l}$ , 7,98 mg, 38,7  $\mu\text{mol}$ ) wird in 60  $\mu\text{l}$  Acetonitril gelöst. Die Lösungen werden im Schüttelinkubator auf 37 °C erhitzt und zusammengeführt. Nach 72 h Inkubation wird das Reaktionsgemisch präparativ aufgereinigt (HPLC-Methode siehe Kapitel 7.9.1.1). Aus den Produkt-enthaltenden Fraktionen wird unter verminderten Druck das organische Lösungsmittel entfernt und die Konzentration des Produktes mittels HPLC-UV/Vis und externer Kalibriergerade bestimmt.

**Ausbeute:** 13 %

**Charakterisierung**

**HPLC:**  $t_{R(\text{UV/Vis})}$ =24,6 min,  $t_{R(\text{MS/MS})}$ =3,70 min **MS-Spektrum:**  $m/z$ =403,227 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), 287,200, 147,100, 117,100

#### **7.10.15 Untersuchung Reaktivität von 1'-Acetoxyestragnol und (E)-3'-Acetoxyisoestragnol mit den DNA-Basen**

Um die Reaktivität der Vorstufen 1'-Acetoxyestragnol und (E)-3'-Acetoxyisoestragnol mit den DNA-Basen zu untersuchen wurden die reaktiven Vorstufen in Acetonitril gelöst, die DNA-Base in 10 mM Ammoniumcarbonatlösung. Die Ammoniumcarbonatlösung diente zu Einstellung des pH-Werts und Acetonitril als Lösungsvermittler.

Für die Reaktion von dG und dA wurden 100 mg der Base in 100 ml Ammoniumcarbonatlösung gelöst, die reaktive Vorstufe in jeweils 4 ml Acetonitril. 1'-Acetoxyestragnol und (E)-3'-Acetoxyisoestragnol wurden im 2,5 bis 3fachen Überschuss zugesetzt.

Für die Untersuchung der Reaktivität mit dC und dT wurden 3 mg Base in 3,6 ml Ammoniumcarbonatlösung gelöst und mit dem 5fachen Überschuss der jeweiligen reaktiven Vorstufe gelöst in 0,4 ml Acetonitril versetzt.

Alle Reaktionsansätze wurden während der gesamten Reaktionszeit geschüttelt und über einen Zeitraum von mind. 22 h Aliquotes entnommen. Diese wurden mittels HPLC-UV/Vis (siehe Methode siehe Kapitel 7.9.1.2) bzw. HPLC-ESI-MS/MS (siehe Methode siehe Kapitel 7.9.2.2) auf Reaktionsprodukte untersucht.

---

## 8 LITERATUR

---

**Literatur**

- Aden, D. P., A. Fogel, S. Plotkin, I. Damjanov, B. B. Knowles (1979): Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 5739/1979, S. 615–616.
- Agius, L., C. Battersby, K. G. Alberti (1985): Monolayer culture of parenchymal rat hepatocytes on collagen-coated microcarriers. A hepatocyte system for short- and long-term metabolic studies. *In vitro Cellular & Developmental Biology: Journal of the Tissue Culture Association* 21, 5/1985, S. 254–259.
- Ahmed, A. S., R. M. Gogal, J. E. Walsh (1994): A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods* 170, 2/1994, S. 211–224.
- Al-Ahmad, M. M., N. Amir, S. Dhanasekaran, A. John, Y. M. Abdulrazzaq, B. R. Ali, S. M. A. Bastaki (2017): Genetic polymorphisms of cytochrome P450-1A2 (CYP1A2) among Emiratis. *PloS one* 12, 9/2017, S. 1–13.
- Alhusainy, W., A. Paini, J. H. J. van den Berg, A. Punt, G. Scholz, B. Schilter, P. J. van Bladeren, S. Taylor, T. B. Adams, I. M. C. M. Rietjens (2013): In vivo validation and physiologically based biokinetic modeling of the inhibition of SULT-mediated estragole DNA adduct formation in the liver of male Sprague-Dawley rats by the basil flavonoid nevadensin. *Molecular Nutrition & Food Research* 57, 11/2013, S. 1969–1978.
- Ames, B. N., J. McCann, E. Yamasaki (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research - Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 31, 6/1975, S. 347–363.
- Andrae, U., H.-J. Martus (2017): Genotoxizitätstests in vitro. In: Greim, H. (Hrsg.): *Das Toxikologiebuch*. WILEY VCH, Weinheim, Germany, S. 479–500.
- Anthony, A., J. Caldwell, A. J. Hutt, R. L. Smith (1987): Metabolism of estragole in rat and mouse and influence of dose size on excretion of the proximate carcinogen 1'-hydroxyestragole. *Food and Chemical Toxicology* 25, 11/1987, S. 799–806.
- Arand, M., F. Oesch (2013): Fremdstoffmetabolismus. In: Marquardt, H. (Hrsg.): *Toxikologie. Mit 378 Tabellen*. WVG, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, S. 89–116.
- Atkinson, R. G. (2018): Phenylpropenes: Occurrence, Distribution, and Biosynthesis in Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 10/2018, S. 2259–2272.

- Banoglu, E. (2000): Current status of the cytosolic sulfotransferases in the metabolic activation of promutagens and procarcinogens. *Current Drug Metabolism* 1, 1/2000, S. 1–30.
- Bargonetti, J., E. Champeil, M. Tomasz (2010): Differential toxicity of DNA adducts of mitomycin C. *Journal of Nucleic Acids*, 2010, S. 1–6.
- Berg, K. (2016): In vitro Untersuchungen zur Gentoxizität der Alkenylbenzene  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Asaron sowie ausgewählter oxidativer Metaboliten. Dissertation, Kaiserslautern.
- BgVV (2001): Gehalte an Methyleugenol und Estragol in teeähnlichen Erzeugnissen, 2001, S. 1–3.
- BgVV (2000): Gehalte an Cumarin, Safrol, Methyleugenol und Estragol in Lebensmitteln, 2000, S. 1–2.
- Borchert, P., P. G. Wislocki, J. A. Miller, E. C. Miller (1973): The metabolism of the naturally occurring hepatocarcinogen safrole to 1'-hydroxysafrole and the electrophilic reactivity of 1'-acetoxysafrole. *Cancer Research* 33, 3/1973, S. 575–589.
- Botton, M. R., X. Lu, G. Zhao, E. Repnikova, Y. Seki, A. Gaedigk, E. E. Schadt, L. Edelmann, S. A. Scott (2019): Structural variation at the CYP2C locus: Characterization of deletion and duplication alleles. *In vitro Cellular & Developmental Biology: Animal* 40, 11/2019, S. 37–51.
- Bradley, M. O., B. Bhuyan, M. C. Francis, R. Langenbach, A. Peterson, E. Huberman (1981): Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: A review and analysis of the literature. *Mutation Research - Reviews in Genetic Toxicology* 87, 2/1981, S. 81–142.
- Brandon, E. F. A., T. M. Bosch, M. J. Deenen, R. Levink, E. van der Wal, J. B. M. van Meerveld, M. Bijl, J. H. Beijnen, J. H. M. Schellens, I. Meijerman (2006): Validation of in vitro cell models used in drug metabolism and transport studies; genotyping of cytochrome P450, phase II enzymes and drug transporter polymorphisms in the human hepatoma (HepG2), ovarian carcinoma (IGROV-1) and colon carcinoma (CaCo-2, LS180) cell lines. *Toxicology and Applied Pharmacology* 211, 1/2006, S. 1–10.
- Brandon, E. F.A., C. D. Raap, I. Meijerman, J. H. Beijnen, J. H.M. Schellens (2003): An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 189, 3/2003, S. 233–246.
- Bristol, D. W. (2011): NTP 3-month toxicity studies of estragole (CAS No. 140-67-0) administered by gavage to F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxicity Report Series*, 82/2011, S. 1–111.
- Caujolle, F., D. Meynier (1958): Toxicité de l'estrageole et des anétholes (cis et trans). *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences* 246, 9/1958, S. 1465–1468.
- Chan, V.S.W., J. Caldwell (1992): Comparative induction of unscheduled DNA synthesis in cultured rat hepatocytes by allylbenzenes and their 1'-hydroxy metabolites. *Food and Chemical Toxicology* 30, 10/1992, S. 831–836.

- Chen, Y., J. A. Goldstein (2009): The transcriptional regulation of the human CYP2C genes. *Current Drug Metabolism* 10, 6/2009, S. 567–578.
- Chen, Y., C. Huang, T. Zhon, G. Chen (2008): Genistein induction of human sulfotransferases in HepG2 and Caco-2 cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 106, 6/2008, S. 553–559.
- Clewell, R. A., C. M. Thompson, H. J. Clewell (2019): Dose-dependence of chemical carcinogenicity: Biological mechanisms for thresholds and implications for risk assessment. *Chemico-Biological Interactions* 301, 2019, S. 112–127.
- Croteau, R., T. M. Kutchan, Lewis Nroman G. (2000): Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan, B. B., W. Gruissem, R. L. Jones (Hrsg.): *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Md., S. 1250–1318.
- Dekant, W. (2017): Biotransformation von Fremdstoffen. In: Greim, H. (Hrsg.): *Das Toxikologiebuch*. WILEY VCH, Weinheim, Germany, S. 65–100.
- Delaforge, M., P. Janiaud, P. Levi, J. P. Morizot (1980): Biotransformation of allylbenzene analogues in vivo and in vitro through the epoxide-diol pathway. *Xenobiotica* 10, 10/1980, S. 737–744.
- Denisov, I. G., D. J. Frank, S. G. Sligar (2009): Cooperative properties of cytochromes P450. *Pharmacology & Therapeutics* 124, 2/2009, S. 151–167.
- Dewick, P. M. (2002): *Medicinal natural products. A biosynthetic approach*. Wiley, Chichester.
- Ding, W., D. D. Levy, M. E. Bishop, M. G. Pearce, K. J. Davis, A. M. Jeffrey, J.-D. Duan, G. M. Williams, G. A. White, L. E. Lyn-Cook, M. G. Manjanatha (2015): In vivo genotoxicity of estragole in male F344 rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 56, 4/2015, S. 356–365.
- Doehmer, J. (1993): V79 Chinese hamster cells genetically engineered for cytochrome P450 and their use in mutagenicity and metabolism studies. *Toxicology* 82, 1-3/1993, S. 105–118.
- Drinkwater, N. R., E. C. Miller, J. A. Miller, H. C. Pitot (1976): Hepatocarcinogenicity of estragole (1-allyl-4-methoxybenzene) and 1'-hydroxyestragole in the mouse and mutagenicity of 1'-acetoxyestragole in bacteria. *Journal of the National Cancer Institute* 57, 6/1976, S. 1323–1331.
- Efferth, T. (2006): Molekulare Mechanismen der Pharmakokinetik. In: Efferth, T. (Hrsg.): *Molekulare Pharmakologie und Toxikologie. Biologische Grundlagen der Arzneimittelwirkung*. Springer, Berlin, New York, S. 19–49.
- EMA (2020): Public statement on the use of herbal medicinal products containing estragole. Committee on Herbal Medicinal Products, 2020, S. 1-21.
- Fenech, M. (2000): The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 455, 1-2/2000, S. 81–95.

- Fenech, M.: The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. In: Bioanorganische Chemie, S. 185–216.
- Ford, D. K., G. Yerganian (1958): Observations on the chromosomes of Chinese hamster cells in tissue culture. *Journal of the National Cancer Institute* 21, 2/1958, S. 393–425.
- Fraser, C. M., C. Chapple (2011): The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* 9, 2011, S. 1–19.
- Freissmuth, M. (2016): Pharmakokinetik. In: Freissmuth, M., S. Offermanns, S. Böhm (Hrsg.): Pharmakologie und Toxikologie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S. 9–40.
- Fuhrmann, G. F. (2006): Toxikokinetik. In: Fuhrmann, G. F., A. Aigner, T. Büch, W. Legrum, C. Steffen (Hrsg.): Toxikologie Für Naturwissenschaftler. Einführung in Die Theoretische und Spezielle Toxikologie. Vieweg Verlag, Friedr. & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Wiesbaden, S. 17–102.
- Gang, D. R., J. Wang, N. Dudareva, K. H. Nam, J. E. Simon, E. Lewinsohn, E. Pichersky (2001): An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiology* 125, 2/2001, S. 539–555.
- Gao, L., L. Rutz, D. Schrenk (2020): Structure-dependent hepato-cytotoxic potencies of selected pyrrolizidine alkaloids in primary rat hepatocyte culture. *Food and Chemical Toxicology* 135, 2020, S. 1–6.
- Gerets, H. H. J., K. Tilmant, B. Gerin, H. Chanteux, B. O. Depelchin, S. Dhalluin, F. A. Atienzar (2012): Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biology and Toxicology* 28, 2/2012, S. 69–87.
- Gonzalez, F. J., K. R. Korzekwa (1995): Cytochromes P450 expression systems. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 35, 1995, S. 369–390.
- Greim, H. (2017): Einleitung. In: Greim, H. (Hrsg.): *Das Toxikologiebuch*. WILEY VCH, Weinheim, Germany, S. 3–30.
- Gross, M., J. Friedman, N. Dudai, O. Larkov, Y. Cohen, E. Bar, U. Ravid, E. Putievsky, E. Lewinsohn (2002): Biosynthesis of estragole and t-anethole in bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*) chemotypes. Changes in SAM:phenylpropene O-methyltransferase activities during development. *Plant Science* 163, 5/2002, S. 1047–1053.
- Hengstler, J. G. (2017): Leber. In: Greim, H. (Hrsg.): *Das Toxikologiebuch*. WILEY VCH, Weinheim, Germany, S. 215–274.
- Herres-Pawlis, S., P. Klüfers (2017): Redoxkatalyse mit Hämzentren: Cytochrom c, Katalase, Cytochrom P450. In: Herres-Pawlis, S., P. Klüfers (Hrsg.): *Bioanorganische Chemie. Metalloproteine, Methoden und Modelle*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, S. 125–131.

- Herrmann, K., W. Engst, K. E. Appel, B. H. Monien, H. Glatt (2012): Identification of human and murine sulfotransferases able to activate hydroxylated metabolites of methyleugenol to mutagens in *Salmonella typhimurium* and detection of associated DNA adducts using UPLC-MS/MS methods. *Mutagenesis* 27, 4/2012, S. 453–462.
- Herrmann, K., F. Schumacher, W. Engst, K. E. Appel, K. Klein, U. M. Zanger, H. Glatt (2013): Abundance of DNA adducts of methyleugenol, a rodent hepatocarcinogen, in human liver samples. *Carcinogenesis* 34, 5/2013, S. 1025–1030.
- Hesse, M. (2012): 1H-Kernresonanz-Spektroskopie. In: Hesse, M., H. Meier, B. Zeeh (Hrsg.): *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 114 Tabellen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 115–170.
- Hewitt, N. J., P. Hewitt (2004): Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. *Xenobiotica* 34, 3/2004, S. 243–256.
- Howes, A. J., V.S.W. Chan, J. Caldwell (1990): Structure-specificity of the genotoxicity of some naturally occurring alkenylbenzenes determined by the unscheduled DNA synthesis assay in rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology* 28, 8/1990, S. 537–542.
- Ishii, Y., Y. Suzuki, D. Hibi, M. Jin, K. Fukuhara, T. Umemura, A. Nishikawa (2011): Detection and quantification of specific DNA adducts by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the livers of rats given estragole at the carcinogenic dose. *Chemical Research in Toxicology* 24, 4/2011, S. 532–541.
- Ito, M., Y. Katono, A. Oda, N. Hirasawa, M. Hiratsuka (2015): Functional characterization of 20 allelic variants of CYP1A2. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 30, 3/2015, S. 247–252.
- Iyer, L. V., M. N. Ho, W. M. Shinn, W. W. Bradford, M. J. Tanga, S. S. Nath, C. E. Green (2003): Glucuronidation of 1'-hydroxyestragole (1'-HE) by human UDP-glucuronosyltransferases UGT2B7 and UGT1A9. *Toxicological Sciences* 73, 1/2003, S. 36–43.
- Jenner, P. M., E. C. Hagan, J. M. Taylor, E. L. Cook, O. G. Fitzhugh (1964): Food flavourings and compounds of related structure I. Acute oral toxicity. *Food and Cosmetics Toxicology* 2, 1964, S. 327–343.
- Jeurissen, S. M. F., A. Punt, M. G. Boersma, J. J. P. Bogaards, Y. C. Fiamegos, B. Schilter, P. J. van Bladeren, N. H. P. Cnubben, I. M. C. M. Rietjens (2007): Human cytochrome p450 enzyme specificity for the bioactivation of estragole and related alkenylbenzenes. *Chemical Research in Toxicology* 20, 5/2007, S. 798–806.
- Jiang, H., S. Panda, N. O. Gekara (2019): Comet and micronucleus assays for analyzing DNA damage and genome integrity. *Methods in Enzymology* 625, 2019, S. 299–307.
- Kirsch-Volders, M., A. Elhajouji, E. Cundari, P. van Hummelen (1997): The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome

- breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 392, 1-2/1997, S. 19–30.
- Knasmüller, S., W. Parzefall, R. Sanyal, S. Ecker, C. Schwab, M. Uhl, V. Mersch-Sundermann, G. Williamson, G. Hietsch, T. Langer, F. Darroudi, A. T. Natarajan (1998): Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 402, 1-2/1998, S. 185–202.
- Kobets, T., J.-D. Duan, K. D. Brunnemann, S. Etter, B. Smith, G. M. Williams (2016): Structure-Activity Relationships for DNA Damage by Alkenylbenzenes in Turkey Egg Fetal Liver. *Toxicological Sciences: an Official Journal of the Society of Toxicology* 150, 2/2016, S. 301–311.
- Koeduka, T., T. J. Baiga, J. P. Noel, E. Pichersky (2009): Biosynthesis of t-anethole in anise: characterization of t-anol/iseugenol synthase and an O-methyltransferase specific for a C7-C8 propenyl side chain. *Plant Physiology* 149, 1/2009, S. 384–394.
- Koeduka, T., G. V. Louie, I. Orlova, C. M. Kish, M. Ibdah, C. G. Wilkerson, M. E. Bowman, T. J. Baiga, J. P. Noel, N. Dudareva, E. Pichersky (2008): The multiple phenylpropene synthases in both *Clarkia breweri* and *Petunia hybrida* represent two distinct protein lineages. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* 54, 3/2008, S. 362–374.
- Kogure, K., M. Ishizaki, M. Nemoto, H. Kuwano, M. Makuuchi (1999): A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery* 6, 2/1999, S. 171–175.
- Krahn, D. F. (1983): Chinese hamster cell mutagenesis: a comparison of the CHO and V79 systems. *Annals of the New York Academy of Sciences* 407, 1983, S. 231–238.
- Kruepunga, N., T. B. M. Hakvoort, J. P. J. M. Hikspoors, S. E. Köhler, W. H. Lamers (2019): Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease* 1865, 5/2019, S. 869–878.
- Kumar, S. G., R. Lipman, J. Cummings, M. Tomasz (1997): Mitomycin C-DNA adducts generated by DT-diaphorase. Revised mechanism of the enzymatic reductive activation of mitomycin C. *Biochemistry* 36, 46/1997, S. 14128–14136.
- Levorato, S., L. Dominici, C. Fatigoni, C. Zadra, R. Pagiotti, M. Moretti, M. Villarini (2018): In vitro toxicity evaluation of estragole-containing preparations derived from *Foeniculum vulgare* Mill. (fennel) on HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology* 111, 2018, S. 616–622.
- Lewinsohn, E., I. Ziv-Raz, N. Dudai, Y. Tadmor, E. Lastochkin, O. Larkov, D. Chaimovitsh, U. Ravid, E. Putievsky, E. Pichersky, Y. Shoham (2000): Biosynthesis of estragole and methyl-eugenol in sweet basil (*Ocimum basilicum* L). Developmental and chemotypic association of allylphenol O-methyltransferase activities. *Plant Science* 160, 1/2000, S. 27–35.

- Lewis, D. F., J. M. Pratt (1998): The P450 catalytic cycle and oxygenation mechanism. *Drug Metabolism Reviews* 30, 4/1998, S. 739–786.
- Liu, C., S. Sekine, B. Song, K. Ito (2017): Use of Primary Rat Hepatocytes for Prediction of Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction. *Current Protocols in Toxicology* 72, 2017, 14.16.1-14.16.10.
- Lu, Y., A. I. Cederbaum (2008): CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radical Biology & Medicine* 44, 5/2008, S. 723–738.
- Lutz, W. K., R. W. Lutz (2009): Statistical model to estimate a threshold dose and its confidence limits for the analysis of sublinear dose-response relationships, exemplified for mutagenicity data. *Mutation Research* 678, 2/2009, S. 118–122.
- Maron, D. M., B. N. Ames (1983): Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(3-4), 173-215. *Mutation Research - Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 113, 3-4/1983, S. 173–215.
- Martins, C., R. Cação, K. J. Cole, D. H. Phillips, A. Laires, J. Rueff, A. S. Rodrigues (2012): Estragole: a weak direct-acting food-borne genotoxin and potential carcinogen. *Mutation Research* 747, 1/2012, S. 86–92.
- Martins, C., J. Rueff, A. S. Rodrigues (2018): Genotoxic alkenylbenzene flavourings, a contribution to risk assessment. *Food and Chemical Toxicology* 118, 2018, S. 861–879.
- Michalopoulos, G., H. C. Pitot (1975): Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. *Experimental Cell Research* 94, 1/1975, S. 70–78.
- Mihats, D., L. Pilsbacher, R. Gabernig, M. Routil, M. Gutternigg, R. Laenger (2017): Levels of estragole in fennel teas marketed in Austria and assessment of dietary exposure. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 68, 5/2017, S. 569–576.
- Miller, E. C., A. B. Swanson, D. H. Phillips, T. L. Fletcher, A. Liem, J. A. Miller (1983): Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. *Cancer Research* 43, 3/1983, S. 1124–1134.
- Miller, J. A., E. C. Miller (1983): The metabolic activation and nucleic acid adducts of naturally-occurring carcinogens: recent results with ethyl carbamate and the spice flavors safrole and estragole. *British Journal of Cancer* 48, 1/1983, S. 1–15.
- Müller, L., P. Kasper, K. Müller-Tegethoff, T. Petr (1994): The genotoxic potential in vitro and in vivo of the allyl benzene etheric oils estragole, basil oil and. *Mutation Research Letters* 325, 4/1994, S. 129–136.

- Munshi, S., R. C. Twining, R. Dahl (2014): Alamar blue reagent interacts with cell-culture media giving different fluorescence over time: potential for false positives. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 70, 2/2014, S. 195–198.
- Murray, B. P., R. J. Edwards, S. Murray, A. M. Singleton, D. S. Davies, A. R. Boobis (1993): Human hepatic CYP1A1 and CYP1A2 content, determined with specific anti-peptide antibodies, correlates with the mutagenic activation of PhIP. *Carcinogenesis* 14, 4/1993, S. 585–592.
- Natarajan, A. T., F. Darroudi (1991): Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. *Mutagenesis* 6, 5/1991, S. 399–403.
- Nath, S., L. Nahar, S. D. Sarker (2019): Phenylpropanoids (Phenylpropenes) in Diets. In: Xiao, J., S. D. Sarker, Y. Asakawa (Hrsg.): *Handbook of Dietary Phytochemicals*. Springer Singapore, Singapore, S. 1–23.
- Nebert, D. W., F. J. Gonzalez (1987): P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annual Review of Biochemistry* 56, 1987, S. 945–993.
- Nesslany, F., D. Parent-Massin, D. Marzin (2010): Risk assessment of consumption of methylchavicol and tarragon: the genotoxic potential in vivo and in vitro. *Mutation Research* 696, 1/2010, S. 1–9.
- Ning, J., J. Louisse, B. Spenkelink, S. Wesseling, I. M. C. M. Rietjens (2017): Study on inter-ethnic human differences in bioactivation and detoxification of estragole using physiologically based kinetic modeling. *Archives of Toxicology* 91, 9/2017, S. 3093–3108.
- Nociari, M. M., A. Shalev, P. Benias, C. Russo (1998): A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* 213, 2/1998, S. 157–167.
- O'Brien, J., I. Wilson, T. Orton, F. Pognan (2000): Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* 267, 17/2000, S. 5421–5426.
- Oda, Y., Y. Zhang, S. Buchinger, G. Reifferscheid, M. Yang (2012): Roles of human sulfotransferases in genotoxicity of carcinogens using genetically engineered umu test strains. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 53, 2/2012, S. 152–164.
- OECD (2016): *In vitro mammalian cell micronucleus test*. OECD Publishing, Paris.
- Oliveira, C. B. S., Y. S. R. Meurer, T. L. Medeiros, A. M. Pohlit, M. V. Silva, T. W. P. Mineo, V. F. Andrade-Neto (2016): Anti-Toxoplasma Activity of Estragole and Thymol in Murine Models of Congenital and Noncongenital Toxoplasmosis. *The Journal of Parasitology* 102, 3/2016, S. 369–376.
- Paini, A., A. Punt, G. Scholz, E. Gremaud, B. Spenkelink, G. Alink, B. Schilter, P. J. van Bladeren, I. M. C. M. Rietjens (2012): In vivo validation of DNA adduct formation by estragole in rats

- predicted by physiologically based biodynamic modelling. *Mutagenesis* 27, 6/2012, S. 653–663.
- Paini, A., J. V. Sala Benito, J. Bessems, A. P. Worth (2017): From in vitro to in vivo: Integration of the virtual cell based assay with physiologically based kinetic modelling. *Toxicology in Vitro* 45, Pt 2/2017, S. 241–248.
- Palma, E., E. J. Doornebal, S. Chokshi (2019): Precision-cut liver slices: a versatile tool to advance liver research. *Hepatology International* 13, 1/2019, S. 51–57.
- Phillips, D. H., P. C. Hanawalt (1982): Repair replication characteristics of human cells exposed to 1'-acetyoxysafrole or 1'-acetoxyestragole. *Carcinogenesis* 3, 8/1982, S. 929–934.
- Phillips, D. H., J. A. Miller, E. C. Miller, B. Adams (1981): Structures of the DNA adducts formed in mouse liver after administration of the proximate hepatocarcinogen 1'-hydroxyestragole. *Cancer Research* 41, 1/1981, S. 176–186.
- Phillips, D. H., M. V. Reddy, K. Randerath (1984): <sup>32</sup>P-post-labelling analysis of DNA adducts formed in the livers of animals treated with safrole, estragole and other naturally-occurring alkenylbenzenes. II. Newborn male B6C3F1 mice. *Carcinogenesis* 5, 12/1984, S. 1623–1628.
- Priest, S. M., T. P. Geisbuhler (2015): Injectable sodium pentobarbital: Stability at room temperature. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 76, 2015, S. 38–42.
- Probert, P. M., J. M. Palmer, W. Alhusainy, A. O. Amer, I. M. C. M. Rietjens, S. A. White, D. E. Jones, M. C. Wright (2016): Progenitor-derived hepatocyte-like (B-13/H) cells metabolise 1'-hydroxyestragole to a genotoxic species via a SULT2B1-dependent mechanism. *Toxicology Letters* 243, 2016, S. 98–110.
- Punt, A., T. Delatour, G. Scholz, B. Schilter, P. J. van Bladeren, I. M. C. M. Rietjens (2007): Tandem mass spectrometry analysis of N<sup>2</sup>-(trans-Isoestragol-3'-yl)-2'-deoxyguanosine as a strategy to study species differences in sulfotransferase conversion of the proximate carcinogen 1'-hydroxyestragole. *Chemical Research in Toxicology* 20, 7/2007, S. 991–998.
- Punt, A., A. P. Freidig, T. Delatour, G. Scholz, M. G. Boersma, B. Schilter, P. J. van Bladeren, I. M. C. M. Rietjens (2008): A physiologically based biokinetic (PBBK) model for estragole bioactivation and detoxification in rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 231, 2/2008, S. 248–259.
- Punt, A., A. Paini, M. G. Boersma, A. P. Freidig, T. Delatour, G. Scholz, B. Schilter, P. J. van Bladeren, I. M. C. M. Rietjens (2009): Use of physiologically based biokinetic (PBBK) modeling to study estragole bioactivation and detoxification in humans as compared with male rats. *Toxicological Sciences* 110, 2/2009, S. 255–269.
- Punt, A., A. Paini, A. Spenkelink, G. Scholz, B. Schilter, P. J. van Bladeren, I. M. C. M. Rietjens (2016): Evaluation of Interindividual Human Variation in Bioactivation and DNA Adduct

- Formation of Estragole in Liver Predicted by Physiologically Based Kinetic/Dynamic and Monte Carlo Modeling. *Chemical Research in Toxicology* 29, 4/2016, S. 659–668.
- Rampersad, S. N. (2012): Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel, Switzerland)* 12, 9/2012, S. 12347–12360.
- Randerath, K., R. E. Haglund, D. H. Phillips, M. V. Reddy (1984): <sup>32</sup>P-post-labelling analysis of DNA adducts formed in the livers of animals treated with safrole, estragole and other naturally-occurring alkenylbenzenes. I. Adult female CD-1 mice. *Carcinogenesis* 5, 12/1984, S. 1613–1622.
- Rietjens, I. M. C. M., S. M. Cohen, S. Fukushima, N. J. Gooderham, S. Hecht, L. J. Marnett, R. L. Smith, T. B. Adams, M. Bastaki, C. G. Harman, S. V. Taylor (2014): Impact of structural and metabolic variations on the toxicity and carcinogenicity of hydroxy- and alkoxy-substituted allyl- and propenylbenzenes. *Chemical Research in Toxicology* 27, 7/2014, S. 1092–1103.
- Rietjens, I. M. C. M., A. Punt, B. Schilter, G. Scholz, T. Delatour, P. J. van Bladeren (2010): In silico methods for physiologically based biokinetic models describing bioactivation and detoxification of coumarin and estragole: implications for risk assessment. *Molecular Nutrition & Food Research* 54, 2/2010, S. 195–207.
- Sangster, S. A., J. Caldwell, A. J. Hutt, A. Anthony, R. L. Smith (1987): The metabolic disposition of methoxy-<sup>14</sup>C-labelled trans-anethole, estragole and p-propylanisole in human volunteers. *Xenobiotica* 17, 10/1987, S. 1223–1232.
- SCF (2001): Opinion on Estragole (1-Allyl-4-methoxybenzene).
- Schildwächter, A. (2020): Forschungsarbeit zum Thema Mutagenität von Estragol mittels Mikrokerntest. Forschungsarbeit, Kaiserslautern.
- Schwarz, M., A. Braeuning, H. Marquardt, R. Schulte-Hermann (2013): Chemische Kanzerogenese. In: Marquardt, H. (Hrsg.): *Toxikologie. Mit 378 Tabellen*. WVG, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, S. 159–220.
- Seglen, P. O. (1976): Chapter 4 Preparation of Isolated Rat Liver Cells. In: *Methods in cell biology*. Elsevier, Academic Press, Amsterdam [u.a.], S. 29–83.
- Sekizawa, J., T. Shibamoto (1982): Genotoxicity of safrole-related chemicals in microbial test systems. *Mutation Research - Genetic Toxicology* 101, 2/1982, S. 127–140.
- Siano, F., C. Ghizzoni, F. Gionfriddo, E. Colombo, L. Servillo, D. Castaldo (2003): Determination of estragole, safrole and eugenol methyl ether in food products. *Food Chemistry* 81, 3/2003, S. 469–475.
- Smith, C. M., C. K. Nolan, M. A. Edwards, J. B. Hatfield, T. W. Stewart, S. S. Ferguson, E. L. Lecluyse, J. Sahi (2012): A comprehensive evaluation of metabolic activity and intrinsic clearance in

- suspensions and monolayer cultures of cryopreserved primary human hepatocytes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101, 10/2012, S. 3989–4002.
- Smith, R.L., T.B. Adams, J. Doull, V.J. Feron, J.I. Goodman, L.J. Marnett, P.S. Portoghese, W.J. Waddell, B.M. Wagner, A.E. Rogers, J. Caldwell, I.G. Sipes (2002): Safety assessment of allylalkoxybenzene derivatives used as flavouring substances – methyl eugenol and estragole. *Food and Chemical Toxicology* 40, 7/2002, S. 851–870.
- Soldatow, V. Y., E. L. Lecluyse, L. G. Griffith, I. Rusyn (2013): In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicology Research* 2, 1/2013, S. 23–39.
- Solheim, E., R. R. Scheline (1973): Metabolism of alkenebenzene derivatives in the rat. I. p-Methoxyallylbenzene (Estragole) and p-methoxypropenylbenzene (Anethole). *Xenobiotica* 3, 8/1973, S. 493–510.
- Sono, M., M. P. Roach, E. D. Coulter, J. H. Dawson (1996): Heme-Containing Oxygenases. *Chemical Reviews* 96, 7/1996, S. 2841–2888.
- Stegmüller, S., D. Schrenk, A. T. Cartus (2018): Formation and fate of DNA adducts of alpha- and beta-asarone in rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology* 116, Pt B/2018, S. 138–146.
- Steinbrecht, S., N. Pfeifer, N. Herzog, N. Katzenberger, C. Schulz, S. Kammerer, J.-H. Küpper (2020): HepG2-1A2 C2 and C7: Lentivirus vector-mediated stable and functional overexpression of cytochrome P450 1A2 in human hepatoblastoma cells. *Toxicology Letters* 319, 2020, S. 155–159.
- Suzuki, Y., T. Umemura, D. Hibi, T. Inoue, M. Jin, Y. Ishii, H. Sakai, T. Nohmi, T. Yanai, A. Nishikawa, K. Ogawa (2012a): Possible involvement of genotoxic mechanisms in estragole-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Archives of Toxicology* 86, 10/2012, S. 1593–1601.
- Suzuki, Y., T. Umemura, Y. Ishii, D. Hibi, T. Inoue, M. Jin, H. Sakai, Y. Kodama, T. Nohmi, T. Yanai, A. Nishikawa, K. Ogawa (2012b): Possible involvement of sulfotransferase 1A1 in estragole-induced DNA modification and carcinogenesis in the livers of female mice. *Mutation Research* 749, 1-2/2012, S. 23–28.
- Swanson, A. B., D. D. Chambliss, J. C. Blomquist, E. C. Miller, J. A. Miller (1979): The mutagenicities of safrole, estragole, eugenol, trans-anethole, and some of their known or possible metabolites for *Salmonella typhimurium* mutants. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 60, 2/1979, S. 143–153.
- Swanson, A. B., E. C. Miller, J. A. Miller (1981): The side-chain epoxidation and hydroxylation of the hepatocarcinogens safrole and estragole and some related compounds by rat and mouse liver microsomes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 673, 1981, S. 504–516.
- Swift, B., N. D. Pfeifer, K. L. R. Brouwer (2010): Sandwich-cultured hepatocytes: an in vitro model to evaluate hepatobiliary transporter-based drug interactions and hepatotoxicity. *Drug Metabolism Reviews* 42, 3/2010, S. 446–471.

- Taylor, J. M., P. M. Jenner, W. I. Jones (1964): A comparison of the toxicity of some allyl, propenyl, and propyl compounds in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 6, 4/1964, S. 378 – 387.
- Thomas, A. D., J. Fahrer, G. E. Johnson, B. Kaina (2015): Theoretical considerations for thresholds in chemical carcinogenesis. *Mutation research - Reviews in mutation research* 765, 2015, S. 56–67.
- To, L. P., T. P. Hunt, M. E. Andersen (1982): Mutagenicity of trans-anethole, estragole, eugenol, and safrole in the Ames Salmonella typhimurium assay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 28, 6/1982, S. 647–654.
- Töpfer, K., H. Marquardt, S. G. Schäfer, H. Barth (2013): *Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Stuttgart.*
- Tzin, V., G. Galili (2010): New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Molecular Plant* 3, 6/2010, S. 956–972.
- van den Berg, S. J. P. L., W. Alhusainy, P. Restani, I. M. C. M. Rietjens (2014): Chemical analysis of estragole in fennel based teas and associated safety assessment using the Margin of Exposure (MOE) approach. *Food and Chemical Toxicology* 65, 2014, S. 147–154.
- van den Berg, S. J. P. L., P. Restani, M. G. Boersma, L. Delmulle, I. M. C. M. Rietjens (2011): Levels of Genotoxic and Carcinogenic Ingredients in Plant Food Supplements and Associated Risk Assessment. *Food and Nutrition Sciences* 02, 09/2011, S. 989–1010.
- Vaupel, P., H.-G. Schaible, E. Mutschler (2015): *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen. [mit] 158 Tabellen. Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart.*
- Villarini, M., R. Pagiotti, L. Dominici, C. Fatigoni, S. Vannini, S. Levorato, M. Moretti (2014): Investigation of the cytotoxic, genotoxic, and apoptosis-inducing effects of estragole isolated from fennel (*Foeniculum vulgare*). *Journal of Natural Products* 77, 4/2014, S. 773–778.
- Vogt, T. (2010): Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3, 1/2010, S. 2–20.
- Wakazono, H., I. Gardner, E. Eliasson, M. W. Coughtrie, J. G. Kenna, J. Caldwell (1998): Immunochemical identification of hepatic protein adducts derived from estragole. *Chemical Research in Toxicology* 11, 8/1998, S. 863–872.
- Wätjen, W., R. Kahl (2013): *Morphologie und Funktion der Leber. In: Marquardt, H. (Hrsg.): Toxikologie. Mit 378 Tabellen. WVG, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, S. 299–324.*
- WHO (2009): *Safety evaluation of certain food additives. Rome, Italy, from 17 - 26 June 2008. World Health Organization, Geneva.*
- Wilkening, S., F. Stahl, A. Bader (2003): Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals* 31, 8/2003, S. 1035–1042.

- Winkel, B. S. J. (2004): Metabolic channeling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 55, 2004, S. 85–107.
- Wiseman, R. W., T. R. Fennell, J. A. Miller, E. C. Miller (1985): Further characterization of the DNA adducts formed by electrophilic esters of the hepatocarcinogens 1'-hydroxysafrole and 1'-hydroxyestragole in vitro and in mouse liver in vivo, including new adducts at C-8 and N-7 of guanine residues. *Cancer Research* 45, 7/1985, S. 3096–3105.
- Wiseman, R. W., E. C. Miller, J. A. Miller, A. Liem (1987): Structure-activity studies of the hepatocarcinogenicities of alkenylbenzene derivatives related to estragole and safrole on administration to preweanling male C57BL/6J × C3H/HeJ F1 mice. *Journal of Ethnopharmacology* 22, 3/1987, S. 319.
- Yang, S., M. Diem, J. D. H. Liu, S. Wesseling, J. Vervoort, C. Oostenbrink, I. M. C. M. Rietjens (2020a): Cellular levels and molecular dynamics simulations of estragole DNA adducts point at inefficient repair resulting from limited distortion of the double-stranded DNA helix. *Archives of Toxicology* 94, 4/2020, S. 1349–1365.
- Yang, S., S. Wesseling, I. M. C. M. Rietjens (2020b): Estragole DNA adduct accumulation in human liver HepaRG cells upon repeated in vitro exposure. *Toxicology Letters*, 2020, S. 1–6.
- Zanger, U. M., M. Schwab (2013): Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* 138, 1/2013, S. 103–141.
- Zangouras, A., J. Caldwell, A. J. Hutt, R. L. Smith (1981): Dose dependent conversion of estragole in the rat and mouse to the carcinogenic metabolite, 1 -hydroxyestragole. *Biochemical Pharmacology* 30, 11/1981, S. 1383–1386.
- Zeller, A., K. Horst, M. Rychlik (2009): Study of the metabolism of estragole in humans consuming fennel tea. *Chemical Research in Toxicology* 22, 12/2009, S. 1929–1937.
- Zhou, G.-D., B. Moorthy, J. Bi, K. C. Donnelly, K. Randerath (2007): DNA adducts from alkoxyallylbenzene herb and spice constituents in cultured human (HepG2) cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 48, 9/2007, S. 715–721.
- Zurlo, J., L. M. Arterburn (1996): Characterization of a primary hepatocyte culture system for toxicological studies. *In vitro Cellular & Developmental Biology: Animal* 32, 4/1996, S. 211–220.

## Lebenslauf

### Lebenslauf

#### Beruflicher Werdegang

- Mai 2021: Assistant Manager Regulatory Affairs bei SCC – Scientific (Consulting Company GmbH)
- Okt. 2018 – Sep. 2020: Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis Prof. Dr. Richling (Lebensmittelchemie und Toxikologie, TU Kaiserslautern)
- Mai 2016 – Sep. 2018: Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. Schrenk (Lebensmittelchemie und Toxikologie, TU Kaiserslautern)

#### Hochschulbildung

- Mai 2016 – Sep. 2019: Durchführung der praktischen Arbeiten zu Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Schrenk (Lebensmittelchemie und Toxikologie, TU Kaiserslautern)
- Apr. 2016: Abschluss als Diplom Lebensmittelchemikerin
- Okt. 2011 – Apr. 2016 Studium der Lebensmittelchemie, TU Kaiserslautern
- Wintersemester 15/16: Diplomarbeit im Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. Schrenk unter Leitung von Junior-Prof. Dr. Alexander Cartus (Lebensmittelchemie und Toxikologie, TU Kaiserslautern)  
„Metabolismus und toxikologische Eigenschaften ausgewählter Phenazinderivate“
- Wintersemester 14/15: Forschungspraktikum im Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. Schrenk unter Leitung von Dr. Hans-Joachim Schmitz (Lebensmittelchemie und Toxikologie, TU Kaiserslautern)  
„Einfluss von Isolations- und Kulturbedingungen auf Zytotoxizitätstests in Rattenhepatozyten“

#### Weiterbildungen:

- Seit 2017: Teilnahme an der Weiterbildung zum/zur "Fachtoxikologe/in GT" der Gesellschaft für Toxikologie
- Grundlagen der Organtoxikologie und -pathologie I
  - Grundlagen der Organtoxikologie und -pathologie II
  - Versuchstierkunde I und Biostatistik
  - Molekulare Zelltoxikologie
- Nov. 2017: Lehrgang zur „Sicherheit in der Gentechnik“

#### Mitgliedschaft:

- seit 2017: DGPT (Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie)

## **Publikationen**

### **Peer-review Artikel:**

#### September 2020 (Toxicology)

Ruth Schulte-Hubbert, Jan-Heiner Küpper, Adam D. Thomas, Dieter Schrenk

*Estragole: DNA adduct formation in primary rat hepatocytes and genotoxic potential in HepG2-CYP1A2 cells*

#### Dezember 2020 (Food and chemical toxicology)

Lan Gao, Christine Schäfer, Katja O'Reardon, Eva Gorgus, Ruth Schulte-Hubbert, Dieter Schrenk

*The mutagenic potency of onion juice vs. its contents of quercetin and rutin Food and Chemical Toxicology*

### **Kurzvortrag:**

#### DGPT2018 (Göttingen):

Time and concentration dependent DNA adduct formation after incubation of primary rat hepatocytes with estragole

### **Poster:**

#### DGPT2019 (Stuttgart):

Investigation of DNA adduct formation from estragole in primary rat

#### 47. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2018 (Berlin):

Bestimmung von DNA-Addukten des Estragols in pRH mittels Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse und Internem Standard

#### Regionalverbandstagung Südwest, 2018 (Karlsruhe):

Mutagenität von Zwiebelsaft sowie den Inhaltsstoffen Quercetin und Rutin

#### Eurotox 2017 (Bratislava):

DNA adduct formation in rat hepatocytes after incubation with estragole

#### 46. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2017 (Würzburg)

DNA-Addukt-Bildung in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit Estragol

#### SOT 2017 (Baltimore):

AhR activating potency, metabolism and impact on CYP1A1/2 activity of microbial phenazine derivatives (PD)

#### DGPT 2017 (Heidelberg):

The natural food constituent estragole forms covalent DNA adducts in primary rat hepatocytes

#### 45. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2016 (Freising):

Toxikologische Untersuchung von Phenazin und mikrobiellen Phenazinderivaten (Konataminen) in Trinkwasser)

#### Eurotox 2016 (Sevilla):

CYP-inducing potency and metabolism of arylhydrocarbon receptor (AhR)-activation microbial phenazine derivatives (PD)

### **Danksagung**

Ich danke Herr Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit meine Dissertation im Arbeitskreis durchzuführen. Ich danke Ihnen für die Freiheiten, die Hilfsbereitschaft bei allen fachlichen Fragen und das, während der Promotion, entgegengebrachte Vertrauen. Auch nach Ausscheiden aus dem aktiven Dienst standen Sie immer mit Rat und Tat zur Seite. Für die Möglichkeit an vielen Tagungen teilzunehmen möchte ich mich herzlich bedanken. Außerdem bin ich Ihnen dafür dankbar, dass Sie immer ein offenes Ohr und Verständnis für Probleme hatten.

Frau Prof. Dr. Elke Richling danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur. Außerdem danke ich Ihnen für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis Richling nach dem Ausscheiden von Herr Prof. Dr. Dr. Schrenk. Ich danke Ihnen für die Möglichkeit die Laborarbeiten unter Ihrer Führung zu beenden und für die Möglichkeit die Messgeräte mitzubenutzen.

Außerdem danke ich Herr Prof. Dr. Dr. Schrenk und Frau Prof. Dr. Elke Richling für das entgegengebrachte Vertrauen bei der Betreuung des lebensmittelchemischen Praktikums und allen weiteren Aufgaben in den Arbeitskreisen.

Ich danke Herr Prof. Dr. Helmut Sitzmann für die Übernahme des Prüfungsvorsitz. Sie hatten in Form eines Schülerpraktikums mein Interesse an der Chemie geweckt, was zu meiner Entscheidung eines Chemiestudium beigetragen haben. Meine ersten Schritte an der Technischen Universität Kaiserslautern haben mit Ihnen begonnen und es freut mich, dass Sie auch bei meinen letzten Schritten an der Technischen Universität Kaiserslautern eine Rolle spielen.

Alexander Cartus danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit und die hilfreiche und konstruktive Kritik. Ich durfte bereits während meiner Diplomarbeit viel von dir lernen, was mir auf meinem weiteren Weg hilfreich war. Auch während der Doktorarbeit standest du immer mit Rat und Tat zur Seite.

Allen Mitarbeitern der Arbeitskreise der Lebensmittelchemie und Toxikologie danke ich für die Hilfsbereitschaft und gute Arbeitsatmosphäre. Vor allem die regen Diskussionen und der Austausch bei allen fachlichen Problemen war sehr hilfreich. Simone Stegmüller danke ich für die gute Starthilfe in das Thema. Im speziellen Danke ich Julia Fuhlbrueck für die Diskussionen und Hilfe bei wissenschaftlichen Problemen. Vor allem konnte ich dich bei allen Fragen im Bezug auf die Formatierung und Typographie in der Endphase beim Schreiben der Arbeit jeder Zeit nerven. Außerdem hattest du auch immer ein offenes Ohr für die alltäglichen Probleme. Melanie Abel Beckmann und Janina Leidner danke ich für die Durchführung der Perfusionen. Nina Seiwert danke ich für die Durchführung der Western-Blot Analysen.

Besonderer Dank geht an Eva Gorgus und Janina Leidner. Ihr habt mit grade während der praktischen Phase meiner Laborarbeit immer den Rücken im lebensmittelchemischen Praktikum freigehalten und mir viel Arbeit abgenommen. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich

## Danksagung

gewesen. Weiterhin danke ich Aribert Vetter, von dem ich gerade am Anfang viel Hilfestellung in technischen Fragen bekommen habe. Vor allem das gemeinsame reparieren von diversen HPLC-Geräten hat geholfen auch später das ein oder andere technische Problem zu lösen.

Julia, Janina und Nadine euch danke ich für die entstandene Freundschaft. Dank euch hatte man auch an schlechten Tagen immer etwas zu lachen. Selbst wenn im Labor alles schief ging und das ein oder andere Gerät mal wieder Zicken gemacht hat war mit euch die Stimmung immer positiv.

Allen Praktikanten des lebensmittelchemischen Praktikums, Bacheloranten und anderen Studenten, die ich im Laufe der Zeit betreut habe danke ich für ihr Engagement in den Praktika und Abschlussarbeiten. Außerdem bin ich dankbar, dass Ihr auch mal Verständnis hattet, wenn Ihr das ein oder andere Mal auf mich warten musstet.

Dem Team von Matrix BJJ danke ich dafür, dass es im Laufe der Zeit zu meiner zweiten Familie geworden ist. Auch an stressigen Tagen und schweren Zeiten hat mir das Training immer geholfen den Alltagsstress zu vergessen und neue Kraft zu schöpfen. Dabei geht besondere Dank an René, dafür dass du auch neben dem Training immer ein offenes Ohr für Probleme aller Art hattest.

Ganz besondere Dank geht an meine Eltern und meinen Bruder die immer für mich da waren und mich auch in schwierigen Zeiten immer unterstützt haben. Ich danke euch für die immer offenen und ehrlichen Worte. Gerade bei persönlichen Entscheidungen standet ihr mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Ich danke euch auch dafür, dass ihr mich bei der Promotion unterstützt habt und beim Korrekturlesen der Arbeit geholfen habt. Für die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung der Bilder für das Titelblatt danke ich dir, Felix.

## Erklärung

### **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Ruth Schulte-Hubbert, die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Estragol: Bestimmung von DNA-Addukten in primären Rattenhepatozyten und genotoxisches Potential“

selbständig verfasst und dabei nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben. Alle Ergebnisse anderer Personen wurden entsprechend gekennzeichnet.

Bestandteile dieser Arbeit wurden während der Promotion bereits vor der Einreichung dieser Dissertation auf Tagungen und in Printmedien (siehe Publikationen) veröffentlicht.

Die vorliegende Dissertation habe ich weder in Teilen noch im Ganzen als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht und kein anderes Promotionsverfahren bei einer Hochschule beantragt oder eröffnet. Die geltende Prüfungsordnung des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern vom 25. März 2014 ist mir bekannt.

Kaiserslautern, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Ruth Schulte-Hubbert

## **Anhang**

Alle Rohdaten und Berechnungen der Ergebnisse, sowie die Daten zur Erstellung der Chromatogramme sind im digitalen Anhang auf der beiliegenden Daten-CD zu finden.

### **Inhaltsverzeichnis Anhang**

- I. Vergleich Zytotoxizität von Estragol in HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h
- II. Zytotoxizität von Estragol in V79-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h bzw. einer Inkubationszeit von 24 h und einer Nachinkubationszeit von 18 h
- III. Zusammenfassung der Werte des Resazurin-Reduktionstest
- IV. Einzeldaten der Auszählung des Mikrokerntests
- V. NMRs
  - i. 1'-Hydroxyestragol
  - ii. (*E*)-3'-Hydroxyisoestragol
  - iii. 1'-Acetoxyestragol
  - iv. (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol
  - v. *N*<sup>2</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin synthetisiert über 1'-Acetoxyestragol
  - vi. *N*<sup>2</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin synthetisiert über (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol
  - vii. *N*<sup>6</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin synthetisiert über 1'-Acetoxyestragol
  - viii. *N*<sup>6</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin synthetisiert über (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol

## **Inhaltsverzeichnis elektronischer Anhang**

1. Rohdaten
  - (1) NMRs
  - (2) Resazurin-Reduktionstest
  - (3) Mikrokerntest
  - (4) HPLC-MS-Daten
  - (5) HPLC-UV\_Vis-Messungen
  - (6) Sonstiges
2. Auswertungen
  - (1) NMRs
  - (2) Resazurin-Reduktionstest
  - (3) HPLC-MS-Messungen
3. Diagramme
  - (1) Reaktivität gegenüber DNA-Basen\_Synthese
  - (2) Methodenentwicklung
  - (3) Resazurin-Reduktionstest\_Mikrokerntest
  - (4) DNA-Adduktbildung
  - (5) Fotos
4. Literatur
5. Methoden und Messdaten
  - (1) Datensicherung HPLCs
  - (2) Datensicherung MS\_API2000
  - (3) Datensicherung MS\_API3200
  - (4) Datensicherung MS\_QTrap
6. Erstveröffentlichung
7. Elektronische Fassung

## I. Vergleich Zytotoxizität von Estragol in HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h

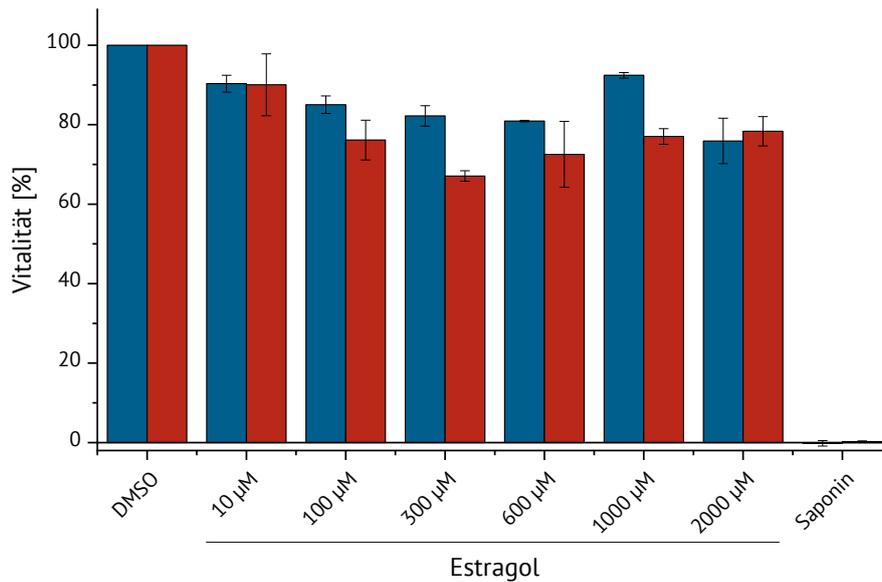


Abbildung 48: Vergleich der Ergebnisse des Resazurin-Reduktionstest nach Inkubation von HepG2-Zellen (blau) bzw. HepG2-CYP1A2-Zellen (rot) mit Estragol für 24 h im Konzentrationsbereich von 10–2.000 µM Estragol. Die Vitalität ist angegeben in % bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO). Bei der Angabe der Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3). Die statistische Signifikanz gibt den Unterschied zwischen den Zelllinien an. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student-Newman-Keuls-Test.

## II. Zytotoxizität von Estragol in V79-Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h bzw. einer Inkubationszeit von 24 h und einer Nachinkubationszeit von 18 h

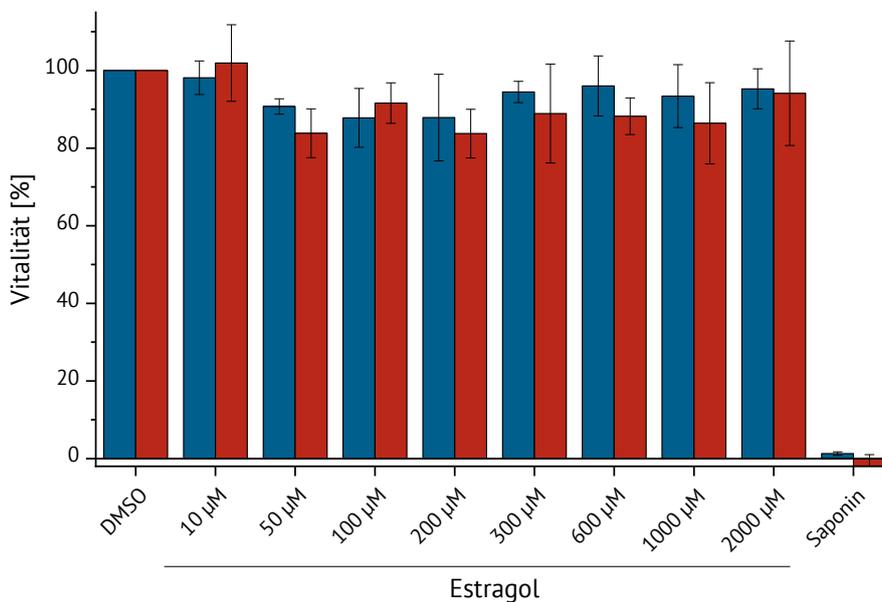


Abbildung 49: Ergebnisse des Resazurin-Reduktionstest nach Inkubation von V79-Zelle mit Estragol nach einer Inkubationszeit von 24 h (blau) bzw. 24 h Inkubationszeit und einer Nachinkubationszeit von 18 h (rot) im Konzentrationsbereich von 10–2.000 µM. Die Vitalität ist angegeben in % bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO). Bei der Angabe der Daten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (n=3). Die statistische Signifikanz wurde auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen, wobei für die statistische Auswertung alle Messwerte auf die Mediumkontrolle normiert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Student-Newman-Keuls-Test.

### III. Zusammenfassung der Werte des Resazurin-Reduktionstest

Tabelle 52: Zusammenfassung der Werte des Resazurin-Reduktionstest in pRH, HepG2-Zellen, HepG2-CYP1A2-Zellen und V79-Zellen. Alle Angaben erfolgen in % bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO)

	pRH (24 h)	HepG2-Zellen (24 h)	HepG2-Zellen (24+72 h)	HepG2-CYP1A2- Zellen (24 h)	HepG2-CYP1A2- Zellen (24+72 h)	V79-Zellen (24 h)	V79-Zellen (24+18 h)
0,1 % DMSO	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
10 µM Estragol	98,8 ± 3,4	90,3 ± 2,1	95,9 ± 2,9	90,0 ± 7,8	95,0 ± 1,1	98,1 ± 4,3	101,9 ± 9,9
30 µM Estragol	90,7 ± 8,3	nicht bestimmt	nicht bestimmt	78,9 ± 0,5	78,0 ± 5,5	nicht bestimmt	nicht bestimmt
50 µM Estragol	nicht bestimmt	89,8 ± 2,7	93,9 ± 9,8	nicht bestimmt	nicht bestimmt	90,7 ± 2,0	83,8 ± 6,3
60 µM Estragol	92,3 ± 9,1	nicht bestimmt	nicht bestimmt	73,1 ± 1,6	79,4 ± 4,5	nicht bestimmt	nicht bestimmt
100 µM Estragol	85,7 ± 5,1	85,0 ± 2,2	97,2 ± 4,6	76,1 ± 5,0	76,9 ± 1,0	87,8 ± 7,6	91,6 ± 5,2
200 µM Estragol	nicht bestimmt	83,3 ± 4,5	98,0 ± 5,4	nicht bestimmt	nicht bestimmt	87,9 ± 11,2	83,7 ± 6,3
300 µM Estragol	80,3 ± 7,3	82,2 ± 2,6	101,4 ± 10,0	67,1 ± 1,3	53,1 ± 4,2	94,5 ± 2,7	88,9 ± 12,7
600 µM Estragol	81,0 ± 11,2	80,9 ± 0,2	90,0 ± 4,4	72,5 ± 8,3	55,4 ± 13,5	96,0 ± 7,7	88,2 ± 4,7
1.000 µM Estragol	84,4 ± 4,9	92,4 ± 0,7	94,1 ± 13,2	77,0 ± 2,0	63,9 ± 7,9	93,4 ± 8,1	86,4 ± 10,5
2.000 µM Estragol	75,2 ± 12,6	75,9 ± 5,7	91,4 ± 9,2	78,3 ± 3,7	55,7 ± 10,6	95,3 ± 5,2	94,1 ± 13,5
0,1 % Saponin	0,6 ± 0,2	-0,2 ± 0,7	-0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,2	-0,1 ± 0,0	1,3 ± 0,5	2,0 ± 3,9
0,5 µM MMC	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt	77,5 ± 4,0	30,3 ± 0,9	nicht bestimmt	nicht bestimmt
0,6 µM MMC	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt	78,8 ± 3,4	28,3 ± 0,5	nicht bestimmt	nicht bestimmt

## IV. I. Einzeldaten der Auszählung des Mikrokerntests

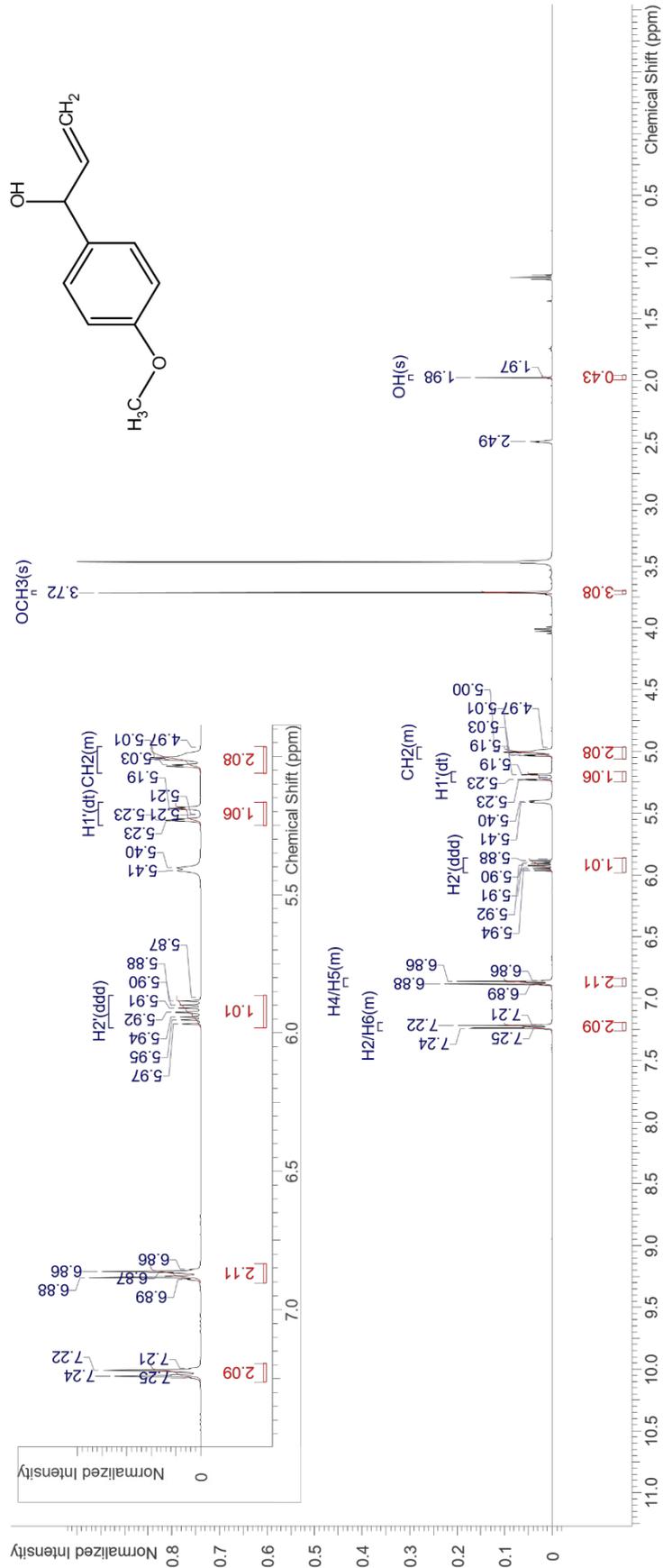
Tabelle 53: Ergebnisse des Auszählens der HepG2-Zellen und HepG2-CYP1A2-Zellen des Mikrokerntest

	HepG2-Zellen Duplikat 1/Duplikat 2 (Mittelwert) [Mikrokerne/1000 Kerne]			HepG2-Zellen Duplikat 1/Duplikat 2 (Mittelwert) [Mikrokerne/1000 Kerne]		
	n1	n2	n3	n1	n2	n3
DMSO	13/12 (12,5)	17/16 (16,5)	16/22 (19)	5/9 (7)	6/5 (5,5)	8/7 (7,5)
0,5 µM MMC	56/- (56)	59/55 (57)	43/51 (47)	69/- (69)	60/- (60)	64/- (64)
1 µM Estragol	10/17 (14,5)	15/13 (14)	13/13 (13)	22/19 (31,5)	20/25 (22,5)	14/23 (18,5)
10 µM Estragol	12/12 (12)	17/14 (22,5)	16/13 (14,5)	20/24 (22)	16/26 (21)	30/27 (28,5)
100 µM Estragol	14/15 (14,5)	19/15 (17)	16/17 (16,5)	35/37 (36)	34/33 (33,5)	31/32 (31,5)
200 µM Estragol	14/15 (14,5)	15/15 (15)	18/19 (18,5)	41/48 (44,5)	46/31 (38,5)	33/42 37,5
300 µM Estragol	15/17 (16)	13/17 (15)	17/17 (17)	48/48 (48)	43/48 (45,5)	54/42 (48)

## V. NMRs

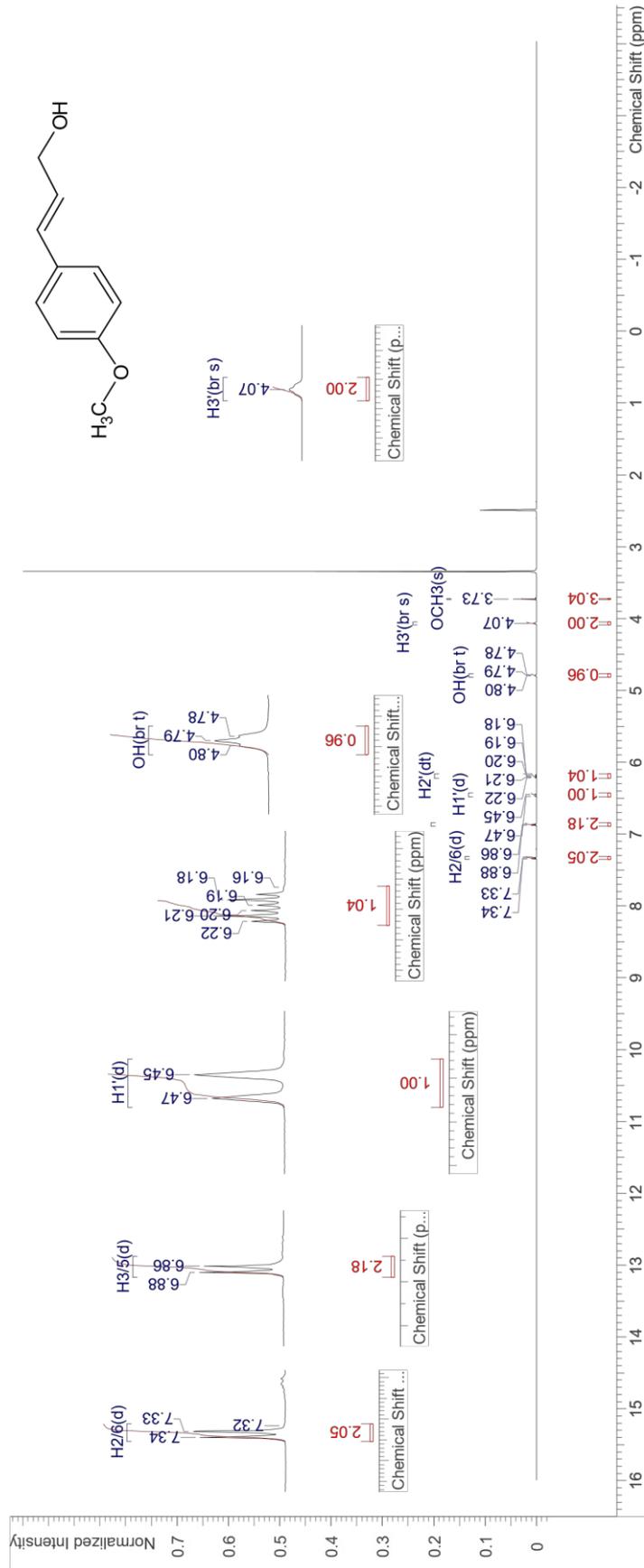
## i. 1'-Hydroxyestragol

Datum: 09.06.2016	Dateiname: RSH25
Frequenz: 400,1300 MHz	Acquisition time: 3,9846 s
Temperatur: 294,8581 K/21,858 °C	Lösungsmittel: DMSO-d6
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d6) $\delta$ [ppm]: 11,98 (s; 1H; OH), 3,72 (s; 3 H; OCH <sub>3</sub> ), 4,96–5,06 (m; 2 H; CH <sub>2</sub> ), 5,21 (dt; <sup>3</sup> J <sub>H1',H2</sub> =16,94 Hz, <sup>4</sup> J <sub>H1',H3</sub> =1,76 Hz; 1 H; H1'), 5,93 (ddd; <sup>3</sup> J <sub>H2',H1</sub> =16,94 Hz, <sup>3</sup> J <sub>H2',H3</sub> =10,20 Hz, <sup>3</sup> J <sub>H2',H5</sub> =5,83 Hz, 1 H; H2'), 6,84–6,90 (m; 2 H; H3/H5), 7,20–7,26 (m; 2 H; H2/H6)	



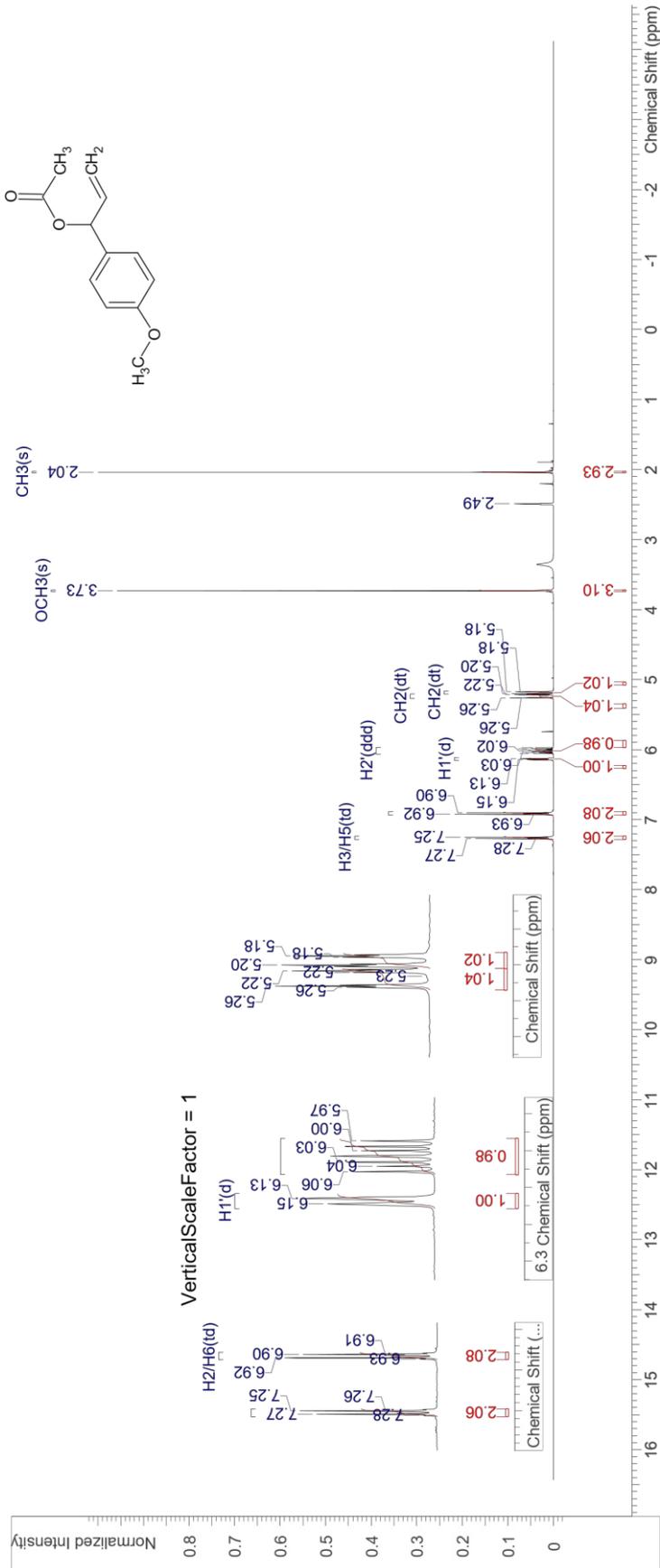
## ii. (E)-3'-Hydroxyisoeustragal

Datum:	23.06.2016	Dateiname:	RSH32
Frequenz:	600,1300 MHz	Acquisition time:	2,7263 s
Temperatur:	295 K/22 °C	Kern:	1H
		Lösungsmittel:	DMSO-d6
<sup>1</sup> H-NMR (600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ [ppm]: 3,73 (s, 3 H), 4,07 (br t, <i>J</i> =4,77 Hz, 1 H), 6,20 (dt, <i>J</i> =15,96, 5,23 Hz, 1 H), 6,46 (d, <i>J</i> =16,14 Hz, 1 H), 6,87 (d, <i>J</i> =8,80 Hz, 2 H), 7,34 (d, <i>J</i> =,44 Hz, 2 H)			



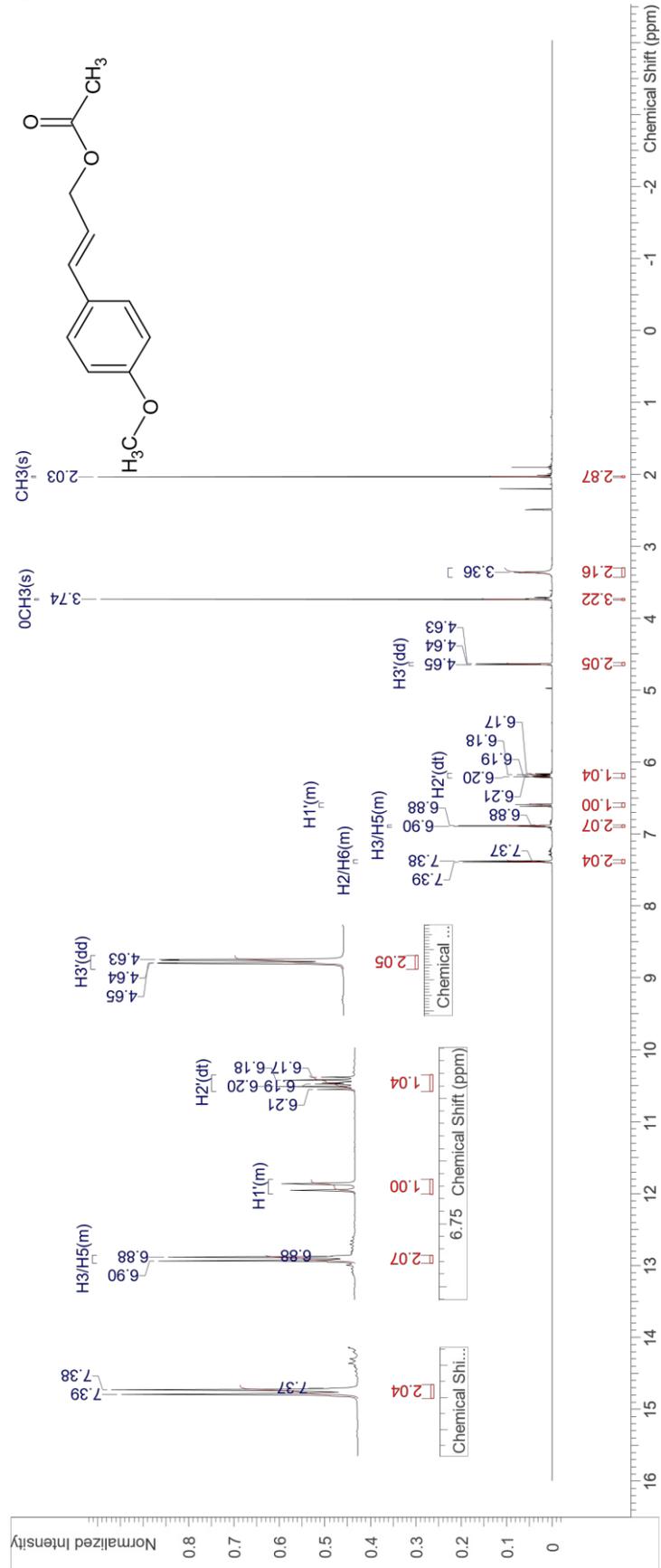
## iii. 1'-Acetoxyestragnol

Datum:	21.06.2016	Dateiname:	RSH28
Frequenz:	400,1300 MHz	Acquisition time:	3,9846 s
Temperatur:	294,9239 K/21,924 °C	Lösungsmittel:	DMSO-d6
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ [ppm]: 2,04 (s; 3 H; CH <sub>3</sub> ), 3,73 (s; 3 H; OCH <sub>3</sub> ), 5,19 (dt; <sup>3</sup> J <sub>CH<sub>2</sub>H<sub>2</sub>'}=10,42 Hz, <sup>2</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>H<sub>2</sub>'}=1,38 Hz; 1 H; CH<sub>2</sub>), 5,24 (dt; <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>H<sub>2</sub>'}=17,07 Hz, <sup>2</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>H<sub>2</sub>'}=1,44 Hz; 1 H; CH<sub>2</sub>), 6,02 (ddd; <sup>3</sup>J<sub>H<sub>2</sub>,CH<sub>2</sub>'}=17,07 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H<sub>2</sub>,CH<sub>2</sub>'}=10,42 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H<sub>1</sub>,H<sub>2</sub>'}=5,90 Hz; 1 H; H<sub>2</sub>'), 6,14 (d; <sup>3</sup>J<sub>H<sub>1</sub>,H<sub>2</sub>'}=5,90 Hz; 1 H; H<sub>1</sub>'), 6,91 (td; <sup>3</sup>J<sub>H<sub>3</sub>,H<sub>2</sub>'/H<sub>5</sub>,H<sub>6</sub>'}=1,00 Hz; 2 H; H<sub>3</sub>/H<sub>5</sub>), 7,26 (td; <sup>3</sup>J<sub>H<sub>2</sub>,H<sub>3</sub>'/H<sub>6</sub>,H<sub>5</sub>'}=1,00 Hz; 2 H; H<sub>2</sub>/H<sub>6</sub>) </sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub></sub>			



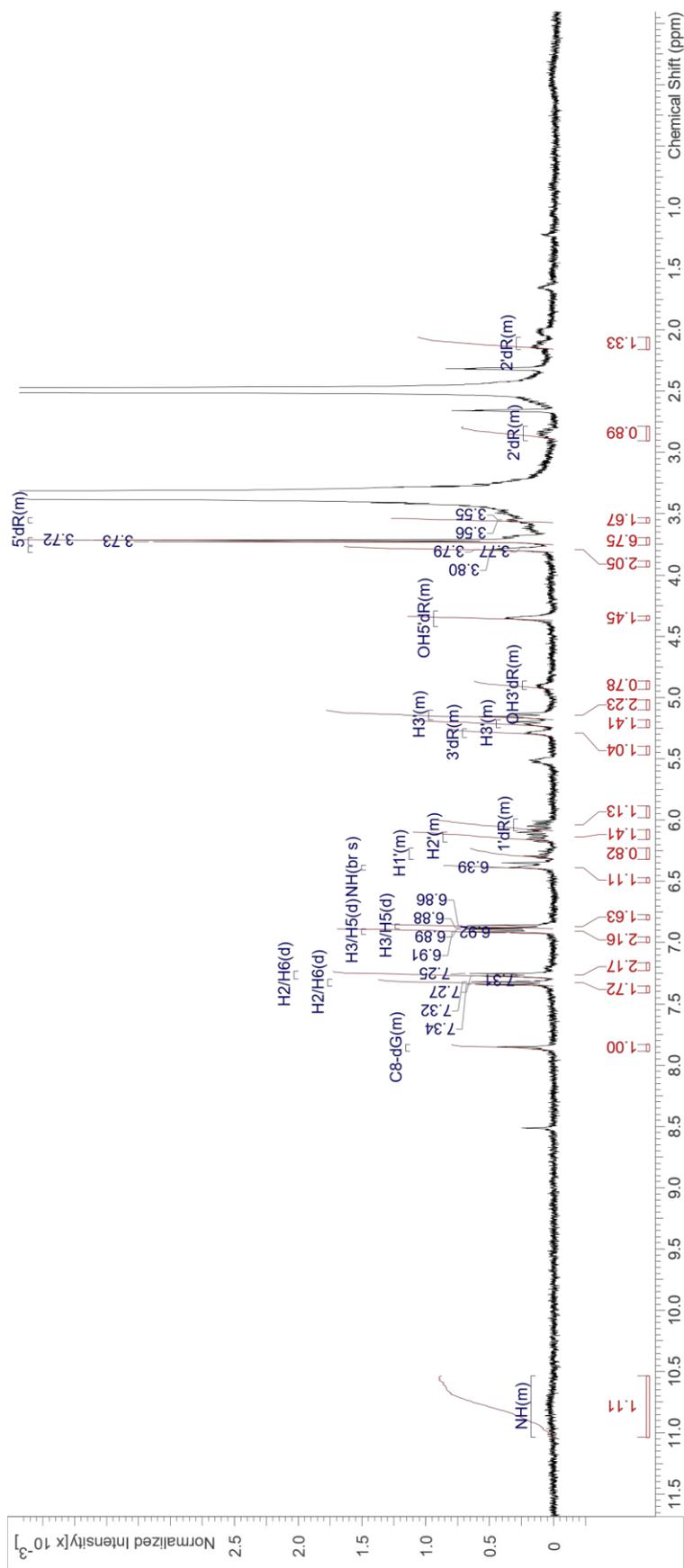
## iv. (E)-3'-Acetoxyisoestragol

Datum:	22.07.2016	Dateiname:	RSH38
Frequenz:	600,1300 MHz	Acquisition time:	2,7263 s
Temperatur:	295 K/22 °C	Lösungsmittel:	DMSO-d6
<sup>1</sup> H-NMR (600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ [ppm]: 22,03 (s; 3 H; CH <sub>3</sub> ), 3,74 (s; 3 H; OCH <sub>3</sub> ), 4,64 (dd; <sup>3</sup> J <sub>H3,H2</sub> =6,60 Hz <sup>4</sup> J <sub>H3,H1</sub> =1,10 Hz; 2 H; H <sub>3</sub> ), 6,19 (dt; <sup>3</sup> J <sub>H2,H1</sub> =15,96 Hz, <sup>3</sup> J <sub>H2,H3</sub> =6,33 Hz; 1 H; H <sub>2</sub> ), 6,57–6,63 (m; 1 H; H <sub>1</sub> '), 6,88–6,91 (m; 2 H; H <sub>3</sub> /H <sub>5</sub> ), 7,36–7,40 (m; 2 H; H <sub>2</sub> /H <sub>6</sub> )			



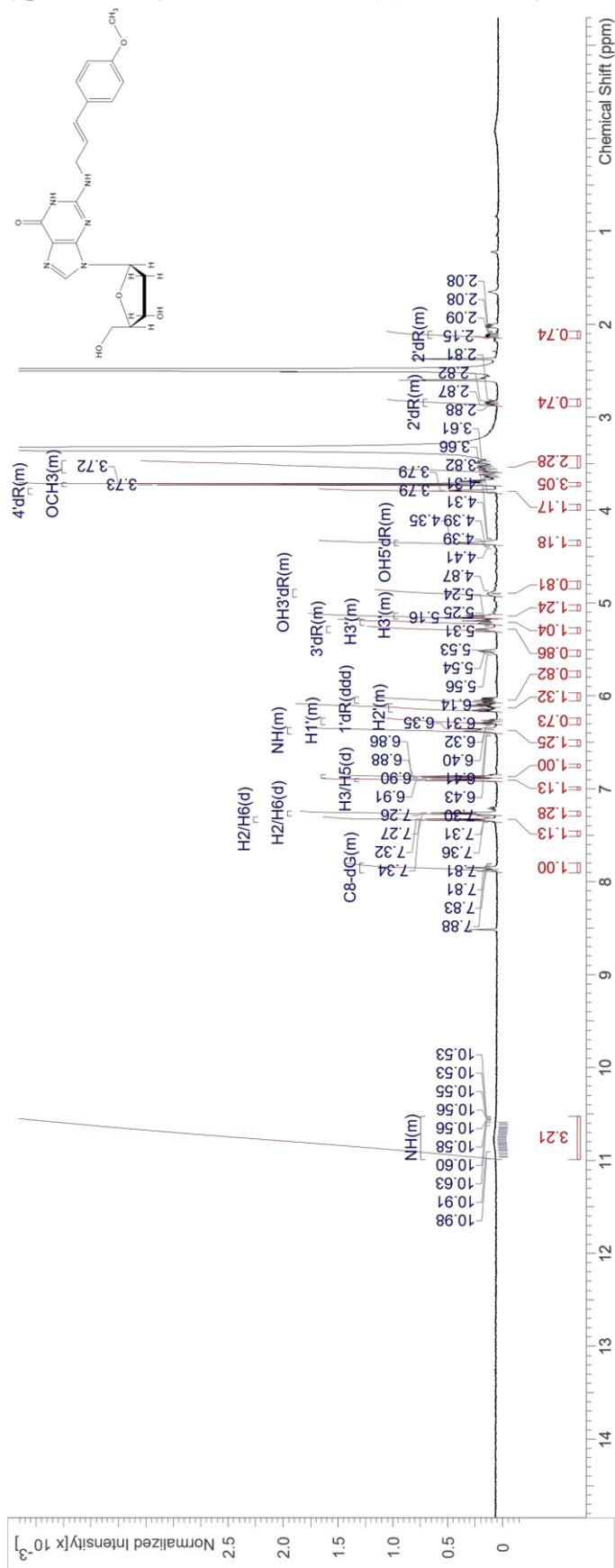
v.  $N^2$ -(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin synthetisiert über 1'-Acetoxyestragol

Datum:	26.07.2016	Dateiname:	RSH39
Frequenz:	400,1300 MHz	Acquisition time:	2,7263 s
Temperatur:	295,4336 K/22,434 °C	Lösungsmittel:	DMSO-d6
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$ [ppm] 2,06–2,16 (m; 1 H; 2'dR), 2,79–2,90 (m; 1 H; 2'dR), 3,54–3,57 (m; 2 H; 5'dR), 3,72 (m; 3 H; OCH $_3$ ), 3,77–3,82 (m; 1 H; 4'dR), 4,30–4,42 (m, 1H, OH5' dR), 4,87–4,94 (m, 1H, OH3' dR), 5,18–5,18 (m; 1 H; H3'), 5,18–5,25 (m; 1 H; H3'), 5,25–5,33 (m; 1 H; H3'), 5,99–6,13 (m; 1 H; 1'dR), 6,23–6,32 (m; 1 H; H2'), 6,23–6,23 (m; 1H; H1'), 6,39 (s; 1 H; NH), 6,87 (d; $^3J_{\text{H3,H2/H45,H6}}=1,00$ Hz; 1 H; H3/H5), 6,91 (d; $^3J_{\text{H3,H2/H45,H6}}=1,00$ Hz; 1 H; H3/H5), 7,27 (d; $^3J_{\text{H2,H3/H6,H5}}=1,00$ Hz; 1 H; H2/H6), 7,33 (d; $^3J_{\text{H2,H3/H6,H5}}=1,00$ Hz; 1 H; H2/H6), 7,83–7,89 (m; 1 H; C8-dG), 10,54–11,04 (m; 1 H; NH)			



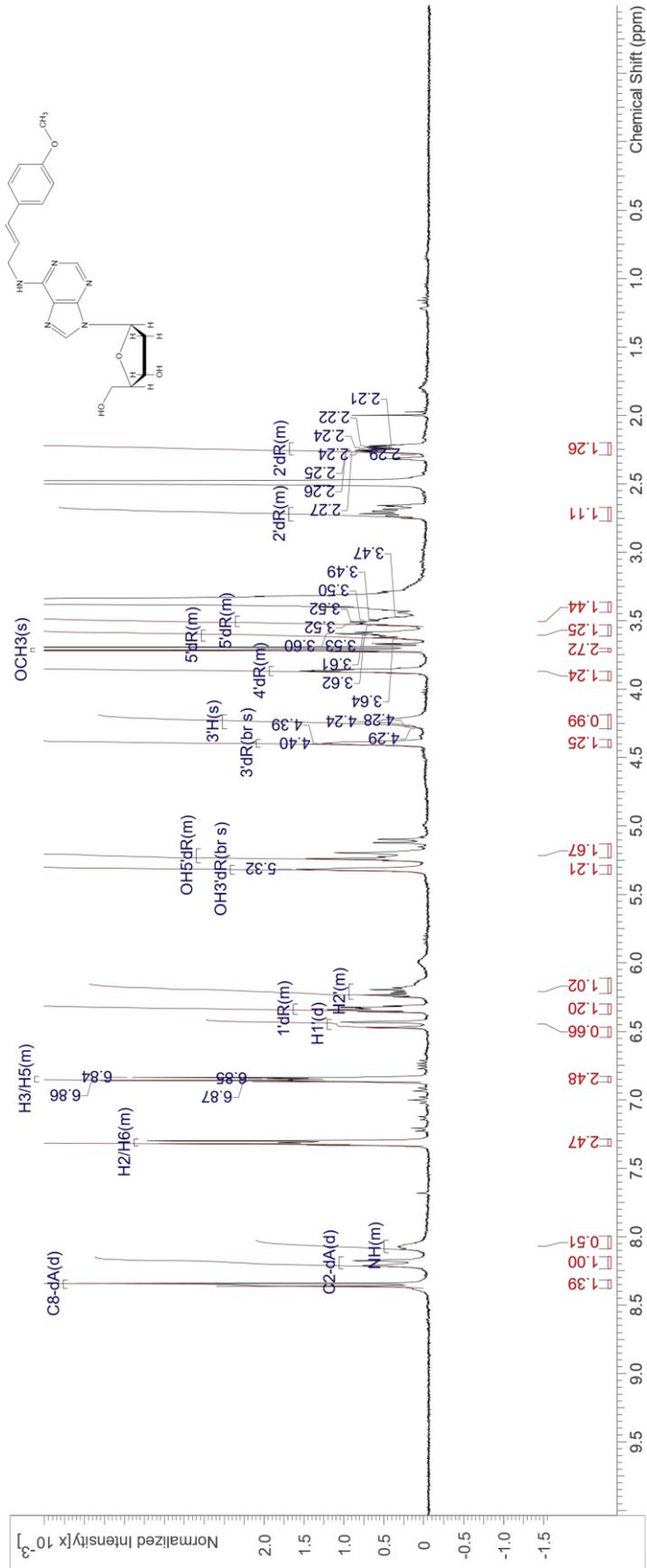
vi. *N*<sup>2</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin synthetisiert über (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol

Datum: 28.07.2016	Dateiname: RSH41
Frequenz: 600,1300 MHz	Acquisition time: 2,7263 s
Temperatur: 295,4336 K/22,434 °C	Kern: 1H
Lösungsmittel: DMSO-d <sub>6</sub>	
<sup>1</sup> H-NMR (600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ [ppm]: 2,07 – 2,15 (m; 1 H; 2'dR), 2,81 – 2,89 (m; 1 H; 2'dR), 3,47 – 3,60 (m; 2 H; 5'dR), 3,71 – 3,75 (m; Hz; 3 H; OCH <sub>3</sub> ), 3,77 – 3,83 (m; 1 H; 4'dR), 4,32 – 4,38 (m; 1 H; OH5'dR), 4,85 – 4,94 (m; 1 H; OH5'dR), 5,11 – 5,17 (m; 1 H; H3'), 5,17 – 5,24 (m; 1 H; H3'), 5,25 – 5,32 (m; 1 H; 3'dR), 6,05 (m, 1 H, 1'dR), 6,08 – 6,18 (m; 1 H; H2'), 6,24 – 6,31 (m; 1 H; H1'), 6,34 – 6,41 (m; 1 H; NH), 6,87 (d; <sup>3</sup> J <sub>H3,H2/H5,H6</sub> =1,00 Hz; 1 H; H3/H5), 6,90 (d; <sup>3</sup> J <sub>H5,H2/H5,H6</sub> =1,00 Hz; 1 H; H3/H5), 7,27 (d; <sup>3</sup> J <sub>H2,H5/H6,H5</sub> =1,00 Hz; 1 H; H2/H6), 7,33 (d; <sup>3</sup> J <sub>H2,H3/H6,H5</sub> =1,00 Hz; 1 H; H2/H6), 7,80 – 7,90 (m; 1 H; C8-dG), 10,52 – 10,99 (m; 1 H; NH)	



vii. N<sup>6</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin synthetisiert über 1'-Acetoxyestragol

Datum: 26.07.2016	Dateiname: RSH40
Frequenz: 400,1300 MHz	Acquisition time: 3,9846 s
Temperatur: 295,4979 K/22,498 °C	Lösungsmittel: DMSO-d <sub>6</sub>
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ [ppm]: 2,20–2,29 (m; 1 H; 2'dR), 2,67–2,77 (m; 1 H; 2'dR), 3,47–3,54 (m; 1 H; 5'dR), 3,57–3,65 (m; 1 H; 5'dR), 3,71 (s; 3 H; OCH <sub>3</sub> ), 3,83–3,90 (m; 1 H; H3), 4,40 (s; 1 H; 3'dR), 4,40 (s; 1 H; 3'dR), 5,16–5,27 (m; 2 H; OH5'dR), 5,32 (s; 1 H; OH5'dR), 6,15–6,27 (m; 1 H; H2'), 6,30–6,37 (m; 1 H; 1'dR), 6,45 (d; 1 H; H1'), 6,83–6,87 (m; 2 H; H3/H5), 7,29–7,34 (m; 2 H; H2/H6), 8,02–8,12 (m; 1 H; NH), 8,19 (d; 1 H; C2-dA), 8,35 (d; 1 H; C8-dA)	



viii. *N*<sup>6</sup>-(Isoestragol-3'-yl)-6'-desoxyadenosin synthetisiert über (*E*)-3'-Acetoxyisoestragol

Datum:	28.07.2016	Dateiname:	RSH42
Frequenz:	600,1300 MHz	Acquisition time:	2,7263 s
Temperatur:	295 K/22 °C	Lösungsmittel:	DMSO-d <sub>6</sub>
<sup>1</sup> H-NMR (600 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) δ [ppm]: 2,20–2,28 (m; 1 H; 2'dR), 2,67–2,75 (m; 1 H; 2'dR), 3,47–3,53 (m; 1 H; 5'dR), 3,56–3,63 (m; 1 H; 5'dR), 3,72 (s; 3 H; OCH <sub>3</sub> ), 3,84–3,89 (m; 1 H; 4'dR), 4,23 (s; 1 H; H <sub>3</sub> '), 4,40 (s; 1 H; 3'dR), 5,17–5,26 (m; 2 H; OH <sub>5</sub> 'dR), 5,32 (s; 1 H; OH <sub>3</sub> 'dR), 6,18–6,25 (m; 1 H; H <sub>2</sub> '), 6,30–6,36 (m; 1 H; 1'dR), 6,45 (d; 1 H; H <sub>1</sub> '), 6,83–6,88 (m; 2 H; H <sub>3</sub> /H <sub>5</sub> '), 7,29–7,34 (m; 2 H; H <sub>2</sub> /H <sub>6</sub> '), 8,03–8,10 (m; 1 H; NH), 8,20 (d; 1 H; C2-dA), 8,35 (d; 1 H; C8-dA)			

