

**Metabolismus, Pharmakodynamik und klinische Relevanz
der östrogenen Tamoxifenmetaboliten bei der endokrinen
Therapie des Mammakarzinoms**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Janina Johänning

aus Essen

Tübingen

2018

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

06.11.2018

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Matthias Schwab

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Peter Ruth

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Zusammenfassung	XIII
Abstract	XV
1. Einleitung	1
1.1 Brustkrebs.....	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Risikofaktoren.....	1
1.1.3 Charakteristika der Tumorsubtypen	2
1.2 Endokrine Therapiemöglichkeiten hormonrezeptor-positiver Mammakarzinome	3
1.2.1 Tamoxifen	4
1.3 Metabolismus von Tamoxifen	5
1.3.1 Phase I und II Metabolismus von Tamoxifen	6
1.3.2 Östrogene Tamoxifenmetaboliten	10
1.4 Faktoren für das Therapieansprechen von Tamoxifen	11
1.4.1 Einfluss des Tamoxifenmetabolismus auf den Therapieerfolg	11
1.4.2 Tumorresistenz.....	12
1.5 Zielsetzung.....	13
2. Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Computerprogramme.....	15
2.1.2 Geräte	16
2.1.3 HPLC-Säulen.....	17

II

2.1.4	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	17
2.1.5	Reinsubstanzen und deuterierte interne Standards	18
2.1.6	Puffer und Lösungen	20
2.1.7	Zellkultur.....	21
2.1.8	Humane Lebermikrosomen	23
2.1.9	Aktivkohle behandeltes Plasma und Serum	23
2.1.10	Antikörper.....	23
2.1.11	Oligonukleotide	24
2.2	Methoden	26
2.2.1	HPLC-ESI-MS/MS Analytik von östrogenen Tamoxifenmetaboliten und Sexualhormonen	26
2.2.2	HPLC-MS/MS Analytik von nicht-östrogenen Tamoxifenmetaboliten	32
2.2.3	HPLC-MS/MS Analytik von spezifischen CYP Substraten	36
2.2.4	<i>In vitro</i> Inkubationen zur Untersuchung von Metabolismuszweigen von Tamoxifen	39
2.2.5	<i>In vitro</i> Modulation der Expression und Aktivität von ADME Proteinen und Genen	40
2.2.6	Zellkultur.....	40
2.2.7	<i>In vitro</i> Assay zur Bestimmung der östrogenen Wirkung von Substanzen	42
2.2.8	Behandlung von Zellen mit spezifischen CYP Substraten.....	44
2.2.9	Proteinanalyse	44
2.2.10	Quantifizierung von mRNA-Expression	46
2.2.11	Transkriptomanalyse	47
2.2.12	Klinische Studien	47
2.2.13	Genotypisierung aus Vollblut	51
2.2.14	Statistische Auswertung	51
3.	Ergebnisse	55
3.1	Validierung der HPLC-MS/MS-Analytik von östrogenen Tamoxifenmetaboliten und Sexualhormonen	55
3.1.1	Linearität und Sensitivität	55

3.1.2	Genauigkeit, Variabilität und Präzision	56
3.1.3	Stabilität und Wiederfindung	58
3.1.4	Selektivität, Spezifität und Anwendbarkeit	61
3.2	Eignung von Leberzelllinien als experimentelles Modell	62
3.2.1	Charakterisierung des Fremdstoff-metabolisierenden Systems	63
3.2.2	Validierung der Leberzelllinie	65
3.3	Metabolismus von Tamoxifen zu Bisphenol und Metabolit E.....	67
3.3.1	Identifikation der metabolischen Reaktion zu Bisphenol und Metabolit E.....	68
3.3.2	Identifikation der an der Bildung von Bisphenol und Metabolit E beteiligten CYP-Enzyme	69
3.3.3	Identifikation der UGT-Enzyme für die Umsetzung zu Bisphenol- und Metabolit E-Glucuroniden.....	72
3.3.4	Formationskinetiken von Metabolit E und Bisphenol.....	73
3.3.5	Zeitabhängiger Metabolismus von Tamoxifen in humanen Hepatozyten	74
3.4	Biologische Charakterisierung von Bisphenol und Metabolit E <i>in vitro</i>	77
3.4.1	Östrogene Wirkung	77
3.4.2	Wirkung auf das ADME-System.....	80
3.4.3	Einfluss auf das Transkriptom von MCF7-Zellen	84
3.5	Charakterisierung von Bisphenol und Metabolit E <i>in vivo</i>	87
3.5.1	Metabolit E und Bisphenol in prämenopausalen Frauen unter Tamoxifen	87
3.5.2	Metabolit E und Bisphenol in postmenopausalen Frauen unter Tamoxifen	95
4.	Diskussion	102
4.1	Analytik von Sexualhormonen und östrogenen Tamoxifenmetaboliten	103
4.2	Auswahl und Validierung einer geeigneten Leberzelllinie	105
4.3	Metabolismus zu Bisphenol und Metabolit E.....	108
4.3.1	Charakterisierung der Metabolismuswege zu Bisphenol und Metabolit E <i>in vitro</i>	109
4.3.2	Identifikation metabolischer Vorläufer von Bisphenol und Metabolit E <i>in vivo</i>	111

IV

4.3.3	Einfluss genetischer Polymorphismen auf Plasmakonzentrationen von Bisphenol und Metabolit E	112
4.4	Pharmakodynamik von Tamoxifenmetaboliten	114
4.4.1	Östrogene Eigenschaften von Bisphenol und Metabolit E.....	114
4.4.1	Einfluss auf die CYP-Aktivität und die Expression ADME-assoziiertes Gene	116
4.4.2	Einfluss der Tamoxifentherapie auf die Plasmakonzentrationen von Sexualhormonen in postmenopausalen Frauen.....	118
4.5	Einfluss von Bisphenol und Metabolit E auf den Therapieverlauf	119
	Literaturverzeichnis	120
	Erklärung zu Publikationen	137
	Publikationsliste	138
	Danksagung	140
	Eidesstattliche Erklärung	141

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Wirkungsmechanismus von Tamoxifen und Aromataseinhibitoren.	4
Abbildung 2 Reaktionsmechanismus der Phase I und Phase II des Fremdstoffmetabolismus.	6
Abbildung 3 Ausschnitt des hepatischen Tamoxifenmetabolismus.	9
Abbildung 4 Strukturen von Tamoxifen, Metabolit E und Bisphenol sowie dessen Glucuroniden.	11
Abbildung 5 Derivatisierungsreaktion von Metabolit E mit 3-[(N-Succinimid-1-yl)oxycarbonyl]-1-methylpyridiniumiodid.	28
Abbildung 6 Chromatogramme von Bisphenol und Metabolit E sowie den Sexualhormonen.	62
Abbildung 7 CYP-Aktivität der Leberzelllinien HC-AFW1, HepaRG [®] und den upcyte [®] Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6.	64
Abbildung 8 Konzentrationen der Hauptmetaboliten nach Inkubation von HC-AFW1-, HepaRG [®] , upcyte [®] 653-03- und 653-03 2D6-Zellen mit Tamoxifen.	65
Abbildung 9 Charakterisierung der upcyte [®] Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6 nach Behandlung mit Rifampicin und Phenobarbital.	67
Abbildung 10 Metabolismus zu Metabolit E und Bisphenol aus möglichen Vorläufern in Lebermikrosomen.	69
Abbildung 11 Identifikation der verantwortlichen CYP-Isoenzyme für die Bildung von Metabolit E und Bisphenol.	71
Abbildung 12 Identifikation der verantwortlichen UGT-Enzyme für die Glucuronidierung von (Z)- und (E)-Metabolit E und Bisphenol.	73
Abbildung 13 Zeitabhängiger Metabolismus von Tamoxifen in Hepatozyten über 144 Std.	76
Abbildung 14 Aktivierung des Östrogen-Rezeptors durch Östradiol, (Z)- und (E)-Metabolit E und Bisphenol.	78
Abbildung 15 Aktivierung des Östrogenrezeptors durch Bisphenol, (Z)- und (E)-Metabolit E in Anwesenheit von Endoxifen und Östradiol.	79
Abbildung 16 Modulation der Expression ADME-assoziiierter Gene durch Tamoxifen sowie anti-östrogenen und östrogenen Metaboliten in Hepatozyten.	81

VI

Abbildung 17 Modulation der CYP-Enzymaktivität nach Behandlung mit Tamoxifen, anti-östrogenen und östrogenen Metaboliten in Hepatozyten.....	84
Abbildung 18 Transkriptomanalyse von Östradiol, Endoxifen, Metabolit E und Bisphenol in MCF7-Zellen.....	86
Abbildung 19 Plasmakonzentrationen von Tamoxifen und dessen Metaboliten in prämenopausalen Frauen der POSH-Studie.....	88
Abbildung 20 Einfluss der Polymorphismen von CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 auf das metabolische Verhältnis von Bisphenol und (Z)-Metabolit E zu metabolischen Vorläufern in prämenopausalen Frauen der POSH-Studie.....	90
Abbildung 21 Einfluss der metabolischen Verhältnisse von Metabolit E zu metabolischen Vorläufern auf die rezidivfreie Zeit von prämenopausalen Brustkrebspatientinnen der POSH-Studie.....	94
Abbildung 22 Einfluss des metabolischen Verhältnisses von (E)-Metabolit E zu Tamoxifen auf das rezidivfreie Überleben von prämenopausalen Brustkrebspatientinnen der POSH-Studie.....	95
Abbildung 23 Plasmakonzentrationen von Tamoxifen und dessen Metaboliten in postmenopausalen Frauen der IKP211-Studie nach 6 Monaten unter Tamoxifen.	96
Abbildung 24 Einfluss der Polymorphismen von CYP2C19 und CYP2D6 auf das metabolische Verhältnis von Bisphenol und Metabolit E zu metabolischen Vorläufern in postmenopausalen Frauen der IKP211-Studie.....	99
Abbildung 25 Plasmakonzentrationen der Sexualhormone in postmenopausalen Frauen der IKP211-Studie vor Therapiebeginn (N=129) (a) und nach 6 Monaten unter Tamoxifen (N=376) (b).	100
Abbildung 26 Vorgeschlagenes Modell des Tamoxifenmetabolismus zu Bisphenol und Metabolit E sowie dessen Glucuroniden.	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Computerprogramme.....	15
Tabelle 2 Verwendete Geräte.....	16
Tabelle 3 Verwendete HPLC-Säulen.....	17
Tabelle 4 Verwendete Reinsubstanzen und deuterierte interne Standards.	18
Tabelle 5 Verwendete Puffer und Lösungen.....	20
Tabelle 6 Verwendete Zelllinien sowie Charakteristika und Herkunft der Zellen.	21
Tabelle 7 Kulturmedien der Zelllinien.	21
Tabelle 8 Verwendete primäre Antikörper.....	23
Tabelle 9 Verwendete sekundäre Antikörper.....	24
Tabelle 10 Verwendete Oligonukleotide für Fluidigm's BioMark™ HD quantitative PCR.	24
Tabelle 11 Konzentration der Eichpunkte und Qualitätskontrollen, eingesetzte Volumina für die Analytikmethode zur Quantifizierung von östrogenen Tamoxifenmetaboliten und Sexualhormonen.....	27
Tabelle 12 HPLC Gradient der Analytikmethode zur Quantifizierung von östrogenen Tamoxifenmetaboliten und Sexualhormonen.	29
Tabelle 13 MS/MS-Parameter und Retentionszeiten der östrogenen Tamoxifenmetaboliten und der Sexualhormone.	30
Tabelle 14 Konzentration der Eichpunkte und Qualitätskontrollen für die Quantifizierung von nicht-östrogenen Tamoxifenmetaboliten.	33
Tabelle 15 MS/MS-Parameter und Retentionszeiten der nicht-östrogenen Tamoxifenmetaboliten. .	35
Tabelle 16 Konzentration der Arbeitslösungen für die Quantifizierung von spezifischen CYP Substraten.	37
Tabelle 17 MS/MS-Parameter und Retentionszeiten der spezifischen CYP Substrate.....	38
Tabelle 18 Konzentrationen und Lösungsmittel der Stammlösungen CYP-spezifischer Substrate, CYP-Spezifität, und finale Konzentrationen im Experiment.	44
Tabelle 19 Charakterisierung der klinischen Daten der Patientinnen der POSH Studie.....	48

VIII

Tabelle 20 Zusammenfassung der klinischen Daten der Tamoxifen behandelten Patientinnen der IKP211-Studie.	50
Tabelle 21 Kalibrationsbereich, Sensitivität als Genauigkeit des LLOQ (n=6) und Linearität (n=6).....	55
Tabelle 22 Genauigkeit und Präzision gegeben als Variabilität innerhalb (intra) (n=6) und zwischen (inter) Probenserien (n=3).....	57
Tabelle 23 Stabilität der Analyten über drei Frier-Tau-Zyklen und 8 Std. bei Raumtemperatur (n=3). 58	
Tabelle 24 Stabilität der Analyten bei 6 °C über 33 Std. (n=6).....	59
Tabelle 25 Wiederfindungsrate der Analyten (n=3).	60
Tabelle 26 Ionensuppression der Analyten (n=3).	61
Tabelle 27 Formationskinetik beider Isomere von Metabolit E aus Tamoxifen, DM- und DDM-Tamoxifen.....	74
Tabelle 28 Formationskinetiken von Bisphenol aus den anti-östrogenen Tamoxifenmetaboliten und beiden Isomeren von Metabolit E.....	74
Tabelle 29 IC50 Konzentrationen der hydroxylierten Tamoxifenmetaboliten und EC50-Konzentrationen von Bisphenol und Metabolit E in humanen Lebermikrosomen.....	82
Tabelle 30 Korrelation von Bisphenol und Metabolit E mit Tamoxifenmetaboliten in prämenopausalen Frauen der POSH-Studie (N=306).....	89
Tabelle 31 Univariater Effekt der klinischen Parameter auf die Endpunktanalysen „rezidivfreie Zeit“ (time to relapse) und „rezidivfreies Überleben“ bei prämenopausalen Frauen der POSH-Studie.....	92
Tabelle 32 Korrelation von Bisphenol und Metabolit E mit nicht-östrogenen Tamoxifenmetaboliten in postmenopausalen Frauen der IKP211-Studie (N=377).....	97
Tabelle 33 Einfluss der Tamoxifentherapie auf in vivo Konzentrationen von Sexualhormonen in postmenopausalen Frauen der IKP211 Studie (N=127)	101

Abkürzungsverzeichnis

4-OH-Tamoxifen	4-Hydroxytamoxifen
ABC-Transporter	Transporter mit ATP-bindender Kasette
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion
AhR	Arylhydrocarbonrezeptor
AL	Arbeitslösung
AP-1	<i>activator protein 1</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
AUC	<i>area under the curve</i>
Bisphenol	Tamoxifen Bisphenol
BRCA1/2	<i>Breast cancer 1/2</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CAR	<i>constitutive androstane receptor</i>
CHEK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CHP	Aktivkohle-behandeltes humanes Plasma (<i>charcoal stripped human plasma</i>)
Cl _{int}	intrinsische <i>Clearance</i>
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CYP	Cytochrom P450
DDM-Tamoxifen	N-Didesmethyltamoxifen
DM-Tamoxifen	N-Desmethyltamoxifen
DPBS	Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>)
EC50	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	normaler Metabolisierer (<i>extensive metabolizer</i>)

X

Endoxifen	N-Desmethyl-4-hydroxytamoxifen
EP	Eichpunkt
ER	Östrogenrezeptor (<i>estrogen receptor</i>)
ERE	Östrogen-Rezeptor bindendes Element (<i>estrogen response element</i>)
ESI	<i>electrospray ionisation</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calve serum</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GC	Gaschromatographie
GnHR	<i>Gonadotropin-Releasing-Hormone</i>
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HGM	<i>Hepatocyte growth medium</i>
HLM	humane Lebermikrosomen
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
HPM	<i>High performance medium</i>
HR	<i>Hazard Ratio</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
IFC	<i>Dynamic Array Integrated Fluidic Circuits</i>
IM	intermediärer Metabolisierer (<i>intermediate metabolizer</i>)
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KI	Konfidenzintervall
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
LLOD	Detektionsgrenze (<i>lower limit of detection</i>)
LLOQ	Quantifizierungsgrenze (<i>lower limit of quantification</i>)
luc2P	<i>firefly</i> Luciferase (Gen)
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis

MALDI	Matrix–Assistierte Laser–Desorption–Ionisierung
MDR1	p-Glykoprotein
mEH	mikrosomale Epoxidhydrolase
minP	minimaler Promoter
M-MLV RT	Moloney murinen Leukämievirus
MR	metabolisches Verhältnis (<i>metabolic ratio</i>)
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MRP2	<i>multidrug resistance associated protein 2</i>
MS	Massenspektrometrie
MSigDB	<i>Molecular Signatures</i> Datenbank
MW	mittlere Abweichung vom Sollwert
NAT	N-Acetyltransferase
NCOA3	nukleärer Rezeptor Ko-Aktivators 3 (<i>nuclear receptor coactivator 3</i>)
NCoR1	nukleärer Rezeptor Ko-Repressor 1 (<i>nuclear receptor corepressor 1</i>)
NFR2	<i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>
Norendoxifen	N-Didesmethyl-4-hydroxytamoxifen
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PCM	<i>Preculture medium</i>
PCR	Polymerasenkettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pGP	p-Glykoprotein
PLB	<i>Passive Lysis Buffer</i>
PM	langsamer Metabolisierer (<i>poor metabolizer</i>)
POSH	<i>Prospective study of Outcomes in Sporadic and Hereditary breast cancer</i>
PPAR α	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor α
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>

XII

PXR	Pregnan-X-Rezeptor
Q	Quartil
QK	Qualitätskontrolle
R	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient
RFÜ	rezidivfreies Überleben
r^2	Korrelationskoeffizient
SAM	S-Adenosylmethionin
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SERM	selektiver Östrogenrezeptor Modulator
SPE	Festphasenextraktion (<i>solid phase extraction</i>)
ssGSEA	<i>single sample gene set enrichment</i>
SSRI	Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitor (<i>selective serotonin uptake inhibitor</i>)
STA	spezifischer mRNA Abschnitt (<i>specific target amplification</i>)
SULT	Sulfotransferase
TAC	<i>Transcriptome Analysis Console</i>
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
TOF	<i>time of flight</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
UM	schneller Metabolisierer (<i>ultrarapid metabolizer</i>)
V _{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit

Zusammenfassung

Tamoxifen ist die Standardtherapie für Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs bei prämenopausalen Frauen und eine Alternative zur Therapie mit Aromataseinhibitoren bei postmenopausalen Frauen. Dabei wird Tamoxifen von Cytochrom P450 (CYP-) Enzymen zu über 60 Metaboliten verstoffwechselt, welche zum Teil anti-östrogene wie auch östrogene Eigenschaften aufweisen. Die anti-östrogenen Metaboliten 4-Hydroxytamoxifen (4-OH-Tamoxifen) und N-Desmethyl-4-hydroxytamoxifen (Endoxifen) haben eine 100-fach stärkere Affinität zum Östrogenrezeptor (ER) und sind hauptsächlich für den antiproliferativen Effekt im Brustgewebe verantwortlich. Zu den östrogenen Metaboliten gehören Tamoxifen Bisphenol (Bisphenol) und beide Isomere von Metabolit E, welche in ER-positiven Brustkrebs-Zellen die Expression von Östrogen-regulierten Genen induzieren und somit die Zellproliferation beeinflussen. Darüber hinaus wurden diese Metaboliten in Xenotransplantaten eines Mausmodells für die Tamoxifenresistenz sowie in Mammakarzinomgewebe von Patientinnen mit klinischer Resistenz identifiziert. Sowohl die Metabolismuswege zu Metabolit E und Bisphenol als auch der Einfluss dieser Metaboliten auf den Therapieverlauf sind bisher weitestgehend unerforscht. Das Ziel dieser Arbeit war es demnach die Enzyme, welche für die Bildung von Bisphenol und Metabolit E verantwortlich sind, zu identifizieren und die pharmakodynamischen Effekte auf den ER und Auswirkungen auf den Fremdstoffmetabolismus *in vitro* zu untersuchen. Darüber hinaus wurden die Plasmaspiegel der östrogenen Metaboliten in Blutproben von prä- und postmenopausalen Frauen unter Tamoxifentherapie quantifiziert, deren Abhängigkeit von genetischen Varianten der beteiligten CYP-Enzyme analysiert sowie der Einfluss auf den Therapieverlauf untersucht.

Mit Hilfe von humanen Lebermikrosomen konnte gezeigt werden, dass Metabolit E wie auch Bisphenol in NADPH-abhängigen mikrosomalen Reaktionen gebildet werden. Weitere Analysen mit Supersomes™ zeigten, dass Metabolit E hauptsächlich durch die Enzyme CYP2C19, 3A, 2D6 und 1A2 aus Tamoxifen, N-Desmethyltamoxifen (DM-Tamoxifen) und N-Didesmethyltamoxifen (DDM-Tamoxifen) metabolisiert wird. Kinetische Untersuchungen ergaben die höchste *Clearance* für Tamoxifen mit $0,112 \mu\text{l mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Für die Bildung von Bisphenol aus den anti-östrogenen Tamoxifenmetaboliten 4-OH-Tamoxifen, Endoxifen und N-Didesmethyl-4-hydroxytamoxifen (Norendoxifen) konnte kein spezifisches CYP-Isoenzym identifiziert werden. Im Gegensatz dazu zeigte die stereospezifische Hydroxylierung von Metabolit E zu Bisphenol durch CYP2C19 ((Z)-Isomer) und CYP2B6 ((E)-Isomer) eine bis zu 45-fach höhere *Clearance* verglichen mit den anti-östrogenen Tamoxifenmetaboliten. Bezüglich des Phase II-Metabolismus zeigten die UGT-Enzyme 1A8 und 2B7 höchste Aktivitäten für die Glucuronidierung von Metabolit E und Bisphenol. In beiden prä- und postmenopausalen Patientenkohorten war die genetische Variante *CYP2C19*2* mit einer erniedrigten

XIV

metabolischen Ratio (MR) von Bisphenol zu (*Z*)-Metabolit E assoziiert. Darüber hinaus führte das *CYP3A4*22* Allel zu signifikant niedrigeren MRs von (*Z*)-Metabolit E zu Tamoxifen bzw. zu DM-Tamoxifen.

Die stärkste östrogene Wirkung in einem ER-abhängigen Luciferase-Reportergen-Assay in MCF7-Zellen wurde für (*E*)-Metabolit E beobachtet. Darüber hinaus aktivierten alle drei östrogenen Metaboliten in Transkriptomanalysen von MCF7-Zellen in gleicher Weise wie Östradiol die Expression von Genen, die mit Zellzyklus, Transkription, DNA-Replikation, Mitose, Proliferation und Nukleotidmetabolismus assoziiert sind. Es konnte gezeigt werden, dass Bisphenol im Gegensatz zu den anti-östrogenen Tamoxifenmetaboliten die Aktivität aller untersuchten CYP-Enzyme (CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 3A4) stark induziert, wobei niedrigste EC50-Werte für CYP2C19 (EC50=30,5 nM) gefunden wurden. Die *in vitro* beobachteten EC50-Konzentrationen waren allerdings höher als die gemessenen Patientenplasmaspiegel und setzen eine Gewebeanreicherung für eine biologische Wirkung *in vivo* voraus.

In prämenopausalen Frauen konnte das Verhältnis von (*E*)-Metabolit E zu Tamoxifen als Risikofaktor für eine kürzere rezidivfreie Zeit (*time to relapse*; Hazard Ratio [HR] 2,813; 95 % Konfidenzintervall [KI] 1,372-5,767; p=0,005) bzw. ein kürzeres rezidivfreies Überleben (HR 2,022; 95 % KI 1,079-3,791; p=0,028) assoziiert werden. Dies impliziert, dass (*E*)-Metabolit E als stärkster Agonist am ER einen negativen Einfluss auf das Therapieansprechen von Tamoxifen hat und dass hohe Konzentrationen dieses Metaboliten ein möglicher Risikofaktor für das Therapieversagen von Tamoxifen sind. Die vorliegende Dissertation schafft die Basis für zukünftige Arbeiten pharmakogenetische Biomarker zur Vorhersage der (*E*)-Metabolit E Plasmakonzentration zu identifizieren und damit einen Beitrag für eine personalisierte Tamoxifentherapie bei Brustkrebs zu leisten.

Abstract

Tamoxifen is the standard therapy for hormone receptor positive breast cancer in premenopausal women and the major option to aromatase inhibitors in postmenopausal women. It is extensively metabolized and bioactivated by enzymes of the cytochrome P450 (CYP) family to more than 60 compounds with anti-estrogenic and estrogenic properties. The anti-estrogenic metabolites 4-hydroxytamoxifen (4-OH-tamoxifen) and N-desmethyl-4-hydroxytamoxifen (endoxifen) have a more than 100-fold higher affinity to the estrogen receptor (ER) than tamoxifen itself and are therefore believed to mediate the anti-proliferative effect of the drug. The estrogenic metabolites Tamoxifen bisphenol (bisphenol) and both isomers of metabolite E were shown to induce the expression of certain estrogen-regulated mRNA and therefore impact cell proliferation in ER positive breast cancer cell lines. In addition, these metabolites were identified in a xenograft mouse model of tamoxifen resistance as well as in tumour tissue of tamoxifen treated breast cancer patients with clinical resistance. However, the metabolic pathways leading to Bisphenol and metabolite E as well as their impact on tamoxifen therapy are still unknown. Hence, the purpose of this work was to identify the enzymes involved in the formation of the estrogenic tamoxifen metabolites and to analyse the pharmacodynamic effects regarding their ER-activating potency and the xenobiotic metabolism *in vitro*. Furthermore, the plasma concentrations of metabolite E and bisphenol were quantified in blood samples of pre- and postmenopausal women under tamoxifen therapy and the dependency on genetic variants of the involved CYP enzymes as well as to clinical outcome were analyzed.

Human liver microsome experiments showed that both metabolite E and bisphenol are formed by NADPH-dependent microsomal reactions. In particular, it could be shown that metabolite E formation is mediated by CYP2C19, 3A, 2D6 and 1A2 from tamoxifen, N-desmethyl tamoxifen (DM-tamoxifen) and N-didesmethyl tamoxifen (DDM-tamoxifen) with tamoxifen having the highest metabolic clearance of $0.112 \mu\text{l mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Regarding bisphenol formation from the anti-estrogenic tamoxifen metabolite precursors 4-OH-tamoxifen, endoxifen and N-didesmethyl-4-hydroxy tamoxifen (norendoxifen), no specific CYP-isoenzyme could be identified. In contrast, the stereospecific hydroxylation of metabolite E to bisphenol was catalysed by CYP2C19 ((Z)-isomer) and CYP2B6 ((E)-isomer) with an up to 45-fold higher metabolic clearance compared to anti-estrogenic tamoxifen metabolites. With regard to phase II metabolism, UGT1A8 and 2B7 were identified as main enzymes for the glucuronidation of metabolite E and bisphenol. In both pre- and postmenopausal breast cancer patients, *CYP2C19*2* variants significantly lowered the metabolic ratio (MR) of bisphenol to (Z)-metabolite E. Furthermore *CYP3A4*22* significantly decreased the MR of (Z)-metabolite E to both tamoxifen and DM-tamoxifen, respectively.

The estrogenic effects on the ER based on an ER-dependent luciferase-reportergene-assay in MCF7-cells was strongest for (*E*)-metabolite E. Moreover, whole transcriptome analysis in MCF7-cells showed that all three estrogenic metabolites displayed almost identical activated pathways associated with cell cycle, transcription, DNA-replication, mitosis, proliferation and nucleotid metabolism when compared to estradiol. Regarding the pharmacodynamic effects on the xenobiotic metabolism, bisphenol strongly induced the activity of all tested CYP-enzymes (CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 3A4) with lowest EC50-values for CYP2C19 (EC50=30,5 nM). However, given that the observed EC50-concentrations *in vitro* are higher than those found in patient plasma a biological impact would require a tissue enrichment of estrogenic tamoxifen metabolites *in vivo*.

In premenopausal women the ratio of (*E*)-metabolite E to tamoxifen was identified as a risk factor of reduced time to relapse (hazard ratio [HR] 2.813; 95 % confidence interval [CI]: 1.372-5.767; p=0.005) and relapse-free survival (HR 2.022; 95 % CI: 1.079-3.791; p=0.028). This suggests that (*E*)-metabolite E due to its property as the strongest ER-agonist among the investigated estrogenic metabolites, negatively influences the response to tamoxifen therapy and is a risk factor for therapeutic failure in the clinic. This dissertation provides a basis for future works to identify of pharmacogenetic biomarkers as predictors for (*E*)-metabolite E plasma concentration which contributes to further personalise tamoxifen treatment of hormone receptor positive breast cancer patients.

1. Einleitung

1.1 Brustkrebs

1.1.1 Epidemiologie

Brustkrebs ist mit ca. 1,67 Millionen Neuerkrankungen pro Jahr weltweit die häufigste Krebsart bei Frauen und nach Lungenkarzinomen die zweithäufigste Krebsart. Dabei macht Brustkrebs bis zu 25 % aller Krebsfälle aus (Ferlay et al. 2015). Allein 2012 wurden in Europa 459.000 Patienten mit Mammakarzinom diagnostiziert, davon ca. 71.000 Frauen in Deutschland (Barnes und Kraywinkel 2017). Damit erkrankt eine von 8 Frauen während ihres Lebens an Brustkrebs, wobei das mittlere Erkrankungsalter 64 Jahre beträgt (Barnes und Kraywinkel 2017). Während die Inzidenzen für diese Krebsarten weltweit kontinuierlich steigen, nimmt die Mortalität in höher entwickelten Ländern ab. Im Jahr 2012 starben weltweit ca. 522.000 Frauen infolge von Brustkrebs, wobei 2/3 dieser Todesfälle weniger entwickelte Regionen betrafen (Ferlay et al. 2015). In Europa lag 2012 die Mortalität bei 131.347, wobei ca. 17.800 Brustkrebspatienten in Deutschland der Krankheit erlagen.

1.1.2 Risikofaktoren

Die Risikofaktoren, die zu Brustkrebs führen, können in genetische, biologische und umweltbedingte Faktoren eingeteilt werden. So ist das Risiko der Erkrankung bei familiärem Brustkrebs signifikant und steigt, umso mehr Familienmitglieder betroffen sind (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2001). Genmutationen in BRCA1 (*breast cancer*), BRCA2, ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), TP53 (*tumor protein p53*), PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) und CHEK2 (*Checkpoint Kinase 2*) konnten als Hochrisikogene für das Auftreten von Mammakarzinomen identifiziert werden (Liaw et al. 1997; Dite et al. 2003; Renwick et al. 2006; Langerød et al. 2007; Weischer et al. 2008). Neben biologischen Faktoren wie Alter und Geschlecht des Patienten ist die Exposition mit weiblichen Sexualhormonen ein wichtiger Risikofaktor. So sind eine frühe Menarche sowie eine späte Menopause, das Fehlen von Schwangerschaften, Hormonersatztherapien in und nach der Menopause und die Einnahme von hormonellen Kontrazeptiva anerkannte Risikofaktoren für die Entwicklung eines Mammakarzinoms (Brinton et al. 1988; Kelsey et al. 1993; McPherson et al. 2000; Marchbanks et al. 2002; Nelson et al. 2002; Hankinson und Eliassen 2007; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2012). Dagegen erwiesen sich Schwangerschaften und Stillen als protektiv (Layde et al. 1989). Zu den umweltbedingten Risikofaktoren gehören der Lebensstil, insbesondere Alkoholkonsum, Übergewicht und fehlende sportliche Aktivität sowie die Exposition mit Röntgenstrahlung (Smith-

Warner et al. 1998; McPherson et al. 2000; Morimoto et al. 2002; Singletary 2003; Monninkhof et al. 2007).

1.1.3 Charakteristika der Tumorsubtypen

Mammakarzinome können aufgrund der Expression verschiedener Rezeptoren sowie weiterer tumorspezifischer Gene in drei Hauptgruppen unterteilt werden, welche nach dem operativen Entfernen des Tumors und anschließender Strahlen- und/oder Chemotherapie weitere Therapiemöglichkeiten bestimmen.

In Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen, welche bis zu 75 % der Brusttumore darstellen, wird der Östrogenrezeptor (*estrogen receptor*, ER) sowie teilweise der Progesteronrezeptor (PR) verstärkt exprimiert (Althuis et al. 2004; Yersal und Barutca 2014). Die Expression des Proteins Ki67, welches im Zellkern proliferierender Zellen vorkommt, ist ein Marker für die weitere Unterteilung der Hormonrezeptor-positiven Brusttumore in die molekularen Subtypen luminal A (50-60 %) oder luminal B (15-20 %) (Inic et al. 2014). Die molekulare Klassifizierung und Einteilung in intrinsische Subtypen wurde ursprünglich auf Basis des Tumor-Transkriptoms beschrieben (Perou et al. 2000; Sørlie et al. 2001) und kann mittels diagnostischer Assays wie z.B. der PAM50-Signatur (Parker et al. 2009) oder des immunhistochemischen Nachweis der Ki67-Expression mit der Prognose und dem Therapieverlauf assoziiert werden (De Azambuja et al. 2007; Yerushalmi et al. 2010). Luminale Tumore können gezielt mit Hilfe endokriner Therapien, welche die ER-vermittelte Wirkung auf das Brustgewebe direkt antagonisieren (Tamoxifen) oder die endogene Östradiolproduktion mittels Hemmung der Aromatase (Aromataseinhibitoren) unterdrücken, behandelt werden (AGO Breast Committee).

Eine weitere Hauptgruppe von Mammakarzinomen stellen die HER2-positiven Brusttumore dar, in denen der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) überexprimiert ist und die 5-20 % aller auftretenden Brusttumore ausmachen (Reese und Slamon 1997; Millikan et al. 2008; Lund et al. 2010; Yersal und Barutca 2014). Aufgrund der Überexpression des Membranrezeptors können diese Tumore mit therapeutischen Antikörpern wie Trastuzumab, Pertuzumab oder Bevacizumab sowie dem Tyrosinkinase-Inhibitor Lapatinib und dem mTOR-Inhibitor Everolimus spezifisch behandelt werden (Arteaga et al. 2012; AGO Breast Committee).

Die dritte Hauptgruppe stellen mit ca. 10-15 % Inzidenz die basal-ähnlichen, auch triple negativ genannten, Brusttumore dar (Millikan et al. 2008; Yersal und Barutca 2014). Diese Tumore exprimieren weder den Östrogen-, noch den Progesteron- oder HER2-Rezeptor, so dass keine gezielte Therapie

angewandt werden kann (Penault-Llorca und Viale 2012). Daher wird nach der operativen Entfernung des Tumors eine Strahlen- und Chemotherapie mit Zytostatika angeschlossen (AGO Breast Committee).

1.2 Endokrine Therapiemöglichkeiten hormonrezeptor-positiver Mammakarzinome

Wie oben beschrieben, machen Hormonrezeptor-positive Mammakarzinome bis zu 75 % aller Brusttumore aus und exprimieren verstärkt den ER sowie teilweise den PR, welche spezifische Therapieziele darstellen (Osborne et al. 1980). Die endokrine Therapie kann aufgrund der Antagonisierung des ERs in der Brust durch Tamoxifen erfolgen, wie auch durch die Hemmung der endogenen Synthese von Östradiol durch Aromataseinhibitoren (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer 2001; Winer et al. 2005), da die Aktivierung des ERs hauptsächlich durch Östradiol vermittelt wird (Abbildung 1). Beide Therapeutika erzielen dabei eine Hemmung des Östradiol-abhängigen Zellwachstums der Mammakarzinome. Tamoxifen und dessen Metaboliten wirken dabei innerhalb der Tumorzellen und kompetitieren mit Östradiol am ER, wodurch die Expression Östradiol-abhängiger Wachstumsfaktoren gehemmt wird (Cozy et al. 1982) (Abbildung 1). Dagegen hemmen Aromataseinhibitoren die Metabolisierung der Androgene Testosteron und Androstendion zu Östradiol und Östron und depletieren somit diese Hormone, wodurch ebenfalls eine Aktivierung des ERs und somit das abhängige Zellwachstum der Tumore ausbleibt (Goss und Strasser 2001) (Abbildung 1).

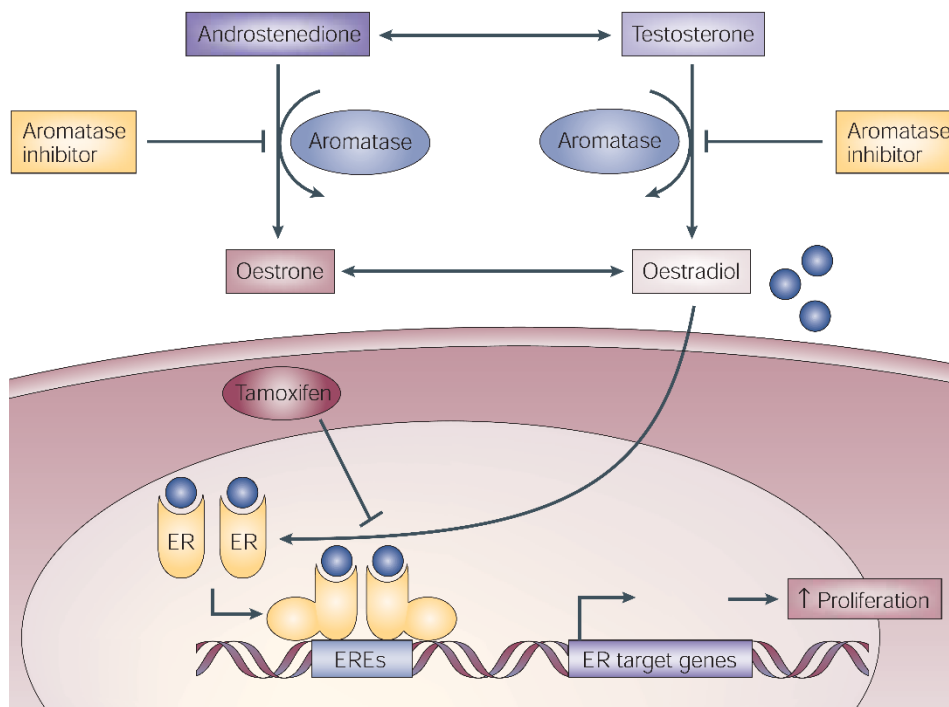


Abbildung 1 Wirkungsmechanismus von Tamoxifen und Aromataseinhibitoren.

(Johnston und Dowsett 2003)

1.2.1 Tamoxifen

Tamoxifen ist die Standardtherapie für Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs bei prämenopausalen Frauen und neben Aromataseinhibitoren bei postmenopausalen Frauen. Das (Z)-Isomer des Triphenylethylen-Derivats ICI46,474 wurde ursprünglich von Harper und Walpole 1967 als Kontrazeptivum entwickelt (Harper und Walpole 1967). Aufgrund unterschiedlicher Wirkung in Tiermodellen wurde in den frühen 1970er Jahren die Untersuchungen des Wirkungsspektrums von Tamoxifen unter anderem auf die Therapie von Mammakarzinomen erweitert (Ward 1973) und das Medikament schließlich für die Brustkrebstherapie zugelassen. In der adjuvanten Therapie wird Tamoxifen über einen Zeitraum von 5 bis 10 Jahren, oder bei postmenopausalen Frauen als Wechseltherapie mit Aromataseinhibitoren, eingesetzt. Die Therapie mit Tamoxifen verringert die jährliche Todesrate aufgrund von Brustkrebs um ca. 25 bis 30 %, während die jährliche Wiedererkrankungsrate um ca. 50 % reduziert ist (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) 2005). Zusätzlich wirkt sich die Länge der Therapie positiv auf den Verlauf aus und zeigt darüber hinaus positive Effekte auf das rezidivfreie Überleben nach Therapieende (Davies et al. 2013).

Tamoxifen gehört zu den selektiven Östrogenrezeptor Modulatoren (SERM), da die östrogene oder anti-östrogene Wirkung auf den Rezeptor gewebespezifisch ist. So wirkt Tamoxifen im Brustgewebe als Antagonist zu Östradiol, während es in Knochen und im Uterus eine östrogene Wirkung ausübt

(Gottardis et al. 1988; Love et al. 1992). Dies wird durch die unterschiedliche und gewebespezifische Rekrutierung von Ko-Aktivatoren und -Repressoren hervorgerufen (Shang und Brown 2002). Aufgrund dessen übt Tamoxifen eine positive Wirkung auf die Knochendichte besonders bei postmenopausalen Patientinnen während der Brustkrebstherapie aus, so dass das Osteoporoserisiko verringert ist. Allerdings können während der Tamoxifentherapie Endometriumsveränderungen bis hin zum Karzinom auftreten (Mourits et al. 2001). Zu den weiteren Nebenwirkungen gehören menopausale Symptome wie Hitzewallungen und Zyklusstörungen sowie thromboembolische Komplikationen (Howell et al. 2005).

Tamoxifen wird zu den Prodrugs gezählt, das über metabolische Modifikation zu aktiveren Komponenten umgewandelt wird (s. 1.3.1). Die anti-proliferative Wirkung im Brustgewebe wird somit von den aktiven anti-östrogenen Metaboliten 4-Hydroxytamoxifen (4-OH-Tamoxifen) und N-Desmethyl-4-hydroxytamoxifen (Endoxifen) ausgeübt, welche eine um 100-fach höhere Affinität zum ER aufweisen als Tamoxifen.

1.3 Metabolismus von Tamoxifen

Die Wirksamkeit von Arzneimitteln ist stark von der Aufnahme (Absorption), der Verteilung (Distribution), dem Metabolismus (aktivierend und inaktivierend) und der Ausscheidung (Exkretion) abhängig (ADME) und kann in vier Phasen (Nomenklatur 0-3) eingeteilt werden.

Die Absorption und Verteilung von Xenobiotika (Phase 0) kann, je nach Expositionsweg, über die Lunge, Haut oder Schleimhäute z.B. des Magen-Darm-Traktes über passive Diffusion, Carrier-vermittelten oder energieabhängig aktiven Transport sowie Endozytose in den Blutkreislauf erfolgen. Anschließend erfolgt die Verteilungsphase des jeweiligen Stoffes in die verschiedenen Kompartimente des Körpers (Körperflüssigkeiten und Gewebe), zwischen denen ein Fließgleichgewicht besteht. Dabei sind das Verteilungsmuster und die Anreicherung des Stoffes abhängig von den Stoffeigenschaften wie z.B. Lipophilie und pKa-Wert (Freissmuth et al. 2012).

Der Metabolismus der Fremdstoffe wird in Phase I und Phase II unterteilt, wobei in der ersten Phase die aufgenommenen Stoffe funktionalisiert und in der zweiten Phase mit hydrophilen Gruppen konjugiert werden, um die Ausscheidung zu erleichtern. Die Funktionalisierung der häufig lipophilen Stoffe wird durch CYP-Enzyme hauptsächlich in der Leber katalysiert, welche im mikrosomalen Zellkompartiment, dem glatten endoplasmatischen Retikulum, lokalisiert sind. Diese Enzyme gehören zu den Oxidoreduktasen, welche mit Hilfe einer funktionalen Häm-Gruppe und dem Reduktionsäquivalent NADPH Hydroxylgruppen in Kohlenstoffverbindungen einfügen (Abbildung 2), wobei die Ausgangsstoffe allerdings neben der Oxidation auch reduziert oder demethyliert werden

können (Zanger und Schwab 2013). Durch das Einfügen der funktionalen Gruppe werden die vorher lipophilen Substanzen wasserlöslicher, wobei zuvor inaktive Substanzen eine biologische Aktivierung erfahren (Prodrugs) oder vorher aktive Substanzen ihre biologische Aktivität verlieren können. Nachfolgend können die funktionalisierten Substanzen durch Enzyme der Phase II (UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs), Sulfotransferasen (SULT), N-Acetyltransferasen (NAT), Catechol-O-Methyltransferasen (COMT) und Glutathion-S-Transferasen) mit wasserlöslichen Gruppen oder Acetyl- sowie Methylresten konjugiert werden, welche einen jeweils spezifischen Kofaktor verwenden (UDP-Glucuronsäure, 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS), Acetyl-CoA, S-Adenosylmethionin (SAM), Glutathion) (Abbildung 2). Dies kann in unterschiedlichen Geweben, unter anderem in der Leber, dem Darm, den Nieren und der Blase geschehen (Krishna und Klotz 1994).

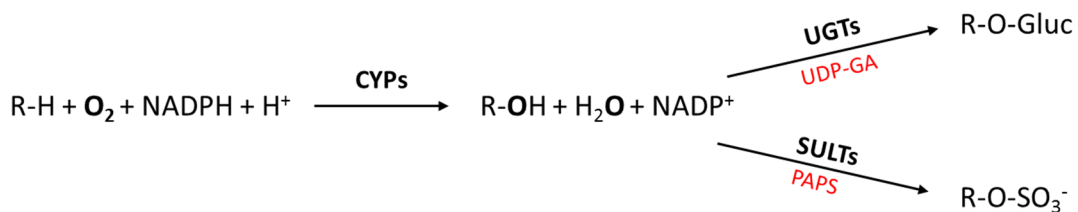


Abbildung 2 Reaktionsmechanismus der Phase I und Phase II des Fremdstoffmetabolismus.

CYP: Cytochrom P450 Enzym; UDP-GA: Uridindiphosphatglucuronsäure (*Uridinediphosphate glucuronic acid*); UGT: UDP-Glucuronosyltransferase; PAPS: 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat; SULTs: Sulfotransferasen

Die Exkretion der Fremdstoffe (Phase 3) aus den Zellen erfolgt durch aktive Transporter mit ATP-bindender Kasette (ABC-Transporter). Dabei werden die Stoffe in die Galle oder das Blutplasma transportiert, wodurch sie letztendlich fäkal oder renal ausgeschieden werden können (Ayrton und Morgan 2001).

1.3.1 Phase I und II Metabolismus von Tamoxifen

Tamoxifen unterliegt einem starken hepatischen Metabolismus zu einer Vielzahl hydroxylierter und demethylierter Stoffwechselprodukte, welche weitergehend mit hydrophilen Gruppen konjugiert und anschließend ausgeschieden werden. Die Bildung der Metaboliten wird hauptsächlich durch die CYP-Enzyme 3A4, 2D6, 2B6, 2C9 und 2C19 katalysiert (Crewe et al. 2002; Collier 2003; Desta 2004; Mürdter et al. 2011; Goetz et al. 2013). Dabei werden unter anderem auch die aktiv anti-östrogenen Metaboliten 4-OH-Tamoxifen und Endoxifen gebildet (Abbildung 3), welche aufgrund ihrer bis zu 100-fach höheren Affinität zum ER hauptsächlich für die anti-proliferative Wirkung im Brustgewebe

verantwortlich sind (Coezy et al. 1982; Jordan 1982; Katzenellenbogen et al. 1984; Lim et al. 2005; Lim et al. 2006). Zu den weiteren Hauptmetaboliten zählen N-Desmethyltamoxifen (DM-Tamoxifen), N-Didesmethyltamoxifen (DDM-Tamoxifen) und N-Didesmethyl-4-hydroxytamoxifen (Norendoxifen) (Abbildung 3). Die Aktivität der involvierten CYP-Enzyme kann durch genetische Polymorphismen moduliert werden, so dass die Plasmakonzentrationen der Metaboliten von der genetischen Ausstattung der Patienten abhängig sind.

CYP2B6 ist neben den Enzymen CYP2D6, 2C9 und 3A4, welche für über 90 % der Plasmakonzentrationen der aktiven Metaboliten verantwortlich sind, ebenfalls an der Bildung von 4-OH-Tamoxifen beteiligt, wobei in *in vitro* Studien ein Einfluss von genetischen Polymorphismen dieses Enzyms auf die Bildungsrate von 4-OH-Tamoxifen gezeigt werden konnte (Coller et al. 2002). Der häufigste Polymorphismus von *CYP2B6* ist die genetischen Variante *6, welche mit einer stark verminderten Enzymexpression in der Leber einhergeht (Lang et al. 2001). Jedoch konnte bisher kein Einfluss auf den Therapieverlauf von Tamoxifen in der Klinik beobachtet werden (Brauch et al. 2009; Singh et al. 2011).

CYP2C9 ist wesentlich an der Bildung von 4-OH-Tamoxifen aus Tamoxifen beteiligt und trägt so sekundär zur Bildung von Endoxifen aus 4-OH-Tamoxifen bei. Dabei waren in einer klinischen Studie die Plasmakonzentrationen von Endoxifen und 4-OH-Tamoxifen in Patienten, die aufgrund der Nullvarianten *CYP2C9**2 oder *3 dieses Enzyms eine verringerte Enzymaktivität aufwiesen, erniedrigt (Mürdter et al. 2011). Allerdings konnte kein Einfluss dieser *CYP2C9*-Polymorphismen auf den Therapieverlauf von Tamoxifen gefunden werden (Binkhorst et al. 2015).

Für das CYP-Enzym **2C19** sind verschiedene genetische Nullvarianten (*2-*8), wobei *2 und *3 am häufigsten verbreitet sind, und eine Promotorvariante (*17) mit erhöhter Enzymaktivität bekannt (Zanger und Schwab 2013). Auch wenn bezüglich des Einflusses von *CYP2C19**2 und *3 auf die Tamoxifentherapie Kontroversen in der Literatur bestehen, konnte ein Großteil der klinischen Studien keinen Einfluss auf den Therapieverlauf zeigen (Okishiro et al. 2009; Lim et al. 2011; Serrano et al. 2011; Chamnanphon et al. 2013). Auch der Effekt der *17 Variante ist kontrovers diskutiert, wobei Evidenz auf erhöhte Plasmakonzentrationen von 4-OH-Tamoxifen sowie ein positiver Einfluss dieses Polymorphismus auf das rezidivfreie Überleben während der Tamoxifentherapie existiert (Gjerde et al. 2007; Schroth et al. 2007; Moyer et al. 2011).

CYP2D6 ist eines der Schlüsselenzyme im Tamoxifenmetabolismus, da es die Bildung eines der wichtigsten anti-östrogenen Metaboliten Endoxifen aus DM-Tamoxifen katalysiert. Dieses Enzym zählt mit über 100 genetischen Varianten zu den am stärksten polymorphen CYP-Enzymen (<https://www.pharmvar.org/gene/CYP2D6>) und kann aufgrund der daraus resultierenden Aktivitätsänderungen in vier Hauptphänotypen eingeteilt werden: langsame Metabolisierer (*poor*

metabolizer, PM), intermediäre Metabolisierer (*intermediate metabolizer*, IM), normaler Metabolisierer (*extensive metabolizer*, EM) und schnelle Metabolisierer (*ultrarapid metabolizer*, UM). Aufgrund der hohen Variabilität in der Genetik und der Enzymaktivität sowie der starken Abhängigkeit der Endoxifenkonzentrationen und dem damit einhergehenden Einfluss auf den Therapieerfolg von Tamoxifen, kann die CYP2D6-Genetik als prädiktiver Biomarker für ein mögliches Therapieansprechen bzw. -versagen fungieren (Schroth et al. 2009; Schroth et al. 2010; Mürdter et al. 2011; Goetz et al. 2013; Saladores et al. 2013; Dickschen et al. 2017).

Die **CYP3A** Enzymfamilie ist für den Metabolismus von bis zu 40 % aller Fremdstoffe verantwortlich und spielt auch im Tamoxifenmetabolismus eine wichtige Rolle in der Bildung von u.a. DM- und DDM-Tamoxifen, Endoxifen aus 4-OH-Tamoxifen sowie weiteren hydroxylierten Tamoxifenmetaboliten (Singh et al. 2011). Für die Enzyme CYP3A4 und 3A5 sind ebenfalls Polymorphismen bekannt, die jedoch, bis auf CYP3A4*22, keinen Einfluss auf den Therapieverlauf von Tamoxifen zu nehmen scheinen (Binkhorst et al. 2015). Die genetische Variante *22 des Enzyms CYP3A4, die eine reduzierte Enzymaktivität aufweist, konnte allerdings mit erhöhten Plasmakonzentrationen von Endoxifen und 4-OH-Tamoxifen sowie einer Verringerung von Hitzewallungen assoziiert werden (Teft et al. 2013; Baxter et al. 2014; Antunes et al. 2015).

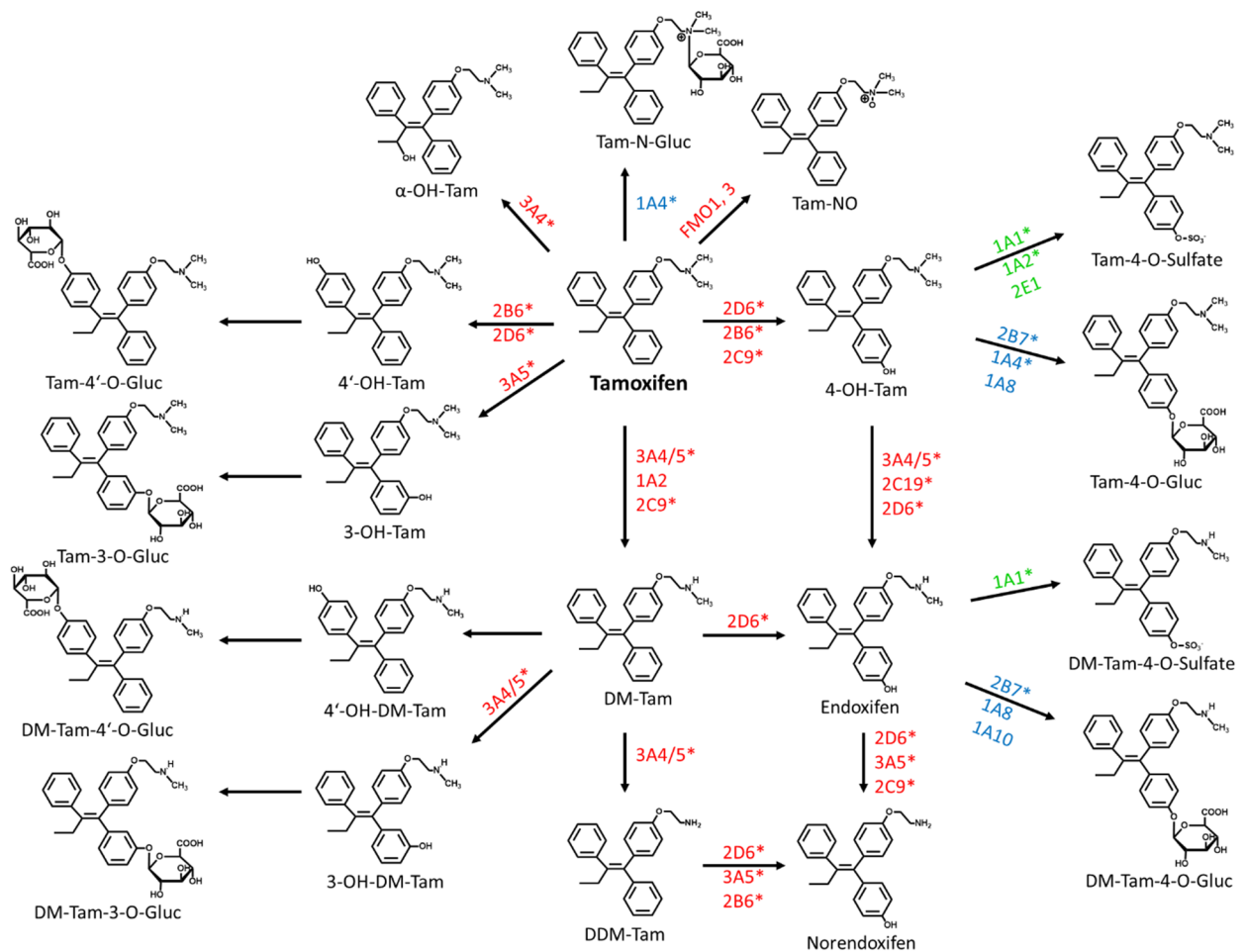


Abbildung 3 Ausschnitt des hepatischen Tamoxifenmetabolismus.

(Desta 2004; Mürdter et al. 2011; Klein et al. 2013; Ma et al. 2017); Farbkodierung: rot = CYP-Enzyme, blau = UGT-Enzyme, grün = Sulfatasen; * = polymorphes Enzym; Tam: Tamoxifen; Gluc: Glucuronid

Tamoxifen und dessen Metaboliten werden hauptsächlich durch die UGT-Enzyme UGT1A4, 1A8, 1A10, 2B7 und 2B15 sowie den Sulfatasen *SULT1A1* und *1A2* mit wasserlöslichen Gruppen konjugiert (Abbildung 3) und nachfolgend als Glucuronid- oder Sulfatverbindungen renal und biliär ausgeschieden. Diese Enzyme weisen, wie die CYP-Enzyme, ebenfalls Polymorphismen auf. Die Anwesenheit der genetischen Varianten von **UGT1A4** (48Val) und **2B7** (268Tyr), welche mit einer verminderten Aktivität assoziiert sind, konnte mit geringeren Konzentrationen des 4-OH-Tamoxifen-N- und -O-Glucuronids sowie des Endoxifen-O-Glucuronids und erhöhten Konzentrationen der jeweiligen Aglykons in Verbindung gebracht werden, wohingegen die Polymorphismen **UGT2B15** 523Tyr (erhöhte Enzymaktivität) und **UGT2B17del** die Plasmakonzentrationen dieser Metaboliten erhöhten (Romero-Lorca et al. 2015; Novillo et al. 2016). Allerdings konnte bisher keine Assoziation mit dem Therapieverlauf von Tamoxifen hergestellt werden (Binkhorst et al. 2015). Auch Träger der genetischen Varianten der **Sulfatase1A2** (*2 und *3) zeigten erhöhte 4-OH-Tamoxifen- und Endoxifenkonzentrationen in einer Studie von Fernandez-Santander *et al.* (Fernández-Santander et al.

2013), wohingegen die häufigste Variante **SULT1A1*2**, die mit einer verminderten Enzymaktivität assoziiert ist, in vielen Studien keinen Einfluss auf Metabolitenkonzentrationen oder den Therapieverlauf von Tamoxifen zeigte (Gjerde et al. 2007; Binkhorst et al. 2015), so dass ein Einfluss von **SULT1A1*2** auf das Gesamtüberleben nicht bestätigt werden konnte (Nowell et al. 2002).

1.3.2 Östrogene Tamoxifenmetaboliten

Während des Phase I Fremdstoffwechsels von Tamoxifen entstehen neben den demethylierten und hydroxylierten anti-östrogenen Metaboliten auch die östrogenen Metaboliten Tamoxifen Bisphenol (Bisphenol) und Metabolit E, welcher als (*Z*)- und (*E*)-Isomer vorliegt (Abbildung 4). Metabolit E wurde ursprünglich von Fromson und Kollegen 1973 in der mit β -Glucuronidase inkubierten Gallenflüssigkeit von mit Tamoxifen behandelten Hunden identifiziert. Das entdeckte Molekül wies dabei ein Masse-zu-Ladungsverhältnis (*m/z*) von 300 auf, wobei die für die Seitenkette typischen Spaltprodukte von *m/z* 58 und *m/z* 72 fehlten (Fromson et al. 1973). Somit zeichnet sich Metabolit E durch das Fehlen der Dimethylaminoethoxy-Seitenkette aus. Bisphenol weist die für Tamoxifen typische Seitenkette ebenfalls nicht auf und ist zusätzlich an Position 4 hydroxyliert (Abbildung 4). Aufgrund der fehlenden funktionalen Seitenkette, welche die Aktivierung des Rezeptors unterbindet, agieren Metabolit E und Bisphenol als Agonisten am ER und aktivieren diesen in ähnlicher Weise wie Östradiol, so dass Metabolit E und Bisphenol als östrogene Tamoxifenmetaboliten bezeichnet werden. Dies wurde erstmalig von Jordan und Gosden 1982 durch die rein östrogene Wirkung von Metabolit E im Uterus von Ratten gezeigt und wurde durch weitere Arbeitsgruppen anhand des Östrogen-abhängigen Zellwachstums der Brustkrebszelllinien MCF-7 und T47D sowie der Expression Östrogen-regulierter mRNA (pNR1, 2, 25 und Cathepsin D) *in vitro* bestätigt (Jordan und Gosden 1982; Sonnenschein et al. 1985; Johnson et al. 1989; Murphy et al. 1990). Zusätzlich wurde das (*E*)-Isomer von Metabolit E als der potenteste Agonist am ER identifiziert (Sonnenschein et al. 1985; Murphy et al. 1990). Des Weiteren wurden Metabolit E und Bisphenol in einem auf MCF-7-Zellen basierenden Xenotransplantat Mausmodell für Tamoxifenresistenz sowie in humanem Brustkrebsgewebe von Patienten mit klinischer Tamoxifenresistenz nachgewiesen. Infolgedessen wurde der Metabolismus zu östrogenen Tamoxifenmetaboliten im Zielgewebe als eine der Ursachen der Tamoxifenresistenz diskutiert (Wiebe et al. 1992; Wiebe et al. 1993). Diese Hypothese wurde später durch Osborne und Wolf allerdings wieder verworfen, da Tamoxifenvarianten, welche nicht zu Metabolit E metabolisiert werden konnten, ebenfalls zum Wachstum der resistenten Tumore führte (Osborne 1993; Wolf et al. 1993; Osborne et al. 1994). Bis heute ist allerdings der Metabolismus zu den östrogenen Tamoxifenmetaboliten sowie dessen Wirkung auf den Therapieverlauf unbekannt.

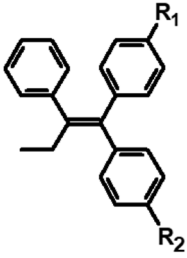
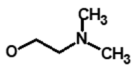
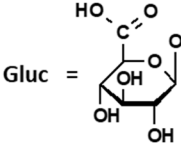
	R ₁	R ₂	Substanz
		H	Tamoxifen
	OH	H	(Z)-Metabolit E
	H	OH	(E)-Metabolit E
	OH	OH	Tamoxifen Bisphenol
	Gluc	H	(Z)-Metabolit E Glucuronid
	H	Gluc	(E)-Metabolit E Glucuronid
	OH	Gluc	(Z)-Tamoxifen Bisphenol Glucuronid
	Gluc	OH	(E)-Tamoxifen Bisphenol Glucuronid

Abbildung 4 Strukturen von Tamoxifen, Metabolit E und Bisphenol sowie dessen Glucuroniden.

Abgeändert von Johanning et al. 2017; Gluc: Glucuronid

1.4 Faktoren für das Therapieansprechen von Tamoxifen

Obwohl viele Patienten von der Tamoxifentherapie profitieren, erleiden bis zu 30 % der Patienten ein Rezidiv des Brustkrebses oder ein Voranschreiten des Tumorwachstums aufgrund der Entwicklung von Tamoxifenresistenzen (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) 2005). Dies kann auf unterschiedliche Mechanismen zurückgeführt werden, die zum einen auf der metabolischen Ausstattung des Patienten und zum anderen auf direkte Änderungen in den Tumorzellen, wie Mutationen oder Verlust des ERs, Interaktionen des ERs mit anderen Proliferations-anregenden Signalwegen oder Veränderungen in Ko-Aktivatoren oder -Repressoren des Rezeptors beruhen.

1.4.1 Einfluss des Tamoxifenmetabolismus auf den Therapieerfolg

Tamoxifen gehört, wie in 1.3.1 beschrieben, zu den Prodrugs und wird durch CYP-Enzyme zu den anti-östrogen wirksamen Metaboliten 4-OH-Tamoxifen und Endoxifen metabolisiert. Die Bildung und damit einhergehend die Plasmakonzentration von Endoxifen ist dabei hauptsächlich von dem Enzym CYP2D6 abhängig und wird demnach stark vom CYP2D6-Polymorphismus beeinflusst. Dabei tritt, basierend auf der Metabolisierung von Codein, in der kaukasischen Bevölkerung der PM-Phänotyp bei 7-10 %, der IM-Phänotyp bei 10-15 %, der EM-Phänotyp bei 60-70 % und der UM-Phänotyp bei 10-15 % der

Individuen auf (Brauch et al. 2009). Da die gemessene Enzymaktivität substratabhängig sein kann, werden aktuell weitere Einteilungen aufgrund von z.B. Diplotypen diskutiert (Schroth et al. 2017). Aufgrund fehlender oder eingeschränkter CYP2D6-Aktivität wird der aktive Metabolit Endoxifen nur unzureichend gebildet, so dass der CYP2D6-Genotyp die Endoxifenkonzentrationen *in vivo* beeinflusst (Mürdter et al. 2011). Des Weiteren wurden die Plasmakonzentrationen von Endoxifen sowie die CYP2D6-Genetik von verschiedenen Arbeitsgruppen mit einem schlechteren Therapieansprechen in Verbindung gebracht (Schroth et al. 2009; Madlensky et al. 2011; Goetz et al. 2013; Province et al. 2014; Saladores et al. 2015). Somit konnte gezeigt werden, dass der CYP2D6-Genotyp prädiktiv für die Endoxifenkonzentrationen und den Therapieverlauf sein kann. Aktuell wird der Ausgleich der eingeschränkten Enzymaktivität durch Supplementierung von Endoxifen während der Tamoxifentherapie in einer klinischen Studie (TAMENDOX) sowie die Gabe von Endoxifen als Monotherapie untersucht (Goetz et al. 2017). Dies ist besonders für prämenopausale Brustkrebspatientinnen von Bedeutung, da es für diese Patientengruppe bisher keine zugelassene Alternativtherapie gibt.

Auch Arzneimittelwechselwirkungen können den Tamoxifenmetabolismus zu den anti-östrogenen Metaboliten und somit das Therapieansprechen beeinflussen. Dies wurde anhand der Ko-Medikation von starken CYP2D6-Inhibitoren wie den antidepressiv wirkenden Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (*selective serotonin uptake inhibitors*, SSRI) Fluoxetin und Paraxetin, beobachtet (Stearns et al. 2003; Caraci et al. 2011).

1.4.2 Tumorresistenz

Die erworbene Tamoxifenresistenz beruht hauptsächlich auf intrazellulären Veränderungen des Tumors, welche den ER, weitere Signalwege für Proliferation, den Zellzyklus oder die Expression von Transportern betreffen.

Der Verlust des ER α und die damit einhergehende Unabhängigkeit von Östrogenen ist dabei in ca. 20 % der Mammakarzinome mit erworbener Resistenz zu beobachten (Gutierrez et al. 2005). Weiterhin wurden die Expression einer verkürzten Variante des ER α (ER α 36) sowie des ER β (ER β 2/cx und ER β 5) mit einem schlechteren Ansprechen auf die Tamoxifentherapie in Verbindung gebracht (Murphy und Watson 2006; Honma et al. 2008; Shi et al. 2009). Auch können Veränderungen der posttranslationalen Modifikationen des ERs, wie Phosphorylierungen oder Methylierungen, zur klinischen Tamoxifenresistenz beitragen, indem die Aktivität und Affinität zu Ko-Aktivatoren und -Repressoren sowie die Sensitivität des Rezeptors gegenüber Tamoxifen beeinflusst wird (Musgrove und Sutherland 2009). Das Expressionsprofil der Ko-Regulatoren und das Verhältnis von Aktivatoren zu Repressoren,

wie die Überexpression des nukleären Rezeptor Ko-Aktivators 3 (*nuclear receptor coactivator 3*, NCOA3), der Transkriptionsfaktoren AP-1 (*activator protein 1*) und NF- κ B (*nuclear factor κ B*) oder die verringerte Expression des Repressors nukleärer Rezeptor Ko-Repressor 1 (*nuclear receptor corepressor 1*, NCoR1) beeinflusst zusätzlich, ob SERMs wie Tamoxifen einen agonistischen oder antagonistischen Effekt auf den ER ausüben (Lavinsky et al. 1998; Ring und Dowsett 2004; Zhou et al. 2007). Darüber hinaus kann der ER außerhalb des Nukleus membranständige Wachstumsfaktorrezeptoren (z.B. EGFR, HER2) und zytoplasmatische Kinasen (z.B. MAP-Kinasen, Src-Kinasen, PI3-Kinase) mittels eines positiven Rückkopplungsmechanismus hyperaktivieren, was durch die Bindung von Östrogenen oder Tamoxifen hervorgerufen werden kann (Osborne et al. 2003; Schiff et al. 2003; Shou et al. 2004; Massarweh et al. 2008). Durch die verstärkte Aktivierung von Überlebens-Signalwegen werden zusätzlich antiapoptotische Bcl-2 Proteine stärker exprimiert, während proapoptotische Proteine wie Bax und Bak in verminderter Konzentrationen aufzufinden sind, so dass der intrinsische Apoptosesignalweg beeinträchtigt ist (Riggins et al. 2005).

Während der Therapie mit Tamoxifen verbleiben die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, so dass die Proliferation der Brustkrebszellen gehemmt ist (Sutherland et al. 1983). Durch die Überexpression der Zellzyklus-assoziierten Proteine Myc und der Cycline D1 und E1 sowie der Verringerung wichtiger Zellzyklus-Regulatoren, wie dem RB Tumorsuppressor und der Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen p21 und p27, kann der Zellzyklus trotz endokriner Therapie voranschreiten (Cariou et al. 2000; Span et al. 2003; Butt et al. 2005).

Die Überexpression von Efflux-Transportern der ABC-Familie im Zielgewebe ist ein weit verbreitetes Phänomen für Resistenzen von Tumoren gegenüber Arzneistoffen. Auch Tamoxifen sowie die anti-östrogenen Metaboliten 4-OH-Tamoxifen und Endoxifen konnten als mögliche Substrate des p-Glykoproteins (pGP, MDR1) sowie MRP2 (*multidrug resistance associated protein 2*) identifiziert werden (Teft et al. 2011; Kiyotani et al. 2012). Darüber hinaus zeigten pGP und MRP2 eine verstärkte Expression *in vitro* in Tamoxifen-resistenten MCF-7-Zellen (Choi et al. 2007; Krisnamurti et al. 2016). Weiterhin konnte von Maciejczyk sowie Kiyotani und Kollegen gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression dieses Transporters zu verkürzten Überlebensintervallen der mit Tamoxifen behandelten Patienten führt (Kiyotani et al. 2010; Lang et al. 2010; Maciejczyk et al. 2012).

1.5 Zielsetzung

In früheren Arbeiten wurde die Existenz der östrogenen Tamoxifenmetaboliten Bisphenol und Metabolit E im Mausmodell und in humanem Brustkrebsgewebe von mit Tamoxifen behandelten Patienten mit klinischer Resistenz nachgewiesen. Jedoch sind bisher die Bildung, die Pharmakokinetik

und -Dynamik sowie die Auswirkungen dieser Metaboliten auf den Therapieverlauf unbekannt. Daher wurden folgende Ziele für diese Arbeit definiert:

- Entwicklung und Validierung einer analytischen HPLC-ESI-MS/MS Methode zur Quantifizierung von Bisphenol und den beiden Isomeren des Metaboliten E *in vitro* und *in vivo* sowie den Sexualhormonen Östradiol, Östron, Androstendion, Testosteron und Progesteron *in vivo*
- Etablierung eines Leberzellmodells für die Analyse pharmakokinetischer und -dynamischer Parameter von Bisphenol und beider Isomere des Metaboliten E
- Identifizierung der verantwortlichen Enzyme für den Metabolismus zu den östrogenen Tamoxifenmetaboliten
- Quantifizierung der Plasmakonzentrationen von Bisphenol und Metabolit E in klinischen Studien mit prä- und postmenopausalen Brustkrebspatientinnen
- Identifizierung pharmakogenetischer Biomarker für eine mögliche Voraussage der Plasmakonzentrationen von Bisphenol und Metabolit E
- Untersuchung des Einflusses der östrogenen Tamoxifenmetaboliten auf den Therapieverlauf durch Analyse retrospektiver klinischer Studien
- Untersuchung des Einflusses der Tamoxifentherapie auf die Plasmakonzentrationen von Sexualhormonen in postmenopausalen Frauen

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Computerprogramme

Tabelle 1 Verwendete Computerprogramme.

Programm	Version	Software-Anbieter
Advanced Image Data Analyzer AIDA	4.50.010	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH
Agilent Masshunter Workstation Software: Agilent MassHunter Data Acquisition for 6400 Series Triple Quadrupole	B.0.8.00	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG
Agilent Masshunter Workstation Software: Qualitative Analysis	B.06.00 SP1	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG
Agilent Masshunter Workstation Software: Quantitative Analysis for QQQ	B.06.00 SP01	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG
EnSpire™ Software	4.1	PerkinElmer, Incorporated
Fluidigm® Data Collection	3	Fluidigm Corporation
Fluidigm® Real-Time PCR Analysis	4.1.3	Fluidigm Corporation
GraphPad Prism	5.04	GraphPad Software, Incorporated
Inkscape™	0.91 r13725	Inkscape™-Projekt
Microsoft Office	Standard 2010 und 365 Pro Plus	Microsoft Corporation
SPSS Statistics	24	IBM
XStella	2.13.271	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH
Zotero	4.0.29.10	Roy Rosenzweig Center for History and New Media

2.1.2 Geräte

Tabelle 2 Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
1200 Series Säulenofen G1316B	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG
1200 Series Thermostat G1330B	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG
1290 Infinity Autosampler G4226A	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG
1290 Infinity Binäre Pumpe G4220A	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG
6460 Triple Quadrupole LC/MS	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG
8-Kanalpipetten	Mettler-Toledo Rainin, LLC
Autogene II	Grant Instruments (Cambridge) Ltd.
BioMark HD™ System	Fluidigm Corporation
Biopak® Ultrafilter	Merck Millipore, Merck KGaA
BioRad PowerPac™ 200	Bio-Rad Laboratories, Incorporated
BioRad PowerPac™ basic	Bio-Rad Laboratories, Incorporated
CO ₂ -Inkubator C150	BINDER GmbH
Discharging bar Typ R50	Eltex-Elektrostatik-GmbH
EnSpire® Multimode Reader	PerkinElmer, Incorporated
Evaporatorsystem EVA	VLM Korrosions-Prüftechnik, Labortechnik & Dienstleistungen GmbH
FastBlot Semi-Dry Blotter B44	Biometra GmbH
Hämocytometer Neubauer improved bright-line	Marienfeld-Superior
Incanto type sup 021	Saeco, Koninklijke Philips N.V.
LC-Pak® Endfilter	Merck Millipore, Merck KGaA
Megafuge 1.0R	Heraeus Holding
MilliQ® Integral 10 Wasseraufbereitungssystem	Merck Millipore, Merck KGaA
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Incorporated
Multipette® plus	Eppendorf AG
NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific Incorporated
PEQLAB Electrophoresis power supply EV231	VWR Life Science Competence Center

pH-Meter SevenEasy	Mettler-Toledo Incorporated
Pipetten	Eppendorf AG und Mettler-Toledo Rainin, LLC
Positive Pressure-96 Processor	Waters
Q-POD® Element	Merck Millipore, Merck KGaA
Stella Modular High Performance Imaging System	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH
Techne® Dri-Block® DB2A	Cole-Parmer
VACUSAFE	INTEGRA Biosciences GmbH
Wipp-Schüttelapparat 3013	Gesellschaft für Labortechnik mbH
XS105 DualRange	Mettler-Toledo Incorporated
XS802S	Mettler-Toledo Incorporated
Zentrifuge 5417C	Eppendorf AG
Zentrifuge 5424R	Eppendorf AG
Zentrifuge Universal 320R	Hettich Lab Technology

2.1.3 HPLC-Säulen

Tabelle 3 Verwendete HPLC-Säulen.

Säule	Maße	Porengröße	Hersteller
ZORBAX Eclipse Plus C18	2,1x100 mm	1,8µm	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG
Uptisphere Strategy C12	2,1x100 mm	5µm	Interchim Deutschland GmbH

2.1.4 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Alle Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen BD-Bioscience, VWR International LLC, Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Greiner Bio-One GmbH, Eppendorf AG, Schleicher & Schuell Bioscience GmbH, Nunc GmbH & Co. KG und GE Healthcare bezogen.

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG, Bio-Rad Laboratories Incorporated, Serva Electrophoresis GmbH, Sigma-Aldrich

Corporation, Thermo Fisher Scientific Incorporated und Merck KGaA bezogen und entsprachen dem angemessenen Reinheitsgrad.

2.1.5 Reinsubstanzen und deuterierte interne Standards

Tabelle 4 Verwendete Reinsubstanzen und deuterierte interne Standards.

Substanz	Hersteller
Bisphenol	Synthese (Johänning et al. 2015)
(Z)-Metabolit E	Synthese (Johänning et al. 2015)
(E)-Metabolit E	Synthese (Johänning et al. 2015)
[² H ₅]-Bisphenol	Synthese (Johänning et al. 2015)
[² H ₅]-(<i>Z</i>)-Metabolit E	Synthese (Johänning et al. 2015)
[² H ₅]-(<i>E</i>)-Metabolit E	Synthese (Johänning et al. 2015)
Östradiol	Sigma-Aldrich Co.
Östron	Sigma-Aldrich Co.
Testosteron	Sigma-Aldrich Co.
Androstendion	Sigma-Aldrich Co.
Progesteron	Steraloids Incorporated
[² H ₃]-Östradiol	Sigma-Aldrich Co.
[² H ₄]-Östron	Toronto Research Chemicals Incorporated
[² H ₃]-Testosteron	Steraloids Incorporated
[² H ₇]-Androstendion	Alsachim
[² H ₉]-Progesteron	Steraloids Incorporated
Tamoxifen	Sigma-Aldrich Co.
Tamoxifen-NO	Klinge Pharma GmbH
DM-Tamoxifen	Klinge Pharma GmbH
DDM-Tamoxifen	Klinge Pharma GmbH
(<i>E/Z</i>)-4-OH-Tamoxifen	Sigma-Aldrich Co.
(<i>E/Z</i>)-Endoxifen	Synthese (Mürdter et al. 2011)
(<i>E/Z</i>)-Norendoxifen	Synthese
a-OH-Tamoxifen	Toronto Research Chemicals Incorporated
3-OH-Tamoxifen	Santa Cruz Biotechnology, Incorporated
3-OH-DM-Tamoxifen	Toronto Research Chemicals Incorporated
(<i>Z</i>)-4'-OH-Tamoxifen	Synthese (Mürdter et al. 2011)

(Z)-4'-OH-DM-Tamoxifen	Synthese
(E/Z)-DM-Tam-4-O-Gluc	Synthese (Mürdter et al. 2011)
(E/Z)-Tam-4-O-Gluc	Synthese (Mürdter et al. 2011)
Tamoxifen-N-Gluc	Synthese (Mürdter et al. 2011)
[² H ₃]-Tamoxifen	Synthese (Mürdter et al. 2011)
[² H ₅]-DM-Tamoxifen	Toronto Research Chemicals Incorporated
[² H ₅]-(<i>E/Z</i>)-4-OH-Tamoxifen	Synthese (Mürdter et al. 2011)
[² H ₅]-(<i>E/Z</i>)-Endoxifen	Toronto Research Chemicals Incorporated
[² H ₅]-(<i>Z/E</i>)-Tam-4-O-Gluc	Synthese (Mürdter et al. 2011)
Phenacetin	Toronto Research Chemicals Incorporated
Amodiaquin	Toronto Research Chemicals Incorporated
Bupropion	Synthese (Richter et al. 2004)
Mephenytoin	Prof. Urs Meyer, Biozentrum Basel
Propafenon	Knoll GmbH
Tolbutamid	Toronto Research Chemicals Incorporated
Atorvastatin	Toronto Research Chemicals Incorporated
Acetaminophen	Toronto Research Chemicals Incorporated
N-DE-Amodiaquine	Toronto Research Chemicals Incorporated
OH-Bupropion	Synthese (Richter et al. 2004)
4'-OH-Mephenytoin	Synthese (Richter et al. 2004)
5-OH-Propafenon	Knoll GmbH
OH-Tolbutamide	Toronto Research Chemicals Incorporated
2-OH-Atorvastatin	Toronto Research Chemicals Incorporated
[² H ₄]-Acetaminophen	Toronto Research Chemicals Incorporated
[² H ₅]-N-DE-Amodiaquine	Toronto Research Chemicals Incorporated
[² H ₃]-OH-Bupropion	Synthese (Richter et al. 2004)
[² H ₃]-4'-OH-Mephenytoin	Synthese (Richter et al. 2004)
[² H ₇]-5-OH-Propafenon	Synthese (Richter et al. 2004)
[² H ₉]-OH-Tolbutamide	Toronto Research Chemicals Incorporated
[² H ₅]-2-OH-Atorvastatin	Toronto Research Chemicals Incorporated

2.1.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 5 Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Substanz	Konzentration
Aktivkohlesuspension	Norit A Aktivkohle	2,5 % w/v
	Dextran T	0,25 % w/v
	Tris pH 8,3	10 mM
Blockpuffer	Magermilchpulver in TBST	5 % w/v
Elektrophoresepuffer	Tris Base	25 mM
	Glycin	250 mM
	SDS	0,1 % w/v
Lysepuffer	Tris pH 7,6	50 mM
	NaCl	0,25 M
	EDTA	5 mM
	Triton X100	0,1 % v/v
	Protease Inhibitor Cocktail cOmplete™ (Roche Molecular Systems, Incorporated)	1 Tablette/50 ml
NADPH-regenerierendes System	MgCl ₂	5 mM
	Glucose-6-Phosphat	5 mM
	NADP ⁺	0,5 mM
	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	10 U
	in Natriumphosphatpuffer pH 7,4	100 mM
Natriumphosphatpuffer pH 7,4	Natriumdihydrogenphosphat	100 mM
	Dinatriumhydrogenphosphat	100 mM
Natriumphosphatpuffer pH 8,0	Natriumdihydrogenphosphat	50 mM
	Dinatriumhydrogenphosphat	50 mM
SDS-Puffer	Tris pH 6,8	62,5 mM
	Dithiothreitol	50 mM
	SDS	2 % w/v
	Glycerol	10 % v/v
	Bromphenolblau	0,01 % w/v
TBST	Tris pH 6,7	20 mM
	NaCl	137 mM
	Tween 20	0,1 % v/v
Transferpuffer	Tris pH 8,3	50 mM
	Glycin	40 mM
	SDS	0,037 % w/v
	Methanol	20 % v/v

NADPH: Nicotinamidadenindinukleotdiphosphat; TBST: *Tris buffered saline with Tween 20*

2.1.7 Zellkultur

2.1.7.1 Zelllinien

Tabelle 6 Verwendete Zelllinien sowie Charakteristika und Herkunft der Zellen.

Zelllinie	Charakteristika	Herkunft
HC-AFW1	Humane Leberblastomzellen, adhären (Armeanu-Ebinger et al. 2012; Braeuning et al. 2015)	Arbeitsgruppe Prof. Dr. Sorin Armeanu-Ebinger, Universitätsklinikum Tübingen
HepaRG™	Humane Hepatomzellen, adhären, Leber-Vorläuferzellen, Differenzierung in Leber- und Gallengangzellen (Gripon et al. 2002; Parent et al. 2004)	Biopredic International; Inserm Transfert
MCF7	Humane Mammakarzinomzellen, adhären	ATCC/ National Cancer Institute
MCF7 5xERE circ. #1	Humane Mammakarzinomzellen, stabile Transfektion mit Östrogen-sensitivem Luciferase-Reportergen, adhären	Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie, Stuttgart
Upcyte® Hepatozyten 653-03	Humane Hepatozyten eines einzelnen Spenders, adhären (Burkard et al. 2012)	upcyte technologies GmbH
Upcyte® Hepatozyten 653-03 #138 2D6	Humane Hepatozyten eines einzelnen Spenders, adhären, stabil mit CYP2D6 transduziert	upcyte technologies GmbH

2.1.7.2 Nährmedium

Tabelle 7 Kulturmedien der Zelllinien.

Zelllinie	Wachstumsmedium	Differenzierungsmedium	Sonstiges Medium	Kryokonservierungsmedium
HC-AFW1	DMEM <i>high Glucose</i> <i>ohne L-Glutamin</i>			90% Wachstumsmedium
	ohne Phenolrot			10% DMSO
	10% FCS (v/v)			
	2mM L-Glutamin			
	1mM Natriumpyruvat			
	100U/ml Penicillin			
	100µg/ml Streptomycin			

HepaRG™	William's E Medium	William's E Medium		90%
	Phenolrot	ohne Phenolrot		Wachstums- medium
	10% FCS (v/v)	10% FCS (v/v)		10% DMSO
	2mM L-Glutamin	2mM L-Glutamin		
	5µg/ml Insulin	5µg/ml Insulin		
	50µM Hydrocortison hemisuccinat	50µM Hydrocortison hemisuccinat		
	100U/ml Penicillin	2% DMSO (v/v)		
	100µg/ml Streptomycin	100U/ml Penicillin 100µg/ml Streptomycin		
MCF7	DMEM <i>high Glucose</i>	-	-	95% FCS
	Phenolrot			5%DMSO
	10% FCS (v/v)			
	1mM Natriumpyruvat			
	0,05mg/ml Gentamycin			
MCF7 5xERE circ. #1	DMEM <i>high Glucose</i>		Hormondepri-viertes Medium:	95% FCS
	Phenolrot			5%DMSO
	10% FCS (v/v)		DMEM <i>high Glucose</i>	
	1mM Natriumpyruvat		ohne Phenolrot	
	0,05mg/ml Gentamycin		10% CCS (v/v)	
			1mM Natriumpyruvat 0,05mg/ml Gentamycin	
Upcyte® Hepatozyten 653-03 und #138 2D6	<i>Hepatocyte growth medium</i>	<i>Hepatocyte growth medium</i>	<i>High performance medium</i>	70% Wachstums- medium
	Zusatz A	Zusatz A	Zusatz A	20% FCS
	Zusatz B	Zusatz B	2mM L-Glutamin	10% DMSO
	2mM L-Glutamin	2mM L-Glutamin	0,1% DMSO (v/v)	
		0,5% DMSO (v/v)		

2.1.8 Humane Lebermikrosomen

Humane Lebermikrosomen (HLM) wurden aus gesundem Lebergewebe von 150 Patienten, die sich Leberoperationen an der Charité Campus Virchow-Klinikum, Humboldt Universität, Berlin unterzogen, wie von Lang *et al.* und Wolbold *et al.* (Lang *et al.* 2001; Wolbold *et al.* 2003) beschrieben, gewonnen. Die Studie wurde von den Ethikkommissionen der Charité, Humboldt Universität Berlin und der Eberhard Karls Universität Tübingen genehmigt. Alle Patienten wurden über die Studie informiert und willigten schriftlich in die Teilnahme ein.

2.1.9 Aktivkohle behandeltes Plasma und Serum

Für die Hormondeprivation von humanem Heparinplasma bzw. fötalem Kälberserum (*fetal calve serum*, FCS) wurde 10 ml der Aktivkohlelösung (2.1.6) in 50 ml Reaktionsgefäße überführt, für 10 min bei 3000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und anschließend das Reaktionsgefäß mit dem Plasma oder Serum aufgefüllt. Das Gemisch wurde dann für 30 min bei 56 °C im Wasserbad unter regelmäßigem invertieren inkubiert, für 10 min auf Eis gestellt und im Anschluss die Aktivkohle für 15 min bei 3000 g pelletiert. Der Überstand wurde erneut wie beschrieben mit Aktivkohle inkubiert, um Aktivkohle-behandeltes humanes Plasma (*charcoal stripped human plasma*; CHP) bzw. FCS (*charcoal stripped fetal calve serum*, CCS) zu erhalten. Das CCS wurde vor der Verwendung in der Zellkultur mit Hilfe eines 0,2 µm Filters steril filtriert.

2.1.10 Antikörper

2.1.10.1 Primäre Antikörper

Tabelle 8 Verwendete primäre Antikörper.

Antigen	Reaktivität	Spezies	Bezeichnung	Klonalität	Hersteller
CYP3A	Mensch	Maus	WB-MAB-3A	monoklonal	BD Biosciences
CYP2D6	Mensch	Maus	WB-MAB-2D6	monoklonal	Corning Incorporated
β-actin	Mensch	Maus	AC-74	monoklonal	Sigma-Aldrich Corporation

2.1.10.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 9 Verwendete sekundäre Antikörper.

Antigen	Reaktivität	Spezies	Bezeichnung	Konjugat	Hersteller
IgG	Maus	Pferd	<i>Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076</i>	HRP	Cell Signaling Technology
Biotin	Alle Spezies	Ziege	<i>Anti-biotin, HRP-linked Antibody #7075</i>	HRP	Cell Signaling Technology

2.1.11 Oligonukleotide

2.1.11.1 Fluidigm's BioMark™ HD quantitative PCR

Tabelle 10 Verwendete Oligonukleotide für Fluidigm's BioMark™ HD quantitative PCR.

Genname	Assaynummer	Kontext Sequenz (5' -> 3')	Hersteller
ABCB1	Hs01067802_m1	ATCGAGTCACTGCCTAATAAATATA	Thermo Fisher Scientific Inc.
ABCC11	Hs01090770_m1	nicht verfügbar	Thermo Fisher Scientific Inc.
ABCC2	Hs00166123_m1	CTCCAACAGGTGGCTTGCAATTCGC	Thermo Fisher Scientific Inc.
ABCG2	Hs00184979_m1	nicht verfügbar	Thermo Fisher Scientific Inc.
CYP1A1	Hs00153120_m1	AGCTCAGTACCTCAGCCACCTCCAA	Thermo Fisher Scientific Inc.
CYP1A2	Hs01070374_m1	GTCAACCATGACCCAGAGCTGTGGG	Thermo Fisher Scientific Inc.
CYP1A2	Hs00167927_m1	GGACTTTGACAAGAACAGTGTCCGG	Thermo Fisher Scientific Inc.
CYP2A6	Hs00868409_s1	GAAAGGGCAGGGCCAAGACGGGGCT	Thermo Fisher Scientific Inc.
CYP2B6	Hs03044634_m1	CTCATGTTGCAGAGAGAGTCTACAG	Thermo Fisher Scientific Inc.
CYP2C19	Hs00426380_m1	TGATCAAATGGAGAAGGAAAAGCA	Thermo Fisher Scientific Inc.
CYP2C8	Hs00946140_g1	AGAATTACTAAAGGACTTGAATCA	Thermo Fisher Scientific Inc.
CYP2C8	Hs00258314_m1	ATCCCAAGAGCTTTGATAACAAGA	Thermo Fisher Scientific Inc.
CYP2C9	Hs00426397_m1	CCCAGAGGTCACAGCTAAAGTCCAG	Thermo Fisher Scientific Inc.
CYP2E1	Hs00559368_m1	TGAGATCGAAGAGAAGCTCCATGAA	Thermo Fisher Scientific Inc.
CYP3A4	Hs00430021_m1	CACAAAAGCACCGAGTGGATTCCT	Thermo Fisher Scientific Inc.

GAPDH	Hs02758991_g1	GACTCATGACCACAGTCCATGCCAT	Thermo Fisher Scientific Inc.
GSTA2	Hs00747232_mH	TCCCTGCCTTTGAAAAAGTCTTAAA	Thermo Fisher Scientific Inc.
GSTM1	Hs01683722_gH	ACAATCCAGAATTTGAGAAACTGAA	Thermo Fisher Scientific Inc.
GSTP1	Hs00168310_m1	CAGTCTTCGCCACCATGCCGCCCTA	Thermo Fisher Scientific Inc.
NAT1	Hs00265080_s1	GAGTTCAAGACTCTGAGTGAGGAAG	Thermo Fisher Scientific Inc.
NAT2	Hs00605099_m1	TGGTTGCTGGCCAAAGGGATCATGG	Thermo Fisher Scientific Inc.
SLC10A1	Hs00161820_m1	GGACATGAACCTCAGCATTGTGATG	Thermo Fisher Scientific Inc.
SLC10A1	Hs00161820_m1	GGACATGAACCTCAGCATTGTGATG	Thermo Fisher Scientific Inc.
SLC22A7	Hs00198527_m1	ATCCTCAGCCTCTGGTGGGTGCCTG	Thermo Fisher Scientific Inc.
SLCO1B1	Hs00272374_m1	AATTCCACATCATTTTCAAGGGTCT	Thermo Fisher Scientific Inc.
SLCO1B1	Hs00272374_m1	AATTCCACATCATTTTCAAGGGTCT	Thermo Fisher Scientific Inc.
SULT1A1	Hs00738644_m1	AATTCTGGAACACCTATATGGTGGT	Thermo Fisher Scientific Inc.
SULT1B1	Hs00234899_m1	AAAACAATTGCAAGATGATTTATCT	Thermo Fisher Scientific Inc.

2.2 Methoden

2.2.1 HPLC-ESI-MS/MS Analytik von östrogenen Tamoxifenmetaboliten und Sexualhormonen

2.2.1.1 Eichpunkte und Qualitätskontrollen

Die Stammlösungen von Bisphenol, (*Z*)- und (*E*)-Metabolit E sowie die internen Standards [²H₅]-Bisphenol und (*E/Z*)-[²H₅]-Metabolit E wurden je zu 10 mM in DMSO gelöst. Die Stammlösung von Östradiol und [²H₄]-Östron wurden zu 1 mg/ml in Acetonitril angesetzt, während der interne Standard [²H₃]-Östradiol in gleicher Konzentration in Ethanol gelöst wurde. Alle weiteren Stammlösungen von Östron, Testosteron, Androstendion und Progesteron sowie die entsprechenden internen Standards wurden zu 1 mg/ml in DMSO gelöst. Die Stammlösungen wurden in braunen Glasfläschchen bei -20 °C gelagert. Die Arbeitslösungen (AL) der Analyten wurde durch Vereinigung und Verdünnungen der Stammlösungen in Wasser:Acetonitril (1:1, v/v) mit finalen Konzentrationen wie folgt hergestellt: AL1 (Bisphenol 90 nM, (*Z*)-Metabolit E 187,5 nM, (*E*)-Metabolit E 60 nM, Östradiol 30 nM, Östron 30 nM, Testosteron 375 nM, Androstendion 375 nM, Progesteron 187,5 nM), AL2 (Bisphenol 6 nM, (*Z*)-Metabolit E 12,5 nM, (*E*)-Metabolit E 4 nM, Östradiol 2 nM, Östron 2 nM, Testosteron 25 nM, Androstendion 25 nM, Progesteron 12,5 nM). Es wurden separate ALs für die Eichpunkte und Qualitätskontrollen hergestellt. Zur Generierung der neun Eichpunkte und drei Qualitätskontrollen (niedrige, mittlere und hohe Konzentration) wurde CHP mit einem entsprechenden Volumen der Arbeitslösungen versetzt und bei -20 °C gelagert. Die finale Konzentration der Arbeitslösungen, der Eichpunkte und der Qualitätskontrollen sowie deren Herstellung sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Die internen Standards der Analyten wurden in Acetonitril zu einer Arbeitslösung verdünnt, von der 10 µl zu den aufzuarbeitenden Proben gegeben wurde (finale Konzentration Bisphenol 1700 pM, (*E/Z*)-Metabolit E 2660 pM, [²H₃]-Östradiol 550 pM, [²H₄]-Östron 550 pM, [²H₃]-Testosteron 7000 pM, [²H₇]-Androstendion 7000 pM, [²H₉]-Progesteron 3400 pM).

Tabelle 11 Konzentration der Eichpunkte und Qualitätskontrollen, eingesetzte Volumina für die Analytikmethode zur Quantifizierung von östrogenen Tamoxifenmetaboliten und Sexualhormonen.

Substanz	EP1	EP2	EP3	EP4	EP5	EP6	EP7	EP8	EP9	QK1	QK2	QK3
pM												
Bis	12	24	48	72	108	216	432	864	1728	36	108	1215
(Z)-Met E	25	50	100	150	225	450	900	1800	3600	75	225	2531,25
(E)-Met E	8	16	32	48	72	144	288	576	1152	24	72	810
Östradiol	4	8	16	24	36	72	144	288	576	12	36	405
Östron	4	8	16	24	36	72	144	288	576	12	36	405
Testosteron	50	100	200	300	450	900	1800	3600	7200	150	450	5062,5
Androstendion	50	100	200	300	450	900	1800	3600	7200	150	450	5062,5
Progesteron	25	50	100	150	225	450	900	1800	3600	75	225	2531,25
AL1 [µl]							2,4	4,8	9,6	19,2		
AL2 [µl]	2	4	8	12	18					6	18	13,5
CHP [µl]	998	996	992	988	982	997,6	995,2	990,4	980,8	994	982	986,5

EP: Eichpunkt; QK: Qualitätskontrolle; Bis: Bisphenol; Met E: Metabolit E; AL: Arbeitslösung; CHP: *Charcoal stripped human heparinplasma*, Aktivkohle-behandeltes humanes Heparinplasma

2.2.1.2 Probenaufbereitung

Zu 200 µl Heparinplasma wurden 10 µl der internen Standard-AL gegeben. Zur Proteinfällung wurde die Probe mit gleichem Volumen an Acetonitril, welches 1 % (v/v) Eisessig enthielt, für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und bei 20.000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit 800 µl 0,1 M Essigsäure verdünnt und zur Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) in eine C18 Bond Elut® 96-Lochplatte (well-Platte), welche zuvor mit 1 ml Methanol und 1 ml 0,1 M Essigsäure konditioniert wurde, überführt. Die Proben passierten die SPE-Platte ohne äußeren Druck mit Hilfe der Schwerkraft. Anschließend wurde die SPE-Platte mit 0,8 ml 0,1 M Essigsäure und 0,8 ml Acetonitril in Wasser (20:80, v/v) gewaschen. Dabei wurde mittels eines Stickstoffstroms ein äußerer Druck von 0,2 bar (20,7 kPa) angelegt. Im Folgenden wurde die Platte mit Hilfe eines Stickstoffstroms für 2 min bei 3,5 bar (344,7 kPa) Überdruck getrocknet. Zur Elution der Analyten wurde 500 µl Acetonitril verwendet, welches per Schwerkraft durch die SPE-Platte passieren konnte. Die eluierten Analyten wurden anschließend unter einem Stickstoffstrom bei 40 °C zur Trockene eingengt.

2.2.1.3 Derivatisierung

Zur Steigerung der Sensitivität der Detektion von Bisphenol, (*Z*)- und (*E*)-Metabolit E, Östradiol und Östron im positiven Elektrosprayionisations- (*electrospray ionisation*, ESI) Modus des MS-Geräts wurden die gereinigten Analyten derivatisiert, wie beispielhaft an Metabolit E in Abbildung 5 gezeigt ist.

Die getrockneten Proben wurden in 30 µl einer gesättigten 3-[(N-Succinimid-1-yl)oxycarbonyl]-1-methylpyridinium iodid-Lösung (ca. 10 mg/ml in Acetonitril) unter starken Durchmischen für 1 min gelöst. Die Derivatisierungsreaktion wurde durch Zugabe von 30 µl eines 50 mM Natriumphosphatpuffers (pH 8) gestartet und nach 5 min mit 90 µl einer 1 % (v/v) Essiglösung gestoppt. Nach Zentrifugation bei 2772 g für 10 min wurden 130 µl des Überstandes in eine 96-well-Platte mit V-förmigen Boden überführt. Zur Detektion der Analyten wurden 20 µl der derivatisierten Probe zur HPLC-MS/MS Analyse injiziert.

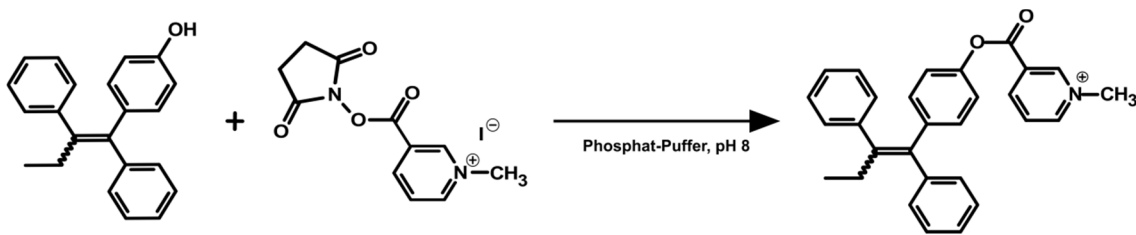


Abbildung 5 Derivatisierungsreaktion von Metabolit E mit 3-[(N-Succinimid-1-yl)oxycarbonyl]-1-methylpyridiniumiodid.

2.2.1.4 Chromatographie

Zur chromatographischen Trennung der derivatisierten Analyten wurde ein 1200 Rapid Resolution LC-System mit einer ZORBAX Eclipse Plus-C18 Säule (Partikelgröße 1,8 µm, Maße 2,1x100 mm) genutzt. Die Trennung erfolgte bei 45 °C mit Hilfe eines Gradienten von 0,1 % Ameisensäure (v/v) in Acetonitril:Wasser mit einem Fluss von 0,45 ml/min über 17,5 min. Nach jeder Injektion wurde das System für 3 min rekonditioniert. Der Gradient für die Chromatographie ist in Tabelle 12 zusammengefasst.

Wenn nur die östrogenen Tamoxifenmetaboliten Bisphenol, (*Z*)-, und (*E*)-Metabolit E quantifiziert wurden, wurde eine verkürzte Chromatographie angewendet: statt, wie in Tabelle 12 gezeigt, das Spülen und Rekonditionieren des System ab 13,5 min mit einem Gemisch von 0,1 % Ameisensäure in 90:10 Acetonitril:Wasser (v/v) zu beginnen, wurde dies in der verkürzten Methode ab 11 min nach Chromatographiestart für 2 min begonnen. Anschließend wurde nach 13 min bis 13,5 min wieder die

Ausgangsbedingungen der Chromatographie hergestellt und wie oben beschrieben das System für 3 min rekonditioniert.

Tabelle 12 HPLC Gradient der Analytikmethode zur Quantifizierung von östrogenen Tamoxifenmetaboliten und Sexualhormonen.

Zeit [min]	0,1 % Ameisensäure in Wasser [%]	0,1 % Ameisensäure in Acetonitril [%]	Flussgeschwindigkeit [ml/min]
0,0	75	25	0,45
3,0	75	25	0,45
7,0	50	50	0,45
9,0	40	60	0,45
13,0	30	70	0,45
13,5	10	90	0,45
15,5	10	90	0,45
16,0	75	25	0,45
17,5	75	25	0,45

2.2.1.5 MS/MS-Parameter

Die chromatographisch getrennten Analyten wurden mit Hilfe eines 6460 Triple Quadrupol-Massenspektrometers von Agilent im *multiple reaction monitoring* (MRM) Modus detektiert. Als Ionisierungsquelle diente ein Jet Stream Elektrospray, welches im positiven ESI Modus und mit folgenden Parametern betrieben wurde: Gas Temperatur 250 °C, Gasfluss 12 l/min, *Nebulizer* Druck 50 psi, *Sheath* Gas Temperatur 350 °C, *Sheath* Gasfluss 12 l/min, *Capillary* 3500 V, *V Charging* 1000 V. Die MS-Parameter sowie die Retentionszeiten von Bisphenol, (*Z*)- und (*E*)-Metabolit E, der Sexualhormone und der entsprechenden internen Standards sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Um die Sensitivität der Messungen zu steigern, wurden verschiedene Detektionsabschnitte für die Substanzen und deren interne Standards benutzt: 2 min – 6,2 min Östradiol und Östron; 6,2 min – 9,1 min Bisphenol, Metabolit E, Testosteron und Androstendion; 9,1 min – 12,3 min Progesteron.

Tabelle 13 MS/MS-Parameter und Retentionszeiten der östrogenen Tamoxifenmetaboliten und der Sexualhormone.

Analyt	Retentionszeit [min]	MRM	Dwell time [ms]	Fragmentorspannung [V]	Kollisionsenergie [V]	ESI Modus
Bis	6,52	436,2 -> 93	100	220	48	positiv
(Z)-Met E	7,87	420,2 -> 93	75	210	44	positiv
(E)-Met E	7,52	420,2 -> 93	75	210	44	positiv
[²H₅]-Bis	6,55	441,2 -> 93	100	220	48	positiv
[²H₅]-(Z)-Met E	7,85	425,2 -> 93	75	210	44	positiv
[²H₅]-(E)-Met E	7,50	425,2 -> 93	75	210	44	positiv
Östradiol	3,10	392,2 -> 93	200	225	52	positiv
Östron	4,43	394,2 -> 93	200	225	52	positiv
Testosteron	7,06	289,2 -> 97,1	50	92	24	positiv
Androstendion	7,61	287,2 -> 97,1	50	120	20	positiv
Progesteron	9,54	315,2 -> 97,2	300	110	22	positiv
[²H₃]-Östradiol	3,03	395,2 -> 93	50	225	52	positiv
[²H₄]-Östron	4,41	394,2 -> 93	50	225	52	positiv
[²H₃]-Testosteron	7,02	292,2 -> 97,1	20	92	24	positiv
[²H₇]- Androstendion	7,57	294,3 -> 100,1	20	120	20	positiv
[²H₉]-Progesteron	9,47	324,3 -> 100,1	50	110	22	positiv

MRM: *multiple reaction monitoring*; ESI: Elektrosprayionisation; Bis: Bisphenol; Met E: Metabolit E;

2.2.1.6 Datenanalyse

Zur Analyse der Messdaten wurde das Programm *Agilent MassHunter Quantitative Analysis Software* B.06.00 verwendet. Zur Generierung der jeweiligen Eichgeraden wurde das Verhältnis der Signalfläche des Analyten zu der des entsprechenden internen Standards gegen die bekannte Konzentration für jeden Eichpunkt aufgetragen und eine Regressionsgerade mit einer Gewichtung von $1/x$ durch die erhaltenen Punkte gelegt. Anhand der berechneten Regressionsgeraden wurden die Konzentrationen der Analyten in den Proben mit Hilfe des Verhältnisses der Signalflächen von Analyt zu internem Standard ermittelt.

2.2.1.7 Validierung

Die Validierung der Messmethode erfolgte nach den Richtlinien der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA), für die Genauigkeit (Selektivität), Sensitivität (Detektions- und Quantifizierungslimit), Linearität, Präzision (Reproduzierbarkeit) und Stabilität der Methode untersucht wurden (Food et al. 2015).

Die Genauigkeit und Selektivität der Methode wurde mittels CHP ohne und mit zugegebenen Analyten und internen Standards in sechsfacher Wiederholung untersucht. Die Detektions- und Quantifizierungsgrenze (*lower limit of detection*, LLOD; *lower limit of quantification*, LLOQ) wurde durch serielle Verdünnung der Analyten in CHP in sechsfacher Wiederholung getestet. Der LLOQ entspricht dabei der Konzentration, bei der die Abweichung des Mittelwerts vom Sollwert und die Varianz nicht mehr als 20 % betragen. Die Präzision und Reproduzierbarkeit wurde durch das Aufbereiten von jeweils sechs Eichpunkten in niedriger, mittlerer und hoher Konzentration in einer Probenserie als *intra-day* Variabilität untersucht. Zur Untersuchung der Variabilität zwischen Probenserien (*inter-day* Variabilität) wurde die Aufbereitung der sechs Eichpunkte in niedriger, mittlerer und hoher Konzentration dreimal unabhängig wiederholt. Die Abweichung der Mittelwerte in der *intra-day* und *inter-day* Wiederholung vom Sollwert sowie die Varianz darf dabei maximal 15 % betragen. Um die Stabilität der Proben zu untersuchen, wurden diese für 8 Std. bei RT gelagert, drei Frier-Tau-Zyklen unterzogen und nach Aufarbeitung und Derivatisierung die Stabilität für 33 Std. bei 6 °C getestet. Die Wiederfindungsrate wurde bei niedriger, mittlerer und hoher Konzentration in Triplikaten ermittelt, indem die erhaltenen Signalflächen vor und nach Aufarbeitung verglichen wurden. Die Ionensuppression durch die Matrix wurde bei mittlerer und hoher Konzentration in Triplikaten durch den Vergleich der Signalflächen mit und ohne extrahierten CHP ermittelt.

2.2.1.8 Quantifizierung von *in vitro* Inkubationen mit humanen Lebermikrosomen und Supersomes™

Für die Quantifizierung von *in vitro* Inkubationen mit humanen Lebermikrosomen (s. 2.2.4.1) und Supersomes™ (s. 2.2.4.2) wurden 100 µl der erhaltenen Proteinfällung mit 200 µl 0,1 M Essigsäure verdünnt und wie in 2.2.1.2 und folgend beschrieben der Probenaufarbeitung, Derivatisierung und HPLC-MS/MS-Quantifizierung unterzogen. Die Konzentrationen der Eichpunkte für die Messung der *in vitro* Inkubationen wurde wie folgt angepasst: Bisphenol 0,0135 nM – 1,728 nM, (Z)-Metabolit E 1,5625 nM – 400 nM, (E)-Metabolit E 0,15625 nM – 40 nM. Die Eichpunkte wurden in der entsprechenden Matrix generiert (10 min bei 95 °C abgekochte Schweinelebermikrosomen; Kontroll-

Supersomes™). Da ausschließlich der Stoffwechsel von Tamoxifen zu den östrogenen Metaboliten untersucht wurde, wurde die verkürzte Chromatographiemethode verwendet.

2.2.1.9 Quantifizierung von *in vitro* Inkubationen mit Hepatozyten

Für die Quantifizierung von Zellmedium nach *in vitro* Inkubationen mit Hepatozyten wurden 200 µl des Zellmediums mit 200 µl 1 % (v/v) Essigsäure in Acetonitril, welche die internen Standards der östrogenen Tamoxifenmetaboliten enthielt, versetzt und wie in 2.2.1.2 und folgend beschrieben durch Probenaufarbeitung, Derivatisierung und HPLC-MS/MS-Messung quantifiziert. Da ausschließlich der Stoffwechsel von Tamoxifen zu den östrogenen Metaboliten untersucht wurde, wurde die verkürzte Chromatographiemethode verwendet.

2.2.2 HPLC-MS/MS Analytik von nicht-östrogenen Tamoxifenmetaboliten

2.2.2.1 Eichpunkte und Qualitätskontrollen

Alle Stammlösungen der Analyten wurden zu 2 mM in DMSO angesetzt, mit Ausnahme von DM-Tamoxifen, welches zu 5 mM in DMSO gelöst wurde. Die internen Standards [²H₃]-Tamoxifen, [²H₅]-DM-Tamoxifen, [²H₅]-(*E/Z*)-4-OH-Tamoxifen (Isomerenverhältnis: 68 % (*Z*)-Isomer), [²H₅]-(*E/Z*)-Endoxifen (Isomerenverhältnis: 50 % (*Z*)-Isomer) und [²H₅]-(*E/Z*)-Tamoxifen-4-O-Glucuronid (Isomerenverhältnis: 49 % (*Z*)-Isomer) wurden zu 1 mg/ml in DMSO gelöst. Alle Stammlösungen wurden in braunen Glasfläschchen bei -20 °C gelagert. Aus den Stammlösungen wurden durch Vereinigung und seriell Verdünnen sieben ALs der Eichpunkte und drei ALs der Qualitätskontrollen hergestellt. Die jeweiligen ALs wurden hundertfach in Matrix verdünnt, um die Eichpunkte und Qualitätskontrollen zu erhalten. Die Konzentrationen der Eichpunkte und Qualitätskontrollen sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Die Stammlösungen der internen Standards wurden zu einer AL vereinigt und in Acetonitril verdünnt. Die finale Konzentrationen der Standards in der Probe waren wie folgt: [²H₃]-Tamoxifen 195,82 nM, [²H₅]-DM-Tamoxifen 404,6 nM, [²H₅]-(*E/Z*)-4-OH-Tamoxifen 20,4 nM, [²H₅]-(*E/Z*)-Endoxifen 42,3 nM, [²H₅]-(*E/Z*)-Tamoxifen-4-O-Glucuronid 22,1 nM.

Tabelle 14 Konzentration der Eichpunkte und Qualitätskontrollen für die Quantifizierung von nicht-östrogenen Tamoxifenmetaboliten.

Substanz	EP1	EP 2	Ep 3	EP 4	EP 5	EP 6	EP 7	QK1	QK2	QK3
Tamoxifen	25	50	100	250	500	1000	1500	50	600	1200
Tamoxifen-NO	2,5	5	10	25	50	100	150	5	60	120
DM-Tamoxifen	35	70	140	350	700	1400	2100	70	840	1680
DDM-Tamoxifen	5	10	20	50	100	200	300	10	120	240
(E/Z)-4-OH-Tamoxifen	0,3	0,6	1,2	3	6	12	18	0,6	7,2	14,4
(Z)-Endoxifen	2,5	5	10	25	50	100	150	5	60	120
(E)-Endoxifen	0,25	0,5	1	2,5	5	10	15	0,5	6	12
(E/Z)-Norendoxifen	0,75	1,5	3	7,5	15	30	45	1,5	18	36
a-OH-Tamoxifen	0,05	0,1	0,2	0,5	1	2	3	0,1	1,2	2,4
3-OH-Tamoxifen	0,05	0,1	0,2	0,5	1	2	3	0,1	1,2	2,4
3-OH-DM-Tamoxifen	0,15	0,3	0,6	1,5	3	6	9	0,3	3,6	7,2
(E)-DM-Tam-4-O-Gluc	0,15	0,3	0,6	1,5	3	6	9	0,3	3,6	7,2
(Z)-DM-Tam-4-O-Gluc	0,1	0,2	0,4	1	2	4	6	0,2	2,4	4,8
(E/Z)-Tam-4-O-Gluc	0,1	0,2	0,4	1	2	4	6	0,2	2,4	4,8
Tamoxifen-N-Gluc	0,3	0,6	1,2	3	6	12	18	0,6	7,2	14,4

EP: Eichpunkt; QK: Qualitätskontrolle; Gluc: Glucuronid

2.2.2.2 Probenaufbereitung

Bei *in vitro* Inkubationen von humanen Lebermikrosomen oder Supersomes™ wurden 25 µl der wie in 2.2.4.1 und 2.2.4.2 beschrieben erhaltenen Proteinfällung mit 50 µl 0,1 % Ameisensäure (v/v) in Wasser verdünnt und 5 µl zur Quantifizierung injiziert. Zellmedium von *in vitro* Inkubationen mit Hepatozyten wurde mit der gleichen Menge an 1 % Essig (v/v) in Acetonitril, welches die internen Standards enthielt, gefällt. Anschließend wurden 100 µl der Proteinfällung mit 100 µl 0,1 % Ameisensäure (v/v) in Wasser verdünnt und 10 µl zur Quantifizierung injiziert.

2.2.2.3 Chromatographie und MS/MS Parameter

Die Analyten wurden mit Hilfe eines 1200 Rapid Resolution LC-System mit einer ZORBAX Eclipse Plus-C18 Säule (Partikelgröße 1,8 µm, Maße 2,1x100 mm) chromatographisch bei 45 °C getrennt. Dazu wurde ein Gradient von 0,1 % Ameisensäure (v/v) in Acetonitril:Wasser (mobile Phase A 0,1 %

Ameisensäure in Wasser; mobile Phase B 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril) mit einem Fluss von 0,45 ml/min über 18 min wie folgt genutzt: 2 min 25 % mobile Phase B, Erhöhung auf 30 % mobile Phase B nach 4 min, weitere Erhöhung auf 35 % mobile Phase B nach 8,5 min, Steigerung der Elutionskraft durch 70 % mobile Phase B nach 12 min, Auswaschung der Säule mit Hilfe von 80 % mobile Phase B von 12,2 min – 15 min, Wiedereinstellung der Ausgangsbedingung nach 15,5 min – 18 min. Anschließend wurde das System weitere 2 min rekonditioniert. Die chromatographisch getrennten Analyten wurden mit einem 6460 Triple Quadrupol Massenspektrometer im MRM Modus detektiert. Als Ionisierungsquelle wurde ein Jet Stream Elektrospray im positiven ESI Modus genutzt, welches mit folgenden Parametern betrieben wurde: Gas Temperatur 325 °C, Gasfluss 10 l/min, Nebulizer Druck 40 psi, Sheath Gas Temperatur 350 °C, Sheath Gasfluss 11 l/min, Capillary 4000 V, V Charging 500 V. Die Messung der Analyten und der entsprechenden internen Standards erfolgte in unterschiedlichen Zeitsegmenten, um die Sensitivität der Detektion zu steigern, wie folgt: 3,0 – 7,0 min (*E/Z*)-Tamoxifen-4-O-Glucuronid, (*E/Z*)-DM-Tamoxifen-4-O-Glucuronid, *a*-OH-Tamoxifen, 4'-OH-Tamoxifen, *a*-OH-DM-Tamoxifen und 4'-OH-DM-Tamoxifen, 7,0 – 10,5 min (*E/Z*)-4-OH-Tamoxifen, (*E/Z*)-Endoxifen und (*E/Z*)-Norendoxifen, 10,5 – 12,2 min Tamoxifen, Tamoxifen-NO, DM-Tamoxifen, DDM-Tamoxifen und Tamoxifen-N-Glucuronid. Die MS-Parameter sowie die Retentionszeiten sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Für die Quantifizierung von *in vitro* Inkubationen von Lebermikrosomen und Supersomes™ wurde eine verkürzte Chromatographie mit einem Fluss von 0,6 ml/min über 13 min genutzt, dessen Elutionsgradient wie folgt war: 25 % mobile Phase B für 1,5 min, Steigerung auf 30 % mobile Phase B nach 3 min, weitere Steigerung auf 35 % mobile Phase B nach 6,5 min, Auswaschen der Säule mit 70 % mobile Phase B ab 9,0 min, Verstärkung des Auswaschens mit 80 % mobile Phase B nach 9,2 – 11,5 min, ab 11,5 min Wiederherstellung der Ausgangsbedingungen. Anschließend wurde das System für 1 min rekonditioniert. Die Messsegmente verschoben sich dadurch wie folgt: 2,25 – 4,8 min *a*-OH-Tamoxifen, 4'-OH-Tamoxifen, *a*-OH-DM-Tamoxifen und 4'-OH-DM-Tamoxifen, 4,8 – 7,6 min (*E/Z*)-4-OH-Tamoxifen, (*E/Z*)-Endoxifen und (*E/Z*)-Norendoxifen, 7,6 – 9,0 min Tamoxifen, Tamoxifen-NO, DM-Tamoxifen und DDM-Tamoxifen.

Tabelle 15 MS/MS-Parameter und Retentionszeiten der nicht-östrogenen Tamoxifenmetaboliten.

Analyt	Retentionszeit [min]	MRM	Dwell time [ms]	Fragmentorspannung [V]	Kollisionsenergie [V]	ESI Modus
Tamoxifen	11,06	372,2 -> 72,1	10	134	24	positiv
Tamoxifen-NO	11,21	388,2 -> 72,1	25	126	18	positiv
DM-Tamoxifen	10,95	358,2 -> 58,1	10	126	18	positiv
DDM-Tamoxifen	10,82	344,2 -> 44,1	10	114	14	positiv
(Z)-4-OH-Tamoxifen	9,05	388,2 -> 72,1	25	138	22	positiv
(E)-4-OH-Tamoxifen	8,46	388,2 -> 72,1	25	138	22	positiv
(Z)-Endoxifen	8,54	374,2 -> 58,1	25	126	18	positiv
(E)-Endoxifen	8,01	374,2 -> 58,1	25	126	18	positiv
(Z)-Norendoxifen	8,08	360,2 -> 44,1	50	113	18	positiv
(E)-Norendoxifen	7,50	360,2 -> 44,1	50	113	18	positiv
(Z)-4'-OH-Tamoxifen	10,13	388,2 -> 72,1	25	138	22	positiv
(Z)-4'-OH-DM-Tamoxifen	10,26	374,2 -> 58,1	25	126	18	positiv
a-OH-Tamoxifen	4,69	388,2 -> 72,1	50	140	22	positiv
3-OH-Tamoxifen	9,21	388,2 -> 72,1	25	138	22	positiv
3-OH-DM-Tamoxifen	8,87	374,2 -> 58,1	25	126	18	positiv
(E)-Tam-4-O-Gluc	4,88	564,3 -> 72,1	50	170	38	positiv
(Z)-Tam-4-O-Gluc	4,96	564,3 -> 72,1	50	170	38	positiv
(E)-DM-Tam-4-O-Gluc	4,58	550,3 -> 58,1	50	161	32	positiv
(Z)-DM-Tam-4-O-Gluc	4,72	550,3 -> 58,1	50	161	32	positiv
Tamoxifen-N-Gluc	10,77	548,3 -> 372,1	100	138	18	positiv
[² H ₃]-Tamoxifen	11,06	375,2 -> 75,1	10	146	24	positiv
[² H ₅]-DM-Tamoxifen	10,93	363,2 -> 58,1	10	126	18	positiv
[² H ₅]- (Z) -4-OH-Tamoxifen	8,90	393,2 -> 72,1	25	138	22	positiv
[² H ₅]- (E) -4-OH-Tamoxifen	8,36	393,2 -> 72,1	25	138	22	positiv
[² H ₅]- (Z) -Endoxifen	8,49	379,2 -> 58,1	25	126	18	positiv
[² H ₅]- (E) -Endoxifen	7,95	379,2 -> 58,1	25	126	18	positiv
[² H ₅]- (E) -Tam-4-O-Gluc	4,71	569,3 -> 72,1	50	170	38	positiv
[² H ₅]- (Z) -Tam-4-O-Gluc	4,91	569,3 -> 72,1	50	170	38	positiv

MRM: multiple reaction monitoring; ESI: Elektrosprayionisation

2.2.2.4 Datenanalyse

Die Datenanalyse erfolgte wie in 2.2.1.6 beschrieben.

2.2.2.5 Validierung

Die Validierung ist in Mürdter *et al.* beschrieben (Mürdter *et al.* 2011).

2.2.3 HPLC-MS/MS Analytik von spezifischen CYP Substraten

2.2.3.1 Eichpunkte und Qualitätskontrollen

Die Stammlösungen von Acetaminophen, OH-Bupropion, 4'-OH-Mephenytoin und 5-OH-Propafenon wurden zu 2 mg/ml und N-DE-Amodiaquine, OH-Tolbutamide und 2-OH-Atorvastatin zu 1 mg/ml in Methanol:Wasser (1:1, v/v) gelöst. Die internen Standards [²H₃]-OH-Bupropion, [²H₃]-4'-OH-Mephenytoin, [²H₇]-5-OH-Propafenon, [²H₅]-N-DE-Amodiaquine, [²H₉]-OH-Tolbutamide und [²H₅]-2-OH-Atorvastatin wurden mit einer finalen Konzentration von 1 mg/ml in Methanol:Wasser (1:1, v/v) gelöst. [²H₄]-Acetaminophen wurde zu 1,6 mg/ml in Wasser gelöst. Alle Stammlösungen wurden in weißen Glasfläschchen bei -20 °C gelagert. Durch Vereinigung und seriell Verdünnen wurden ALS der Eichpunkte hergestellt, dessen Konzentrationen in Tabelle 16 zusammengefasst sind. Die Eichpunkte wurden anschließend durch Zugabe von 5 µl der entsprechenden AL in 40 µl Zellmedium, welches mit 6 µl 250 mM Ameisensäure und 10 µl der internen Standard-AL versetzt war, generiert. Die Konzentrationen der Qualitätskontrollen in niedriger, mittlerer und hoher Konzentration entsprachen den Eichpunkten 3, 5 und 8. Die AL der internen Standards wurde durch Mischen und Verdünnen der Stammlösungen in Acetonitril:Wasser (1:1, v/v) erhalten. Die finalen Konzentrationen der deuterierten Substanzen in der Probe waren 0,9 µM für [²H₃]-OH-Bupropion, [²H₇]-5-OH-Propafenon, [²H₅]-N-DE-Amodiaquine, [²H₉]-OH-Tolbutamide und [²H₅]-2-OH-Atorvastatin und 1,8 µM für [²H₄]-Acetaminophen und [²H₃]-4'-OH-Mephenytoin.

Tabelle 16 Konzentration der Arbeitslösungen für die Quantifizierung von spezifischen CYP Substraten.

Substanz	AL 1	AL 2	AL 3	AL 4	AL 5	AL 6	AL 7	AL 8	AL 9
	μM								
Acetaminophen	0,01	0,02	0,04	0,1	0,4	2	10	50	100
N-DE-Amodiaquine	0,005	0,01	0,02	0,05	0,2	1	5	25	50
OH-Bupropion	0,005	0,01	0,02	0,05	0,2	1	5	25	50
4'-OH-Mephenytoin	0,01	0,02	0,04	0,1	0,4	2	10	50	100
OH-Tolbutamide	0,005	0,01	0,02	0,05	0,2	1	5	25	50
5-OH-Propafenon	0,005	0,01	0,02	0,05	0,2	1	5	25	50
2-OH-Atorvastatin	0,005	0,01	0,02	0,05	0,2	1	5	25	50

AL: Arbeitslösung

2.2.3.2 Probenaufbereitung

Die wie in 2.2.8 beschrieben generierten Proben wurden bei 20.000 g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden 40 μl des Überstandes mit 6 μl 250 mM Ameisensäure und 10 μl der internen Standard-AL versetzt. Zur Quantifizierung wurden 5 μl der Probe injiziert.

2.2.3.3 Chromatographie und MS/MS Parameter

Die chromatographische Trennung der Analyten erfolgte auf einem 1200 Rapid Resolution LC-System mit einer Uptisphere Strategy C12 Säule (Partikelgröße 5 μm , Maße 2,1x100 mm, Interchim) mit Hilfe eines Gradienten von Acetonitril (mobile Phase B) in 10 mM Ammoniumacetat (pH 3,6, mobile Phase A) bei 0,4 ml/min wie folgt: für 1 min 6 % mobile Phase B; Erhöhung auf 15 % mobile Phase B nach 3 min, weitere Erhöhung auf 55 % mobile Phase B bei 6 min; Auswaschen der Säule mit 95 % mobile Phase B nach 9 min; Wiedereinstellung der Startbedingungen bei 10,1 min. Die Analyten wurden mit einem 6460 Triple Quadrupol Massenspektrometer im MRM Modus detektiert. Die Parameter der Ionisierungsquelle (positive ESI) waren wie folgt: Gas Temperatur 325 °C, Gasfluss 10 l/min, Nebulizer Druck 45 psi, Sheath Gas Temperatur 350 °C, Sheath Gasfluss 11 l/min, Capillary 3500 V, V Charging 1000 V. Für eine bessere Auflösung wurde die Messung der Analyten und der entsprechenden internen Standards in unterschiedliche Zeitsegmente wie folgt aufgeteilt: 0,5 - 4,5 min Acetaminophen und N-DE-Amodiaquine, 4,5 – 5,4 min OH-Bupropion und 4'-OH-Mephenytoin, 5,4 – 6,5 min 5-OH-Propafenon und OH-Tolbutamide, 6,5 – 9,5 min 2-OH-Atorvastatin. Die MS-Parameter sowie die Retentionszeiten sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17 MS/MS-Parameter und Retentionszeiten der spezifischen CYP Substrate

Analyt	Retentionszeit [min]	MRM	Dwell time [ms]	Fragmentor-spannung [V]	Kollisionsenergie [V]	ESI Modus
Acetaminophen	2,38	152,1 -> 110,0	50	96	14	positiv
N-DE-Amodiaquine	3,63	328,1 -> 283,0	50	113	14	positiv
OH-Bupropion	4,94	256,0 -> 238,0	50	76	10	positiv
4'-OH-Mephenytoin	5,18	235,1 -> 150,1	50	102	14	positiv
5-OH-Propafenon	5,72	358,2 -> 116,1	25	140	20	positiv
OH-Tolbutamide	5,79	287,1 -> 89,0	50	96	42	positiv
2-OH-Atorvastatin	7,59	575,3 -> 440,1	200	156	18	positiv
[² H ₄]-Acetaminophen	2,35	156,1 -> 114,0	50	96	14	positiv
[² H ₅]-N-DE-Amodiaquine	3,62	333,1 -> 283,0	50	113	14	positiv
[² H ₃]-OH-Bupropion	4,93	259,0 -> 241,0	50	76	10	positiv
[² H ₃]-4'-OH-Mephenytoin	5,17	238,1 -> 150,1	50	102	14	positiv
[² H ₇]-5-OH-Propafenon	5,72	365,2 -> 123,1	25	140	20	positiv
[² H ₉]-OH-Tolbutamide	5,77	296,1 -> 89,0	50	96	42	positiv
[² H ₅]-2-OH-Atorvastatin	7,58	580,3 -> 445,1	200	156	18	positiv

MRM: *multiple reaction monitoring*; ESI: Elektrosprayionisation

2.2.3.4 Datenanalyse

Zur Analyse der Messdaten wurde das Programm *Agilent MassHunter Quantitative Analysis Software* B.06.00 verwendet. Zur Generierung der jeweiligen Eichgeraden wurde das Verhältnis der Signalfläche des Analyten zu der des entsprechenden internen Standards gegen die bekannte Konzentration für jeden Eichpunkt aufgetragen und eine Regressionsgerade mit einer Gewichtung von $1/x^2$ durch die erhaltenen Punkte gelegt. Anhand der berechneten Regressionsgeraden wurden die Konzentrationen der Analyten in den Proben mit Hilfe des Verhältnisses der Signalflächen von Analyt zu internem Standard ermittelt.

2.2.3.5 Validierung

Die Validierung ist in Feidt *et al.* beschrieben (Feidt *et al.* 2010).

2.2.4 *In vitro* Inkubationen zur Untersuchung von Metabolismustwegen von Tamoxifen

2.2.4.1 *Humane Lebermikrosomen*

Zur Untersuchung des Metabolismus von Tamoxifen zu östrogenen und nicht-östrogenen Metaboliten wurden humane Lebermikrosomen (HLM) von 150 Spendern vereinigt und mit 50 μM des Substrats in 100 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,4) für 10 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe eines NADPH-regenerierenden Systems zu den Proben und die sofortige Überführung in ein 37 °C Wasserbad wurde die Enzymreaktion gestartet. Zum Stoppen der Reaktion wurde das gleiche Volumen an 1 % Essig (v/v) in Acetonitril, welches die internen Standards zur Messung von östrogenen und nicht-östrogenen Tamoxifenmetaboliten (s. 2.2.1.1 und 2.2.2.1) enthielt, zu den Inkubationsansätzen gegeben und diese anschließend auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation bei 20.000 g bei 4 °C für 10 min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C bis zur weiteren Analyse, wie in 2.2.1.8 und 2.2.2 beschrieben, gelagert. Als Kontrolle wurden Schweinelebermikrosomen verwendet, die vorher für 10 min bei 95 °C inaktiviert wurden.

2.2.4.2 *Supersomes™*

Die Identifizierung der CYP-Isoenzyme, die für bestimmte Metabolismusschritte verantwortlich sind, erfolgte mit Hilfe von rekombinanten Enzymen, die aus Baculovirus-transfizierten Insektenzellen gewonnen wurden (Supersomes™, Corning® Incorporated). Dazu wurden 20 pmol Enzym wie in 2.2.4.1 beschrieben mit den entsprechenden Substraten in Gegenwart eines NADPH-regenerierenden Systems inkubiert. Als Kontrolle dienten Supersomes™ aus untransfizierten Insektenzellen.

2.2.4.3 *Hepatozyten*

Für Metabolismusstudien wurden Hepatozyten wie in 2.2.6.2.1 beschrieben kultiviert, konditioniert und anschließend mit 1 μM Substrat in entsprechendem Zellmedium für mindestens 24 Std. bis 168 Std. behandelt. Für zeitabhängige Untersuchungen wurden alle 24 Std. Proben entnommen, die wie in 2.2.1.9, und 2.2.2.2 beschrieben auf das Vorhandensein von östrogenen und nicht-östrogenen Metaboliten analysiert wurden.

2.2.5 *In vitro* Modulation der Expression und Aktivität von ADME Proteinen und Genen

Um die Wirkung von Substanzen auf die Aktivität und Expression von CYP-Enzymen und auf die Expression von ADME-assoziierten Genen zu untersuchen, wurden Zellen wie in 2.2.6.2 beschrieben kultiviert und, wenn nötig, konditioniert. Anschließend wurden die Zellen für 72 Std. mit dem zu untersuchenden Substrat in folgender Konzentration in Zellmedium behandelt: 30 μ M Rifampicin, 2 mM Phenobarbital, 5 μ M Tamoxifen und Tamoxifenmetaboliten. Das Behandlungsmedium wurde dabei täglich erneuert. Um darauffolgend die Aktivität der CYP-Enzyme mit spezifischen Substraten zu bestimmen, wurden die Zellen wie in 2.2.8 beschrieben behandelt. Für die Untersuchung von Protein- oder Genexpressionen wurden die Zellen mit einer EDTA-haltigen Trypsinlösung (0,25 %, w/v) von der Plastikoberfläche gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt, bei 1000 g für 10 min bei 4 °C pelletiert, mit Dulbecco's phosphategepufferter Salzlösung (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*, DPBS) gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Extraktion von Proteinen bzw RNA erfolgte wie in 2.2.9.1 bzw. 2.2.10.1 beschrieben.

2.2.6 Zellkultur

2.2.6.1 *Kryokonservierung und Auftauen von Zellen*

Für die Kryokonservierung von adhärenenten Zellen wurden diese durch die Zugabe einer EDTA-haltigen Trypsinlösung (0,25 %, w/v) von der Plastikoberfläche gelöst und die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Neubauer Hämocytometers unter Verwendung des Vitalfarbstoffes Trypanblau bestimmt (Doyle et al. 1993). Anschließend wurden die Zellen bei 500 g für 10 min pelletiert, in spezifischen Kryokonservierungsmedien (s. 2.1.7.2) resuspendiert und je 1 ml der Suspension mit $1-2 \times 10^6$ Zellen in Kryoröhrchen überführt. Die Konservierung erfolgte über Nacht bei -80 °C bei etwa -1 °C/min in einem vorgekühlten, mit Isopropanol-gefüllten Gefrierbehälter. Für die dauerhafte Lagerung wurden die heruntergekühlten Zellsuspensionen in flüssigen Stickstoff überführt.

Die kryokonservierten Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in 10 ml des entsprechenden Zellmediums (s. 2.1.7.2) gegeben und bei 500 g für 10 min pelletiert. Das Zellpellet wurde dann in entsprechendem Zellmedium suspendiert, in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt und in einem luftfeuchtigkeitsgesättigten Brutschrank bei 37 °C kultiviert.

2.2.6.2 Kultivierung von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in entsprechendem Medium (Tabelle 7) bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem luftfeuchtigkeitsgesättigten Brutschrank kultiviert.

2.2.6.2.1 Hepatozyten

2.2.6.2.1.1 HC-AFW1

Die Hepatozyten HC-AFW1 wurden wie oben beschrieben kultiviert (Tabelle 7), wobei das Zellmedium einmal wöchentlich gewechselt wurde. Zur Subkultivierung wurden nach Ablösen der Zellen mit Accutase® zweimal wöchentlich $4,5 \times 10^6$ Zellen in eine neue 75 cm² Kulturflasche überführt. Für Experimente wurden $4,5 \times 10^4$ Zellen/cm² in well-Platten überführt und wie beschrieben behandelt.

2.2.6.2.1.2 HepaRG™

HepaRG™ Zellen wurden in Wachstumsmedium (Tabelle 7) wie oben beschrieben kultiviert. Das Zellmedium wurde alle 48-72 Std. erneuert. Zur Subkultivierung wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10^4 Zellen/cm² in Kulturflaschen überführt und 2 Wochen bis zur Konfluenz kultiviert. Für Experimente wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen/cm² (Konfluenz) in well-Platten überführt und über 2 Wochen in Differenzierungsmedium (Tabelle 7) differenziert. Das Nährmedium der Zellen wurde alle 2-3 Tage erneuert.

2.2.6.2.1.3 Upcyte® Hepatozyten 653-03 und 653-03 #138 2D6

Für die Kultivierung von upcyte® Hepatozyten wurden Kulturflaschen und well-Platten vorher mit Kollagen Typ I aus Rattenschwänzen beschichtet. Dazu wurden 50 µg/ml Kollagen Typ I in 0,02 M Essigsäure in die zu beschichtende Plastikware überführt, so dass der Boden der Plastikoberfläche bedeckt war, 30 min bei 37 °C in einem luftfeuchtigkeitsgesättigten Brutschrank inkubiert, mit DPBS gewaschen und für 1 Std. bei RT unter sterilen Bedingungen getrocknet.

Upcyte® Hepatozyten des Donors 653-03 und den über lentivirale Transduktion erhaltenen Subklon 653-03 #138 2D6 wurden in *Hepatocyte growth medium* (HGM) in einer Dichte von $0,8 \times 10^4$ Zellen/cm² kultiviert. Für Experimente wurden die Zellen in *Preculture medium* (PCM) für 5 Tage konditioniert und anschließend in einer Dichte von $1,6 \times 10^5$ Zellen/cm² (Konfluenz) in *High performance medium* (HPM) für 3-5 Tage subkultiviert (Tabelle 7). Das Medium wurde alle 48-72 Std. erneuert.

2.2.6.2.2 MCF7

Die Brustkrebszelllinie MCF7 wurde wie oben beschrieben kultiviert (Tabelle 7). Für die Subkultivierung wurden $2-4 \times 10^5$ Zellen in eine 75 cm^2 Kulturflasche überführt. Für Experimente wurden 4×10^4 Zellen/ cm^2 in well-Platten überführt und wie beschrieben behandelt.

2.2.6.2.3 MCF7-5xERE circ #1

Die Zelllinie MCF7-5xERE circ #1 ist ein Subklon der Brustkrebszelllinie MCF7, welche mit einem Reportergenplasmid stabil transfiziert wurde: ein Östrogen-Rezeptor bindendes Element (*estrogen response element*, ERE) in fünffacher Wiederholung wurde einem minimalen Promoter (minP) des Reportergenplasmids pGL4.27 (Promega GmbH) vorgeschaltet, welche zusammen die Expression des Gens der *firefly* Luciferase (luc2P) steuern. Das pGL4.27_5xERE-minP/luc2P wurde durch die Linearisierung des pGL4.27 Reporterplasmids mit den Endonukleasen XhoI und HindIII und anschließender Ligation in Anwesenheit eines mittels Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifizierten DNA-Fragments, welches die ERE-sequenz (5'-AGGTCAGTGTGACCT-3') in fünf Tandem-Wiederholungen enthielt, konstruiert. Die Transfektion der MCF7-Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Effectene™ der Firma Qiagen N.V. nach Herstellerangaben. Die Selektion positiver Klone erfolgte mit $600 \mu\text{g/ml}$ Hygromycin. Mit Hilfe dieses stabil transfizierten Reportergens kann die östrogene Wirkung verschiedener Substanzen, wie in 2.2.7 beschrieben, untersucht werden. Die Zellen wurden wie in 2.2.6.2.2 beschrieben (sub-)kultiviert. Die Herstellung und stabile Transfektion des Plasmids erfolgte durch Dr. Werner Schroth.

2.2.7 *In vitro* Assay zur Bestimmung der östrogenen Wirkung von Substanzen

2.2.7.1 *Vorbereitung der Zellen*

Vor der Verwendung der MCF7-5xERE circ #1 Zellen für *in vitro* Assays zur Bestimmung der östrogenen Wirkung von Substanzen wurden diese hormonepriviert. Dazu wurde eine mit den Zellen konfluent bewachsene 75 cm^2 Zellkulturflasche in einer 1:6 Verdünnung in hormonepriviertem Medium über 4 Tage subkultiviert. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von 4×10^4 Zellen/ cm^2 in 96-well-Platten überführt und wie in 2.2.7.2 beschrieben mit den zu testenden Substanzen inkubiert.

2.2.7.2 Zellbehandlung

Für die Ermittlung des östrogenen Potentials der Reinsubstanzen Östradiol, Bisphenol, (Z)- und (E)-Metabolit E wurden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt, die durch serielles Verdünnen der jeweiligen Stammlösungen (10 mM in DMSO) in hormonepriviertem Medium erhalten wurden. Die finalen Konzentrationen der Substanzen in Medium waren wie folgt: Östradiol 30 fM – 2500 pM, Bisphenol 4,5 pM – 125 nM, (Z)-Metabolit E 4 pM – 40 nM, (E)-Metabolit E 0,4 pM – 6,5 nM.

Für die Analyse des Antagonisierungspotentials gegenüber Endoxifen wurden die hormoneprivierten Zellen mit 25 pM Östradiol (durchschnittliche Plasmakonzentration postmenopausaler Frauen) behandelt und die östrogene Wirkung des Östradiols in dessen Anwesenheit durch steigende Konzentrationen von Endoxifen (2,2 pM – 175 nM) antagonisiert. Bei vollständiger Inhibition wurden die Zellen in Anwesenheit von 25 pM Östradiol und 35 nM Endoxifen mit Bisphenol, (Z)- und (E)-Metabolit E in folgenden Konzentrationen behandelt: Bisphenol 0,128 nM – 10 µM, (Z)-Metabolit E 0,64 nM – 50 µM, (E)-Metabolit E 0,128 nM – 10 µM.

Des Weiteren wurde der Einfluss einer Mischung von Bisphenol, (Z)- und (E)-Metabolit E in der prä- und postmenopausalen Situation in Anwesenheit von Endoxifenkonzentrationen entsprechend dem Median eines PM- und EM-Phänotyps (EM: 36,3 nM; PM: 9,8 nM) untersucht. Für die Simulation des prä- bzw postmenopausalen Zustands wurden 1000 pM bzw. 25 pM Östradiol in allen Ansätzen eingesetzt. Die östrogenen Metaboliten Bisphenol, (Z)- und (E)-Metabolit E wurden als Mischung in folgenden Konzentrationen verwendet: 342 pM Bisphenol, 1551 pM (Z)-Metabolit E, 453 pM (E)-Metabolit E. Die Konzentrationen der östrogenen Metaboliten entsprechen dem 90 %Perzentil der *in vivo* Plasmakonzentration prämenopausaler Frauen (s. 2.2.12.1).

Die Zellen wurden mit den zu testenden Substanzen in hormonepriviertem Medium für 20-24 Std. behandelt.

2.2.7.3 Zellyse und Luciferasemessung

Nach der Behandlung wurden die Zellen mit 100 µl DPBS gewaschen und mit 25 µl *Passive Lysis Buffer* 5x (PLB, Promega) pro Ansatz in einfacher Verdünnung in Wasser für 20 min bei RT unter Schütteln lysiert. Anschließend wurden 2 µl des Überstandes in Lumineszenz-kompatiblen, weißen 96-well-Platten (Optiplate, PerkinElmer Inc.) mit 23 µl einfach konzentriertem PLB verdünnt. Zur Quantifizierung der Luciferaseaktivität wurden mit Hilfe des *multimode plate readers* EnSpire® (PerkinElmer Incorporated) 25 µl D-Luciferin Substratlösung (*beetlejuice*, pjk GmbH) pro Probe injiziert und die resultierende Lumineszenz nach 2 sek Inkubation über einen Zeitraum von 5 sek gemessen.

2.2.8 Behandlung von Zellen mit spezifischen CYP Substraten

Die Stammlösung der CYP-spezifischen Substrate wurde in 5, 10, 50 oder 100 mM in dem jeweiligen Lösungsmittel, wie in Tabelle 18 zusammengefasst, angesetzt und bei -20 °C in weißen Glasfläschchen gelagert. Für die Quantifizierung von CYP-Aktivitäten in Zellen wurden die Substrate wie in Tabelle 18 beschrieben in entsprechendem Zellmedium vereint und verdünnt. Anschließend wurde 1 ml der Substratlösung in Zellmedium auf die Zellen gegeben und für 3 Std. bei 37 °C in einem luftfeuchtigkeitsgesättigten Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bis zu weiteren Analysen (s. 2.2.3) bei -20 °C gelagert.

Tabelle 18 Konzentrationen und Lösungsmittel der Stammlösungen CYP-spezifischer Substrate, CYP-Spezifität, und finale Konzentrationen im Experiment.

Substrat	Spezifität	Stammlösung	Lösungsmittel	Finale Konzentration
		[mM]		[μ M]
Phenacetin	CYP1A2	100	DMSO	50
Amodiaquin	CYP2C8	10	H ₂ O	5
Bupropion	CYP2B6	50	H ₂ O	25
Mephenytoin	CYP2C19	100	ACN	100
Propafenon	CYP2D6	10	MeOH	5
Tolbutamid	CYP2C9	100	ACN	100
Atorvastatin	CYP3A4	5	ACN:H ₂ O (50:50, v/v)	35

DMSO: Dimethylsulfoxid; ACN: Acetonitril; MeOH: Methanol

2.2.9 Proteinanalyse

2.2.9.1 Zellyse für anschließende Proteinanalyse

Die Zellen eines Ansatzes einer 24-well-Platte wurden mit Hilfe einer EDTA-haltigen Trypsinlösung (0,25 %, w/v) von der Plastikoberfläche gelöst, bei 1000 g für 10 min pelletiert, und einmal mit DPBS gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in 100-150 μ l Lysepuffer für 15 min auf Eis unter periodischem Durchmischen lysiert.

2.2.9.2 Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Bicinchoninsäure-Lösung und einer Kupfer(II)-Sulfat-Pentahydrat-Lösung (BCA Assay, Sigma-Aldrich Corporation) in einem finalen Volumen von 200 µl nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Eichgerade diente eine 1 mg/ml Rinderalbuminlösung (*bovine serum albumin*, BSA), von der zwischen 0,5 µl und 10 µl in die BCA-Lösung gegeben wurde.

2.2.9.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Proben wurden mit SDS-Puffer versetzt und die Proteine für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden 30 µl des Überstandes der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zugeführt. Das verwendete SDS-Polyacrylamidgel enthielt zur Fokussierung des Proteingemisches 4,7 % Polyacrylamid (v/v) in 0,1 M Tris (pH 6,8) und 0,1 % SDS (w/v) und zur Größenauftrennung von Proteinen 10 % Polyacrylamid (v/v) in 0,375 M Tris (pH 8,8) und 0,1 % SDS (w/v). Die Polymerisation wurde jeweils mit 0,1 % Ammoniumperoxodisulfat (w/v) und 0,01 % N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin initiiert. Als Größenstandard wurden 4 µl eines biotinylierten Proteinstandards (Cell Signaling Technology, Incorporated) verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte für 8 V/cm Gel in Elektrophoresepuffer.

2.2.9.4 Immunoblotting

Die aufgetrennten Proteine wurden im *semidry electroblotting* Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran in Transferpuffer bei mindestens 80 mA und maximal 20 V für 15 min in einer Fastblot-Kammer übertragen. Anschließend wurden freie Bindungsstellen auf der Membran mit Blockpuffer für 1 Std. gesättigt. Zur Immundetektion spezifischer Proteine wurde die Membran über Nacht mit dem primären Antikörper in Blockpuffer inkubiert, wiederholt in TBST gewaschen, mit Hilfe eines mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelten sekundären Antikörpers inkubiert und mit einer Luminol-Substratlösung (SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Fisher Scientific Incorporated) behandelt. Die Detektion des Chemilumineszenzsignals erfolgte mit einer CCD-Kamera.

2.2.10 Quantifizierung von mRNA-Expression

2.2.10.1 RNA-Extraktion

RNA aus Zellpellets wurde mit Hilfe des Direct-zol™ RNA MiniPrep Kits der Firma Zymo Research Corporation nach Herstellerangaben isoliert. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte spektrometrisch mit einem NanoDrop ND-2000.

2.2.10.2 Reverse Transkriptase

Die reverse Transkription der isolierten mRNA erfolgte mittels einer reversen Transkriptase des Moloney murinen Leukämievirus (M-MLV RT, Promega GmbH). Dazu wurden 0,4 – 1 µg mRNA mit 250 ng *random hexamer primern* (Promega GmbH) in einem Volumen von 15 µl für 5 min bei 70 °C denaturiert, für 1 min auf Eis und zur Hybridisierung der Oligonukleotide für 2 min auf RT inkubiert. Zu der mit Oligonukleotiden hybridisierten mRNA wurden 5 µl M-MLV RT 5x Puffer, 1,25 µl dNTPs (10 mM), 10 U RNase Inhibitor RNasin (Promega GmbH) und 200 U M-MLV RT in einem Gesamtvolumen von 10 µl gegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 70 °C inaktiviert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

2.2.10.3 BioMark™ HD quantitative PCR

Für die Quantifizierung spezifischer mRNA mittels Taqman-*Gene Expression Assays* wurde die Fluidigm's BioMark™ HD quantitative PCR Plattform verwendet. Die Amplifikation spezifischer mRNA Abschnitte (*specific target amplification, STA*) erfolgte nach Herstellerangaben mit 50 nM jedes Oligonukleotid Paares für initial 10 min bei 95 °C und anschließenden 14 Zyklen von 95 °C für 10 sek und 60 °C für 4 min. Die STA-Proben wurden in einer maximalen Verdünnung von 1:5 eingesetzt. Die daran anschließende qRT-PCR wurde nach Vorlegen von *Sample-Premix* und *Assay-Mix* (Taqman Gene Expression Mastermix, spezifische Taqmansonde; Applied Biosystems) und Überführung in 48.48 bzw. 96.96 *Dynamic Array Integrated Fluidic Circuits* (IFC) Chips nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Taqman-*Gene Expression Assays* wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Zanger durch Herrn Igor Liebermann erstellt. Die nachfolgende Datenauswertung wurde selbständig wie in 2.2.14.2 beschrieben durchgeführt.

2.2.11 Transkriptomanalyse

Für die Transkriptomanalyse östrogen und anti-östrogen wirkender Substanzen wurden MCF-7-Zellen wie in 2.2.7.1 beschrieben hormonepriviert, in 96-well-Platten überführt und anschließend für 48 Std. mit den Testsubstanzen behandelt. Die Konzentrationen der Testsubstanzen wurden dabei so gewählt, dass maximale Effekte auf die Östrogen-abhängige Genexpression erreicht werden konnten: 25 pM Östradiol, 36 nM Endoxifen (in Gegenwart von 25 pM Östradiol), 10 nM (*Z*)-Metabolit E, 1 nM (*E*)-Metabolit E, 2,5 nM Bisphenol, 0,01 % DMSO (Kontrolle). Die Stammlösungen aller Substanzen wurden in DMSO angefertigt und die maximale Lösungsmittelkonzentration im Zellmedium war 0,01 %. Nachfolgend wurde die mRNA aus Zellpellets wie in 2.2.10.1 beschrieben bestimmt. Des Weiteren wurden 150 ng RNA mit Hilfe des GeneChip WT PLUS Reagent kit (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific Inc.) vervielfältigt und in biotinylierte, fragmentierte Einzelstrang-cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde über Nacht auf ein humanes Transkriptom-Array (HTA 2.0, Affymetrix) hybridisiert. Anschließend wurde das Array nach Herstellerangaben gewaschen und gefärbt. Die Fluoreszenzsignale wurden mit einem Affymetrix FS450 DX System nach Herstellerangaben quantifiziert. Die RNA-Amplifikation, die Synthese der cDNA sowie die Erstellung des Arrays und die Quantifizierung der Signale wurden in der eigenen Arbeitsgruppe von Frau Jana Ihring durchgeführt.

2.2.12 Klinische Studien

2.2.12.1 Prämenopausale Frauen

Prämenopausale Brustkrebspatientinnen unter 40 Jahren wurden von 2000 bis 2008 in einer multizentrischen, prospektiven Kohortenstudie im Vereinigten Königreich (Southampton *University Hospital, United Kingdom*) rekrutiert, um den Einfluss erblicher und sporadischer Faktoren auf den Therapieerfolg und die Prognose der Patientinnen zu untersuchen (*Prospective study of Outcomes in Sporadic and Hereditary breast cancer, POSH*) (Eccles et al. 2007; Copson et al. 2013). Dazu wurden umfangreiche Informationen über die Patientinnen und die klinischen Charakteristika der Erkrankung, wie Tumorhistologie und –Pathologie, Rezeptorstatus und Therapie, erfasst. Initial bei Studieneintritt wurde Vollblut zur DNA-Gewinnung sowie eine Serumprobe nach Erreichen konstanter Plasmakonzentrationen (*steady state*) innerhalb des ersten Jahres nach Therapiebeginn entnommen. Die Nacherfassung klinischer Daten (*follow-up*) erfolgte jährlich über 10 Jahre. Frauen mit Hormonrezeptor-positivem Brustkrebs wurden mit 20 mg Tamoxifen täglich über einen Zeitraum von 5 Jahren behandelt. Der Studie wurde die Genehmigung durch das *South West Multi-center Research*

Ethics Committee (MREC 00/6/69) erteilt. Alle Patientinnen wurden über die Studie informiert und willigten schriftlich in die Teilnahme ein. Im Rahmen einer wissenschaftlichen Kollaboration mit dem klinischen Studienzentrum (Prof. Diana Eccles, *Southampton University Hospital, United Kingdom*) wurden in dieser Arbeit die Plasmakonzentrationen östrogenen Tamoxifenmetaboliten der Patientinnen quantifiziert (2.2.1) und mit anonymisierten klinischen Daten korreliert. Die Daten der Patientinnen, die aufgrund von Tamoxifen-Plasmakonzentrationen Therapietreue bewiesen und quantifizierbare Plasmaspiegel der östrogenen Metaboliten zeigten, wurden für die Analysen verwendet. Die klinischen Daten der analysierten Patientinnen zu Studienbeginn sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19 Charakterisierung der klinischen Daten der Patientinnen der POSH Studie.

Allgemeine Information POSH (n=306)			N	Anteil [%]
BMI	Median	24,2		
	Spanne	17,0-45,0		
Alter bei Diagnose [Jahre]	Median	37,5		
	Spanne	21,5-41,0		
Langzeitbeobachtung [Jahre]	Median	6,4		
	Spanne	1,2-11,7		
Ethnie	kaukasisch		283	92,5
	asiatisch		5	1,6
	afrikanisch		13	4,2
	unbekannt		5	1,6
Tumorgröße [cm]	≤ 2		155	50,7
	2-5		126	41,2
	> 5		17	5,6
	unbekannt		8	2,6
Differenzierungsgrad	G1		31	10,1
	G2		159	52,0
	G3		113	36,9
	unbekannt		3	1,0
Nodalstatus	Negativ		142	46,4
	Positiv		163	53,3
	Fehlend		1	0,3

Hormonrezeptorstatus	ER negativ	9	2,9
	ER positiv	295	96,4
	unbekannt	2	0,7
	PR negativ	32	10,5
	PR positiv	164	53,6
	unbekannt	110	35,9
HER2-Status	positiv	61	19,9
	negativ	142	46,4
	unbekannt	103	33,7
Chemotherapie	ja	230	75,2
	nein	76	24,8
Bestrahlung	ja	254	83,0
	nein	52	17,0

ER: Östrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor; HER2: human epidermal growth factor receptor 2 (humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2)

2.2.12.2 Postmenopausale Frauen

Postmenopausale Brustkrebspatientinnen mit Hormonrezeptor-positivem Mammakarzinom wurden in einer offenen, prospektiven, multi-zentrischen Kohortenstudie (IKP211, DRKS00000605) rekrutiert, um die Prädiktion anti-östrogener Bindungsstellen (*anti estrogen binding site*, AEBS), aktive Tamoxifenmetaboliten und den *transforming growth factor* β (TGF β) als potentielle Biomarker für einen Therapieerfolg bei Behandlung mit Tamoxifen zu beurteilen. Dazu wurden insgesamt 1286 postmenopausale Brustkrebspatientinnen in den Jahren 2005 bis 2010 eingeschlossen und über 5 Jahre mit Tamoxifen oder Aromataseinhibitoren (Letrozol, Anastrozol, oder Exemestan) behandelt. Für die Analyse von Biomarkern wurden Heparinplasma Proben vor Therapiebeginn und nach 6, 12 und 60 Monaten unter Therapie genommen. Die Nacherfassung klinischer Daten wird im Rahmen einer erweiterten Beobachtungsperiode ab 2016/17 für weitere 10 Jahre erhoben, so dass die Daten zum klinischen Outcome in dieser Studienpopulation nicht für Überlebens-Analysen verwendet wurden. Initial bei Studieneinschluss wurde EDTA-Vollblut der Patientinnen zur DNA-Gewinnung und Genotypisierung entnommen. Des Weiteren wurden umfassende klinische Daten erhoben. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen für diese Studie lag vor. Alle Patientinnen wurden über die Studie informiert und willigten schriftlich in die Teilnahme ein. Im Rahmen dieser

Arbeit wurden die Plasmakonzentrationen steroidaler Sexualhormone sowie östrogener Tamoxifenmetaboliten der mit Tamoxifen behandelten Patientinnen quantifiziert und mit klinischen sowie genotypischen Daten korreliert. Die pseudonymisierten klinischen Daten der eingeschlossenen Patientinnen sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20 Zusammenfassung der klinischen Daten der Tamoxifen behandelten Patientinnen der IKP211-Studie.

Allgemeine Information IKP211 (n=377)		N	Anteil [%]
Gewicht [kg]	Median	70	
	Spanne	45-144	
Alter bei Diagnose [Jahre]	Median	64,4	
	Spanne	42,9-83,5	
Langzeitbeobachtung		andauernd	
Menopausaler Status	bestätigt	356	94,4
	unsicher	19	5,0
	unbekannt	2	0,5
Tumorgroße [cm]	≤ 2	273	72,4
	2-5	93	24,7
	> 5	11	2,9
	unbekannt	0	
Differenzierungsgrad	G1	99	26,3
	G2	252	66,8
	G3	25	6,6
	unbekannt	1	0,3
Nodalstatus	Negativ	315	83,6
	Positiv	60	15,9
	Fehlend	2	0,5
Hormonrezeptorstatus	ER positiv	375	99,5
	ER negativ	2	0,5
	unbekannt	0	
	PR positiv	321	85,1
	PR negativ	56	14,9
	unbekannt	0	

HER2-Status	positiv	64	17,0
	negativ	311	82,5
	unbekannt	0	
Chemotherapie	ja	79	21,0
	nein	290	76,9
	geplant	3	0,8
Bestrahlung	ja	42	11,1
	nein	59	15,6
	geplant	274	72,7

ER: Östrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor; HER2: human epidermal growth factor receptor 2 (humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2)

2.2.13 Genotypisierung aus Vollblut

Die Genotypisierung der CYP-Varianten *CYP2B6**6 (516 G>T), *CYP2C9**2 und *3, *CYP2C19**2 und *17 wurde mittels Sequenom MALDI-TOF Genotypisierungsassays durchgeführt (Saladores et al. 2015; Schroth et al. 2017). Die Genotypisierung der *CYP2D6* Varianten *3, *4, *6, *7, *8, *9, *10 und *41 sowie *CYP3A4**22 erfolgte wahlweise mit validierten Sequenom MALDI-TOF Assays (Schroth et al. 2010) oder mittels Taqman *allelic discrimination assays* (Applied Biosystems) in der IKP211-Kohorte (Mürdter et al. 2011). Die Genotypisierungen wurden durch Herrn Dr. Werner Schroth sowie Frau Dr. Elke Schäffeler und Frau Andrea Jarmuth durchgeführt.

2.2.14 Statistische Auswertung

2.2.14.1 Enzymaktivitäten

Die gemessenen Enzymaktivitäten (s. 2.2.8 und 2.2.7) wurden auf die jeweilige interne Kontrolle bezogen, um den Änderungsfaktor der Werte relativ zu der gewählten Kontrolle zu ermitteln. Mit den so berechneten Änderungsfaktoren wurde ein ungepaarter t-Test mit Welch's Korrektur für ungleiche Varianzen (Welch 1938; Ruxton 2006) durchgeführt, um die statistische Signifikanz der Abweichung von der Kontrolle zu überprüfen. Der Grenzwert für biologische Relevanz wurde dabei ab einer Änderung von 1,5-fach relativ zur Kontrolle gesetzt, so dass eine statistische Auswertung erst ab einem

Änderungsfaktor $\leq 1,5$ durchgeführt wurde. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant definiert. Die resultierenden p-Werte wurden mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur adjustiert (Abdi 2007).

2.2.14.2 Genexpression

Genexpressionsdaten wurden mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode ausgewertet (Pfaffl 2004). Dazu wurde der *cycle threshold* (Ct)-Wert des Referenzgens von dem des Zielgens subtrahiert (ΔCt) und die Differenz mit Hilfe des Logarithmus der Basis zwei potenziert ($2^{-\Delta Ct}$). Die Daten wurden darauffolgend auf die interne Kontrolle bezogen ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), um den Änderungsfaktor der Expression des normalisierten Zielgens in Relation zu der Kontrollbehandlung zu bestimmen. Um die statistische Signifikanz zu bestimmen, wurde jeweils ein einseitiger t-Test mit ungleichen Varianzen durchgeführt, wenn die Änderung der Expressionsdaten 1,5-fach erhöht bzw. erniedrigt war. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant definiert. Die resultierenden p-Werte wurden mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur adjustiert (Abdi 2007).

2.2.14.3 Bioinformatische Transkriptomanalyse

Für die Qualitätskontrolle der HTAs 2.0 wurde das *Transcriptome Analysis Console* (TAC) Programm (*Expression Console* 1.4.1.46, Affymetrix) genutzt. Präprozessierung, Visualisierung und die statistische Analyse der Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms R-3.4.1 und den Zusatzinhalten *gplots_3.0.1*, *GSVA*, *limma_3.32.6*, *lumi_2.28.0*, *marray_1.54.0*, *oligo_1.40.2* und *pd.hta.2.0_3.12.2* im Haus ausgeführt. Die Funktion *removeBatchEffect* des R-Zusatzprogramms *limma* wurde genutzt um die Analysen für Chargen-abhängige Effekte der Arrays zu korrigieren. Die hierarchische Clusteranalyse basierte auf den Methoden der *Ward's minimum variance* und der euklidischen Distanz. Genanreicherungen in einzelnen Proben (*single sample gene set enrichment*, ssGSEA) wurden anhand der folgenden Gensets der *Molecular Signatures* Datenbank (MSigDB, <http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb>) untersucht: *Estrogen Response_EARLY and LATE* des Hallmark Gensets, KEGG Signal- und Metabolismwege und Gen-Ontologien biologischer Prozesse. Statistische Genanreicherung wurde als die maximale Distanz der Zufallsbewegung (*random walk*) von Null berechnet. Für die Visualisierung wurden Heatmaps genutzt, welche die normalisierten Anreicherungswerte relativ zur mittleren Genexpression der Probe darstellen. Die bioinformatische Transkriptomanalyse wurde in Kooperation mit Herrn Dr. Stefan Winter als Bioinformatiker durchgeführt.

2.2.14.4 Korrelation der Plasmakonzentrationen von Metaboliten zu Polymorphismen von CYP-Enzymen

Die Auswirkungen von genetischen Polymorphismen der CYP-Enzyme auf den Stoffwechsel von Tamoxifen bezüglich der Plasmakonzentrationen der östrogenen Metaboliten Bisphenol und Metabolit E in den Patientenkohorten wurden mit Hilfe der nichtparametrischen Testmethoden Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten und dem Kruskal-Wallis-Test untersucht (Spearman 1904; Kruskal und Wallis 1952), da vorherige Analysen auf Normalverteilung anhand von QQ-Plots eine Nicht-Normalverteilung der Daten zeigten. Die nichtparametrischen Tests wurden auf die Plasmakonzentrationen von Bisphenol und beider Isomere des Metaboliten E sowie auf das metabolische Verhältnis zu den jeweiligen metabolischen Vorläufern (*metabolic ratio*, MR) angewandt. Dabei wurden die Polymorphismen der CYP-Enzyme berücksichtigt, die bei *in vitro* Experimenten die höchste Umsatzrate zu Bisphenol und Metabolit E aus metabolischen Vorläufern aufwiesen. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant definiert. Anschließend wurden die resultierenden p-Werte mit Hilfe der Benjamini-Hochberg-Korrektur auf multiples Testen adjustiert (Benjamini und Hochberg 1995).

2.2.14.5 Einfluss der Tamoxifentherapie auf die Plasmakonzentrationen von Sexualhormonen in postmenopausalen Frauen

Der Einfluss von Tamoxifen auf die Plasmakonzentrationen von Sexualhormonen bei postmenopausalen Frauen der IKP211-Studie wurde anhand der gemessenen Konzentrationen von Östradiol, Östron, Testosteron, Androstendion und Progesteron sowie der MRs Östradiol/Östron, Östradiol/Testosteron, Östron/Androstendion und Testosteron/Androstendion vor und nach 6 Monaten nach Therapiebeginn analysiert. Da die Studie der QQ-Plots der Plasmakonzentrationen der Sexualhormone sowie deren MRs auf nicht-normalverteilte Daten schließen ließ, wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt (Wilcoxon 1945). Dabei wurden folgende Einschlusskriterien für die Auswahl der Patientinnen aus der IKP211-Studie für die Analyse definiert: Tamoxifen-Therapie, postmenopausale Östradiolkonzentrationen (≤ 110 pM) vor und während der Therapie, keine messbaren Plasmakonzentrationen von Tamoxifen, Bisphenol, oder Metabolit E vor Therapiebeginn, messbare Plasmakonzentrationen von Tamoxifen, Bisphenol, und Metabolit E in der Plasmaprobe während der Therapie. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant definiert. Die resultierenden p-Werte wurden mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur adjustiert (Abdi 2007).

2.2.14.6 Einfluss der östrogenen Tamoxifenmetaboliten auf klinische Endpunkte in prämenopausalen Frauen

Um den Einfluss von Bisphenol und Metabolit E auf den Therapieverlauf von Tamoxifen zu untersuchen, wurden die Plasmakonzentrationen von Bisphenol und (Z)- und (E)-Metabolit E sowie die MRs zu den jeweiligen metabolischen Vorläufern univariat mit Hilfe des Kaplan-Meier-Schätzers und multivariat mittels der Cox-Regression auf die klinischen Endpunkte der rezidivfreien Zeit (*time to relapse*) und dem rezidivfreien Überleben (RFÜ) analysiert. Dazu wurden die jeweiligen Plasmakonzentrationen bzw. MRs in Quartile (Q) wie folgt eingeteilt: $Q1 \leq 25\%$, $Q2-3 \ 25 - 75\%$, $Q4 \geq 75\%$ und anschließend auf Assoziation mit den klinischen Endpunkten getestet. Für die multivariate Cox-Regression wurde zusätzlich der Effekt verschiedener Einflussgrößen, die signifikante Unterschiede in univariaten Test zeigten, als Kovariablen mit einbezogen.

3. Ergebnisse

3.1 Validierung der HPLC-MS/MS-Analytik von östrogenen Tamoxifenmetaboliten und Sexualhormonen

Die HPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung der östrogenen Tamoxifenmetaboliten Bisphenol und Metabolit E sowie der Sexualhormone Östradiol, Östron, Testosteron, Androstendion und Progesteron wurde den Richtlinien der FDA folgend (2.2.1.7) validiert.

3.1.1 Linearität und Sensitivität

Für die Validierung der HPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von östrogenen Tamoxifenmetaboliten und Sexualhormonen wurden die verwendeten Eichpunkte und Qualitätskontrollen in CHP angefertigt (2.2.2.1). Die in Tabelle 21 dargestellten Kalibrationsbereiche bestanden aus je 9 Eichpunkten, wobei der LLOQ sowie die Konzentrationsbereiche der Sexualhormone auf die Plasmaspiegel von postmenopausalen Frauen optimiert waren. Die Eichgeraden (n=6) waren im Messbereich linear mit Korrelationskoeffizienten (r^2) zwischen 0,9977 und 0,9994. Die Quantifizierungsgrenze der Analyten wurde jeweils als sechsfache Analyse bestimmt und lag mit einer mittleren Abweichung vom Sollwert zwischen -8,53 % und 13,96 % und einer Standardabweichung von 2,79 % bis 19,64 % innerhalb der Richtwerte der FDA (maximale Abweichung 20 %).

Tabelle 21 Kalibrationsbereich, Sensitivität als Genauigkeit des LLOQ (n=6) und Linearität (n=6).

Substanz	Kalibrationsbereich [pM]	Genauigkeit des LLOQ		Korrelationskoeffizient r^2	
		MW [%]	SD [%]	MW	SD
Bisphenol	12 - 1728	13,96	10,10	0,9992	0,000533
(Z)-Metabolit E	25 - 3600	9,04	7,68	0,9992	0,000473
(E)-Metabolit E	8 - 1152	12,67	6,10	0,9993	0,000527
Östradiol	4 - 576	-0,62	18,14	0,9993	0,000198
Östron	4 - 576	-1,50	2,79	0,9992	0,000356
Testosteron	50 - 7200	-3,39	10,40	0,9990	0,000795
Androstendion	50 - 7200	-8,53	19,64	0,9977	0,000908
Progesteron	25 - 3600	-6,76	16,29	0,9994	0,000410

LLOQ: *Lower Limit of Quantification* (untere Bestimmungsgrenze); MW: mittlere Abweichung vom Sollwert; SD: *standard deviation* (Standardabweichung); Der LLOQ entspricht der Konzentration des niedrigsten Eichpunktes. Übernommen aus Johanning et al. 2015

3.1.2 Genauigkeit, Variabilität und Präzision

Die Genauigkeit und Präzision der HPLC-MS/MS-Methode wurde anhand der Variabilität von sechs gemessenen Qualitätskontrollen in niedriger, mittlerer und hoher Konzentration innerhalb einer Probenserie (*intra-day*) und zwischen drei Probenserien (*inter-day*) untersucht und sind in Tabelle 22 zusammengefasst. Die *intra-day* Variabilität wies für alle Analyten in den jeweilig untersuchten Konzentrationen eine mittlere Abweichung vom Sollwert von -8,2 % bis 6,6 % mit einer Standardabweichung von 1,7 % bis 6,9 % auf. Die Qualitätskontrollen mit mittlerer Konzentration zeigten für Testosteron eine Standardabweichung von 15,4 %. Die Variabilität zwischen den Probenserien zeigte eine mittlere Abweichung vom Sollwert von -6,1 % bis 4,8 % mit einer Standardabweichung von 2,2 % bis 13,6 % für alle Analyten in allen untersuchten Konzentrationen. Somit erfüllten Genauigkeit, Variabilität und Präzision die Anforderungen der FDA (maximale Abweichung 15 %).

Tabelle 22 Genauigkeit und Präzision gegeben als Variabilität innerhalb (intra) (n=6) und zwischen (inter) Probenserien (n=3).

Substanz	Niedrige QK					Mittlere QK					Hohe QK				
	Intra		Inter			Intra		Inter			Intra		Inter		
	Konz. [pM]	MW [%]	SD [%]	MW [%]	SD [%]	Konz. [pM]	MW [%]	SD [%]	MW [%]	SD [%]	Konz. [pM]	MW [%]	SD [%]	MW [%]	SD [%]
Bisphenol	36	6,01	5,29	2,47	5,78	108	0,49	4,40	-2,83	4,59	1215	-3,43	1,72	-3,29	2,15
(Z)-Metabolit E	75	6,63	5,69	4,75	5,23	225	-2,23	6,53	-3,13	4,60	2531	-1,66	2,77	-1,55	2,45
(E)-Metabolit E	24	1,89	5,53	-0,49	5,29	72	-2,19	5,72	-3,08	4,46	810	-2,98	2,07	-1,89	2,61
Östradiol	12	3,21	3,37	1,34	5,44	36	-1,01	5,78	-2,86	4,62	405	-3,66	1,76	-2,53	3,36
Östron	12	5,53	6,89	3,15	6,28	36	-0,23	3,71	-1,34	3,10	405	-4,61	2,09	-3,74	3,01
Testosteron	150	3,26	3,59	-0,75	13,6	450	-2,60	15,38	-1,56	10,33	5063	-2,13	5,06	-4,75	4,66
Androstendion	150	-1,16	4,03	-1,65	9,41	450	-8,20	8,66	-6,11	7,35	5063	-2,80	4,22	-4,46	4,43
Progesteron	75	-0,60	4,35	-1,37	5,30	225	-5,48	5,21	-3,60	4,44	2531	-7,40	2,86	-5,78	2,92

QK: Qualitätskontrolle; MW: mittlere Abweichung vom Sollwert; SD: *standard deviation* (Standardabweichung); Übernommen aus Johanning et al. 2015

3.1.3 Stabilität und Wiederfindung

Die Stabilität der Analyten in Plasma wurde in Triplikaten über drei Frier-Tau-Zyklen und für die Lagerung bei Raumtemperatur über 8 Std. untersucht. Nach drei Frier-Tau-Zyklen wichen die gemessenen Konzentrationen der Analyten um -9,2 % bis 2,5 % vom Sollwert ab. Nach einer Lagerung der Proben für 8 Std. bei Raumtemperatur waren Abweichungen vom Sollwert von -6,2 % bis 3,4 % für alle Analyten messbar (Tabelle 23). Die östrogenen Tamoxifenmetaboliten und Sexualhormone waren somit in Plasma während verschiedener Lagerungsbedingungen und Behandlungen stabil.

Tabelle 23 Stabilität der Analyten über drei Frier-Tau-Zyklen und 8 Std. bei Raumtemperatur (n=3).

Substanz	Mittlere QK				Hohe QK			
	Frier-Tau		Lagerung bei RT		Frier-Tau		Lagerung bei RT	
	MW [%]	SD [%]	MW [%]	SD [%]	MW [%]	SD [%]	MW [%]	SD [%]
Bisphenol	-4,71	7,46	-0,05	8,74	-5,47	7,29	-3,42	5,63
(Z)-Metabolit E	0,42	1,85	3,37	3,84	-0,86	0,91	1,86	5,89
(E)-Metabolit E	-9,16	2,99	-3,05	3,97	-4,27	4,81	-0,83	1,46
Östradiol	-0,83	2,57	-0,40	2,67	-2,86	1,56	0,87	2,00
Östron	-4,04	1,79	-1,45	1,50	-2,23	2,54	-0,07	2,23
Testosteron	-1,18	2,51	0,16	4,97	-3,46	2,97	-2,17	2,90
Androstendion	2,45	7,76	-6,13	16,40	-3,74	5,10	-3,69	5,27
Progesteron	-3,74	5,06	-1,60	2,01	-0,42	1,98	0,99	1,05

QK: Qualitätskontrolle; RT: Raumtemperatur; MW: mittlere Abweichung vom Sollwert; SD: *standard deviation* (Standardabweichung); Übernommen aus Johanning et al. 2015

Die Stabilität der Analyten in aufgearbeiteten Proben wurde in niedriger, mittlerer und hoher Konzentration über den zeitlichen Verlauf einer Probenserie mit 96 Injektionen untersucht, indem die gemessenen Proben nach einer Lagerung von 33 Std. bei 6 °C nochmals zur Analyse injiziert wurden. Dabei wurde die Abweichung der Signalflächen (*area under the curve*, AUC) sowie die Abweichung der berechneten Konzentrationen verglichen. Während sich die AUCs von Östradiol, Östron, Androstendion und Bisphenol um 1,80 % bis 17,42 % erhöhten, blieben die AUCs von Testosteron in allen gemessenen Konzentrationen mit einer Abweichung von -0,71 % bis 0,36 % stabil. Bei Progesteron, (Z)- und (E)-Metabolit E erniedrigten sich die AUCs nach 33 Std. bei 6 °C um -5,19 % bis -14,76 %. Die berechneten Konzentrationen, die sich aus dem Quotienten der AUC des Analyten zum

AUC des internen Standards ergeben, wichen allerdings mit -2,8 % bis 8,8 % nur geringfügig ab (Tabelle 24). Somit waren die Proben mindestens über den Zeitraum der Messung von 96 Injektionen stabil.

Tabelle 24 Stabilität der Analyten bei 6 °C über 33 Std. (n=6).

Substanz	Niedrige QK		Mittlere QK		Hohe QK	
	MW [%]	SD [%]	MW [%]	SD [%]	MW [%]	SD [%]
Bisphenol	-2,79	6,70	-1,54	7,59	2,63	0,93
(Z)-Metabolit E	-3,08	4,46	1,40	4,69	1,22	1,90
(E)-Metabolit E	8,75	3,62	2,18	6,48	-1,37	2,32
Östradiol	2,19	7,23	-0,60	3,98	0,97	3,02
Östron	0,77	4,03	1,35	4,93	1,53	2,84
Testosteron	1,10	4,21	1,96	3,86	-1,61	3,56
Androstendion	-1,95	3,19	6,26	12,61	0,63	3,18
Progesteron	7,32	4,99	4,44	6,37	4,47	2,43

QK: Qualitätskontrolle; MW: mittlere Abweichung vom Sollwert; SD: *standard deviation* (Standardabweichung); Übernommen aus Johanning et al. 2015

Die Wiederfindungsrate der Analyten wurde berechnet, indem CHP vor und nach der in 2.2.1.2 beschriebenen Extraktion mit niedrigen, mittleren oder hohen Konzentrationen der Substanzen versetzt wurde. Östradiol, Östron, Testosteron und Androstendion sowie Bisphenol wiesen Wiederfindungsraten von 72,9 % bis 88,5 % auf. Beide Isomere von Metabolit E zeigten niedrigere Wiederfindungsraten von 61,1 % bis 70,0 % (Tabelle 25). Da für alle Analyten die Proben vor der Aufarbeitung mit deuterierten internen Standards versetzt wurden, wurden die geringen Wiederfindungsraten kompensiert.

Tabelle 25 Wiederfindungsrate der Analyten (n=3).

Substanz	Niedrige QK		Mittlere QK		Hohe QK	
	Wiederfindung [%]	SD [%]	Wiederfindung [%]	SD [%]	Wiederfindung [%]	SD [%]
Bisphenol	80,5	6,1	74,0	0,7	75,0	2,8
(Z)-Metabolit E	70,0	3,0	64,1	1,7	66,3	1,0
(E)-Metabolit E	68,9	2,6	61,1	1,3	66,9	1,7
Östradiol	83,1	1,0	75,8	2,9	76,5	0,5
Östron	86,1	8,6	76,4	6,6	79,8	1,8
Testosteron	72,9	9,2	78,1	4,8	76,7	1,2
Androstendion	77,2	4,0	88,5	2,9	80,6	0,9
Progesteron	84,8	2,1	80,2	3,6	77,5	1,2

QK: Qualitätskontrolle; SD: *standard deviation* (Standardabweichung); Übernommen aus Johanning et al. 2015

Die Ionensuppression durch die Matrix wurde untersucht, indem die Signale der Analyten mit und ohne extrahiertes Plasma verglichen wurden. Die Signale der Steroidhormone wurden durch Matrixeffekte um -3,97 % bis 15,08 % beeinflusst, wobei die AUC von Testosteron bis zu 27 % durch die Matrix erniedrigt wurde. Im Gegensatz dazu waren die AUCs von Bisphenol und Metabolit E in der Gegenwart von extrahierter Matrix bis zu 6-fach höher. Diese Instabilität der östrogenen Tamoxifenmetaboliten ohne extrahierte Matrix könnte durch Adsorption der Substanzen an Plastikoberflächen aufgrund des lipophilen Charakters der Stoffe begründet sein. Diese Effekte werden durch die Verwendung deuterierter interner Standards, die für alle Analyten eingesetzt wurden, kompensiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26 Ionensuppression der Analyten (n=3).

Substanz	Mittlere QK		Hohe QK	
	Ionensuppression [%]	SD [%]	Ionensuppression [%]	SD [%]
Bisphenol	-51,40	15,30	-100,45	6,08
(Z)-Metabolit E	-248,84	65,34	-609,32	164,06
(E)-Metabolit E	-133,38	43,31	-323,01	87,58
Östradiol	15,08	2,06	5,93	0,72
Östron	10,16	3,84	2,06	1,90
Testosteron	27,28	19,39	10,96	1,17
Androstendion	3,80	17,53	1,18	1,24
Progesteron	3,96	36,89	-3,97	4,59

QK: Qualitätskontrolle; SD: *standard deviation* (Standardabweichung); Übernommen aus Johanning et al. 2015

3.1.4 Selektivität, Spezifität und Anwendbarkeit

Um die Selektivität und Spezifität der HPLC-MS/MS-Methode zur Analytik von östrogenen Tamoxifenmetaboliten und Sexualhormonen zu gewährleisten, wurde jede Charge CHP auf die Abwesenheit von Tamoxifenmetaboliten, endogenen Steroidhormonen und sonstigen Störfaktoren untersucht. Die Chromatogramme des mit Aktivkohle behandelten Plasmas wiesen keine Signale bei den Retentionszeiten der Tamoxifenmetaboliten oder Sexualhormone auf (Abbildung 6a). Des Weiteren wurde das CHP mit Analytkonzentrationen im Bereich des LLOQs versetzt, um Interferenzen mit Matrixsignalen zu untersuchen (Abbildung 6b). Für alle Analyten konnten diese Interferenzen ausgeschlossen werden. Jedoch konnte das Signal von Progesteron nicht vollständig von einem unspezifischen Matrixsignal getrennt werden. Allerdings wurde, wie in 3.1.1 gezeigt, auch für Progesteron der LLOQ von 25 pM validiert.

Die validierte HPLC-MS/MS-Methode wurde auf Heparinplasmaproben von Tamoxifen behandelten, postmenopausalen Frauen vor und während der Therapie angewandt. Die Brustkrebspatientinnen wurden, wie in 2.2.12.2 beschrieben, bis zu 5 Jahre mit einer täglichen Einnahme von 20 mg Tamoxifen behandelt. Heparinplasmaproben wurden vor Behandlung und nach 6, 12 und 60 Monaten unter Therapie gesammelt. In der Abbildung 6c und d sind exemplarisch die quantifizierten Analyten einer postmenopausalen Brustkrebspatientin vor (Abbildung 1c) und nach 12 Monaten unter Tamoxifentherapie (Abbildung 6d) gezeigt. Mit der validierten HPLC-MS/MS-Methode konnten die Plasmaspiegel der Sexualhormone und der östrogenen Tamoxifenmetaboliten Bisphenol und Metabolit

E quantifiziert werden. Dabei waren Signale von Bisphenol und beider Isomere von Metabolit E nur in den Proben unter Tamoxifentherapie auffindbar.

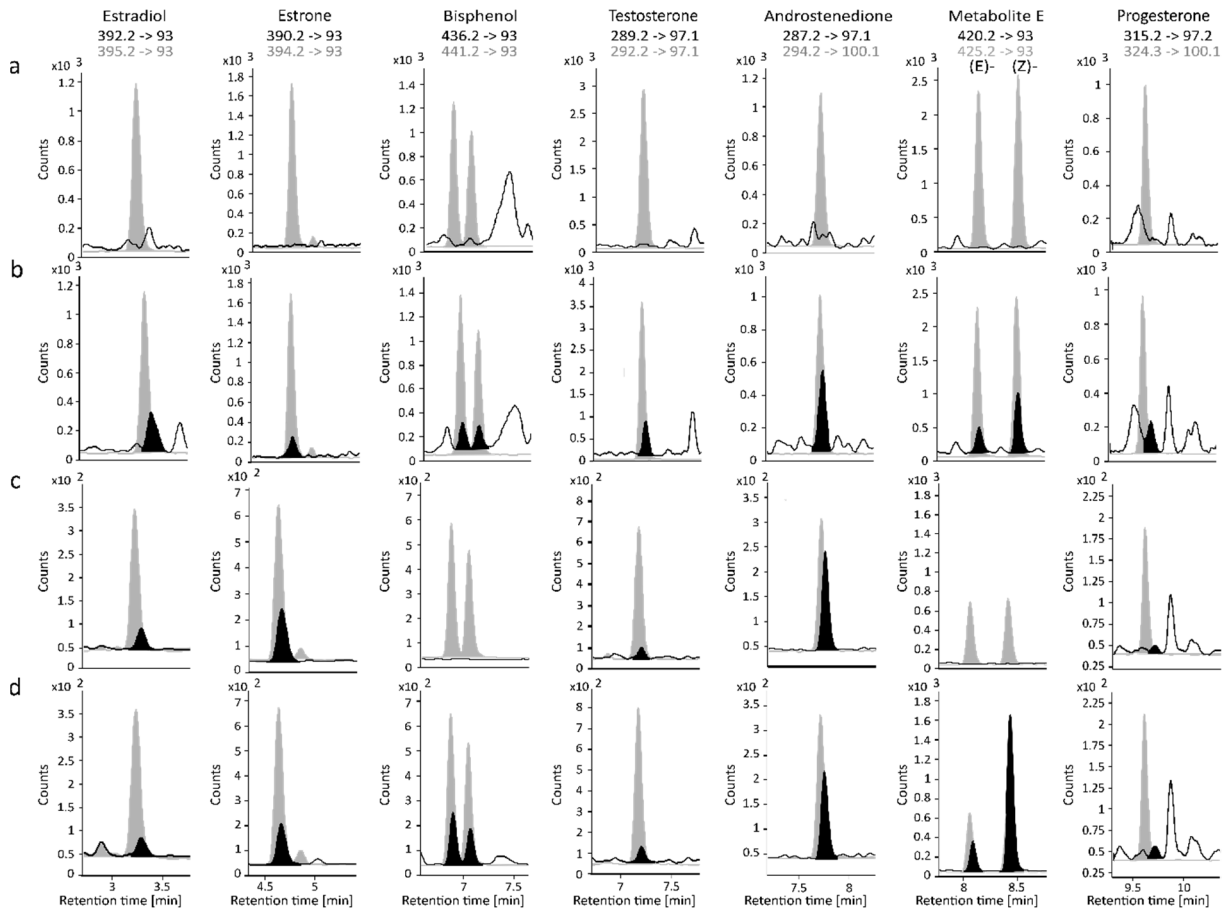


Abbildung 6 Chromatogramme von Bisphenol und Metabolit E sowie den Sexualhormonen.

Chromatogramme von reinem CHP (a), dem LLOQ (b), der Plasmaprobe einer postmenopausalen Patientin vor (c) und nach 12 Monaten Tamoxifentherapie (d). In der reinen CHP- und der LLOQ-Probe wurden die Signale der Analyten relativ zu denen der internen Standards um den Faktor 10 verstärkt. Die MRM-Übergänge und die Chromatogramme der internen Standards sind in *grau* und die der Analyten in *schwarz* gezeigt. Übernommen aus Johanning et al. 2015.

3.2 Eignung von Leberzelllinien als experimentelles Modell

Um den Metabolismus von Tamoxifen sowie den Einfluss von Tamoxifenmetaboliten auf die Aktivität von CYP-Enzymen und die Expression ADME-assoziiertes Gene in humanen Leberzellen untersuchen zu können, wurden drei verschiedene humane Leberzelllinien (HC-AFW1, HepaRG® und upcyte® Hepatozyten 653-03 sowie die mit funktionalem CYP2D6 transduzierten 653-03 2D6 Zellen) im Hinblick auf Fremdstoffwechsel-relevante Enzyme (Aktivität von CYP-Enzymen) sowie auf die Anwendbarkeit im Tamoxifenmetabolismus untersucht. Die geeignetste Leberzelllinie wurde im Anschluss anhand der

Wirkung der prototypischen Induktoren Rifampicin und Phenobarbital auf die Aktivität und mRNA-Expression des Xenotiotika-metabolisierenden Systems validiert.

3.2.1 Charakterisierung des Fremdstoff-metabolisierenden Systems

3.2.1.1 Aktivität der CYP-Enzyme

Nach Kultivierung und Konditionierung der Zelllinien (2.2.6.2.1-2.2.6.2.1.3) wurde die Aktivität der einzelnen CYP-Enzyme mit Hilfe des Umsatzes von Isoenzym-spezifischen Substraten ermittelt (2.2.8).

Die Leberzelllinie HC-AFW1, die aus einem pädiatrischen, hepatozellulären Karzinom isoliert wurde (Armeanu-Ebinger et al. 2012), wies nur eine geringe Umsetzung von Phenacetin (CYP1A2), Amodiaquin (CYP2C8) und Atorvastatin (CYP3A4) auf. Dabei wurden Acetaminophen und N-DE-Amodiaquin zu $8,9 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ und 2-OH-Atorvastatin zu $1,5 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ im Überstand quantifiziert (Abbildung 7, HC-AFW1). Im Gegensatz dazu zeigten die kommerziell erhältlichen HepaRG[®]-Zellen Enzymaktivitäten bei allen getesteten CYP-Isoformen mit Ausnahme von CYP2D6 wie folgt auf: $27,2 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ Acetaminophen (CYP1A2), $68,4 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ OH-Bupropion (CYP2B6), $457,8 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ N-DE-Amodiaquin (CYP2C8), $60,7 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ OH-Methyltolbumatid (CYP2C9), $65,4 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ 4'-OH-Mephenytoin (CYP2C19) und $35,9 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ 2-OH-Atorvastatin (CYP3A4) (Abbildung 7, HepaRG). Die Hepatozyten der Firma upcyte[®] 653-03 und 653-03 2D6 zeigten bei den CYP-Isoenzymen 1A2, 2C8, 2C9 und 2C19 nahezu gleiche Aktivitäten wie die HepaRG[®]-Zellen. Allerdings war die Bildung von OH-Bupropion mit $2927\text{-}3640 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ um den Faktor 40 bis 50 und die Umsetzung von Atorvastatin zu 2-OH-Atorvastatin mit $175\text{-}357 \text{ pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ 5- bis 8-fach höher in beiden upcyte[®] Hepatozytenlinien (Abbildung 7, 653-03 und 653-03 2D6). Im Vergleich der beiden 653-03-Zelllinien zeigten die mit funktionalem CYP2D6 transduzierten 653-03 2D6 eine 50-fach erhöhte Umsetzung von Propafenon zu 5-OH-Propafenon und somit CYP2D6-Aktivität (Abbildung 7, 653-03 2D6). Weitere Unterschiede in der Enzymaktivität zwischen 653-03- und 653-03 2D6-Zellen waren für CYP1A2, 2B6, 2C8 und 2C19 maximal 2-fach und bei den Isoenzymen CYP2C9 und 3A4 kleiner als 2,8-fach zu beobachten.

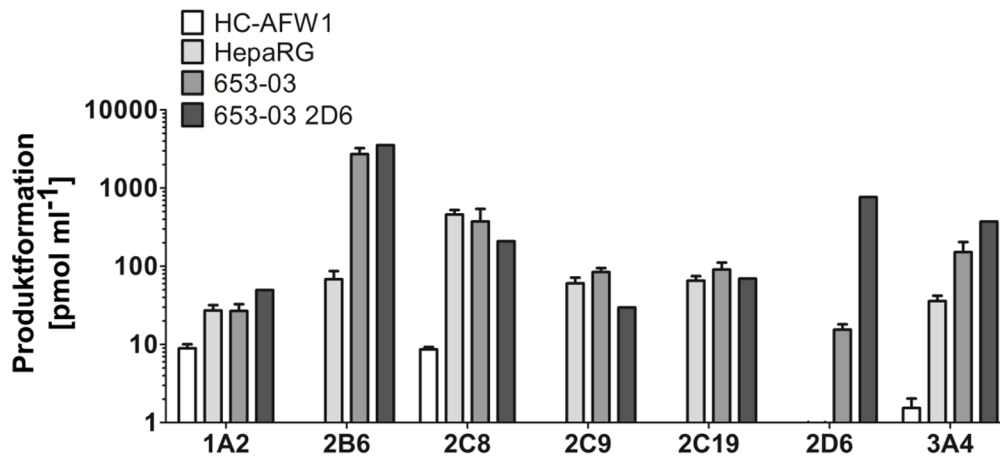


Abbildung 7 CYP-Aktivität der Leberzelllinien HC-AFW1, HepaRG® und den upcyte® Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6.

Die basale Aktivität der CYP-Enzyme 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4 wurde in den Leberzelllinien HC-AFW1, HepaRG® und den upcyte® Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6 anhand der Umsetzung von Isoenzym-spezifischen Substraten (1A2: Phenacetin; 2B6: Bupropion; 2C8: Amodiaquin; 2C9: Tolbutamid; 2C19: Mephenytoin; 2D6: Propafenon; 3A4: Atorvastatin) und anschließender Quantifizierung der entsprechenden Metaboliten via HPLC-MS/MS bestimmt.

3.2.1.2 Tamoxifenmetabolismus

Weitergehend wurden die verschiedenen Hepatozyten mit Tamoxifen inkubiert und nach 48 Std. die Metaboliten DM-Tamoxifen, 4-OH-Tamoxifen, Endoxifen sowie die Glucuronide Tamoxifen-4-Glucuronid und Endoxifen-Glucuronid aus dem Zellmedium quantifiziert (2.2.1.9), um die Eignung der Zelllinien im Hinblick auf den Tamoxifenmetabolismus zu untersuchen.

Im Zellmedium der HC-AFW1-Zellen konnte nur der Hauptmetabolit DM-Tamoxifen mit 5,5 nM quantifiziert werden, während die Konzentrationen der hydroxylierten Tamoxifenmetaboliten sowie deren Glucuronide unter dem LLOQ waren (Abbildung 8, HC-AFW1). Dies stimmt mit den gemessenen CYP-Aktivitäten (3.2.1.1) der Zelllinie überein. Im Gegensatz dazu war in Anwesenheit der HepaRG®-Zellen die Konzentration von DM-Tamoxifen 16-fach höher. Des Weiteren konnte im Überstand dieser Zellen der hydroxylierte Metabolit 4-OH-Tamoxifen und dessen Glucuronid mit 0,15 nM bzw. 0,3 nM quantifiziert werden (Abbildung 8, HepaRG). Endoxifen, dessen Bildung von funktionalem CYP2D6 abhängig ist sowie dessen Phase II-Metabolit konnte nicht im Zellmedium der HepaRG®-Linie gefunden werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den gemessenen CYP-Aktivitäten, insbesondere dem Fehlen von funktionalem CYP2D6, der HepaRG®-Zellen überein. Die upcyte® Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6 wiesen mit 8,2 nM bzw. 23,4 nM geringere Konzentrationen von DM-Tamoxifen im Zellmedium als die HepaRG® Zellen auf. Dafür waren die Konzentrationen der hydroxylierten Metaboliten sowie die der Glucuronide höher: in den parentalen 653-03-Zellen entstand 4-OH-Tamoxifen mit 1,2 nM und

dessen Phase II-Metabolit mit 0,37 nM. Auch wenn kein freies Endoxifen im Zellmedium der 653-03-Hepatozyten quantifiziert werden konnte, wurde dennoch dessen Glucuronid mit einer Konzentration von 0,1 nM gefunden (Abbildung 8, 653-03). Die Konzentrationen von 4-OH-Tamoxifen, dessen Glucuronid sowie des Endoxifen-Glucuronids waren 13- bis 23-fach höher in 653-03 2D6 Zellen. Die Konzentration des anti-östrogenen, CYP2D6-abhängigen Metaboliten Endoxifen war am Ende der Inkubation 4,1 nM (Abbildung 8, 653-03 2D6). Dadurch konnte gezeigt werden, dass die upcyte™ Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6 den Tamoxifenmetabolismus *in vivo*-ähnlich abbilden und zusätzlich ein Modell für dessen Abhängigkeit vom CYP2D6-Polymorphismus darstellen.

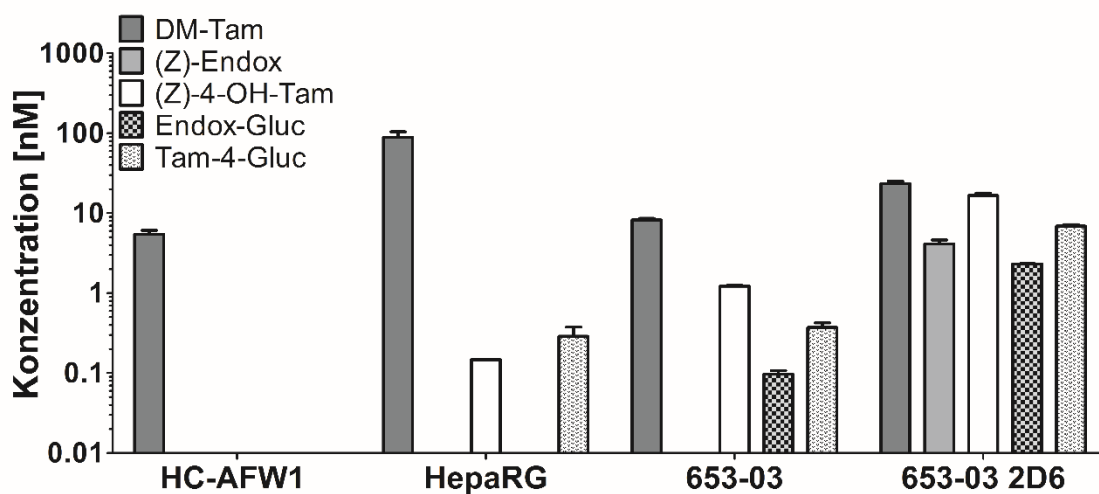


Abbildung 8 Konzentrationen der Hauptmetaboliten nach Inkubation von HC-AFW1-, HepaRG®, upcyte® 653-03- und 653-03 2D6-Zellen mit Tamoxifen.

Die Leberzelllinien HC-AFW1, HepaRG®, upcyte® 653-03 und 653-03 2D6 wurden über 48 h mit Tamoxifen inkubiert und im Anschluss im jeweiligen Zellmedium die Hauptmetaboliten N-Desmethyltamoxifen (DM-Tam), N-Desmethyl-4-hydroxytamoxifen ((Z)-Endox), 4-Hydroxytamoxifen ((Z)-4OH-Tam) sowie die Glucuronide Tamoxifen-4-O-Glucuronid (Tam-4-Gluc) und N-desmethyltamoxifen-4-O-Glucuronid (Endox-Gluc) mit Hilfe von HPLC-ESI-MS/MS quantifiziert. HC-AFW1- und HepaRG®-Zellen wurden mit 500 nM Tamoxifen behandelt, während die upcyte® Hepatozyten mit 1 µM Tamoxifen inkubiert wurden.

3.2.2 Validierung der Leberzelllinie

Aufgrund der höchsten CYP-Enzymaktivitäten (3.2.1.1) sowie dem *in vivo*-ähnlichen Tamoxifenmetabolismus (3.2.1.2) wurden die upcyte® Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6 als geeignete Leberzelllinie ausgewählt, um den Stoffwechsel von Tamoxifen zu östrogenen Metaboliten zu untersuchen. Darüber hinaus wurden die Zellen als Modell für die in der Bevölkerung unterschiedlichen vorkommenden CYP2D6-Metabolisierungs-Phänotypen verwendet. Individuen ohne funktionales CYP2D6 (PM, ca. 5–10% bei Kaukasiern) wurden hier durch die parentale 653–03 Zelllinie repräsentiert, während normale Enzymaktivität (EM) durch die CYP2D6 Kompetente 653–03

2D6 Zelllinie modelliert wurde. Da zusätzlich die Wirkung der anti-östrogenen und östrogenen Tamoxifenmetaboliten auf die Aktivität der CYP-Enzyme und die Expression von Phase I- und Phase II-Enzymen sowie Transportern des ADME-Systems analysiert wurde, wurden die upcyte® Hepatozyten vor ihrer Verwendung als Modellsystem hinsichtlich der Induzierbarkeit der CYP-Enzyme auf Ebene der Enzymaktivität und Proteinexpression sowie der mRNA-Expression von ADME-assoziierten Genen mit den prototypischen und gut charakterisierten Modellsubstraten Rifampicin und Phenobarbital validiert.

Die Inkubation mit Rifampicin über 72 Std. erhöhte die Aktivität der CYP-Isoenzyme 2C8 bis 4,9-fach, 3A4 bis 3,2-fach, 2C9 bis 2,8-fach und 2C19 bis 1,9-fach in beiden Zelllinien verglichen mit der Kontrolle (Abbildung 9 c-f). Die Aktivität von CYP1A2 und 2B6 wurde nicht induziert (Abbildung 9 a, b). Phenobarbital dagegen induzierte nur die CYP2B6-Aktivität bis zu 1,9-fach und die CYP3A4-Aktivität bis zu 1,8-fach (Abbildung 9 b, f). Auf Ebene der Proteinexpression wurde CYP3A4 ebenfalls durch Rifampicin und Phenobarbital induziert. Indessen wurde das CYP2D6-Protein, dessen Expression nicht durch die Behandlungen beeinflusst wurde, nur in den transduzierten 653-03 2D6-Zellen detektiert (Abbildung 9 g). Der Einfluss der prototypischen Induktoren Rifampicin und Phenobarbital auf die Aktivität und Expression der CYP-Enzyme wurde auf Basis der mRNA-Expression bestätigt: Rifampicin induzierte CYP3A4-mRNA bis zu 20-fach sowie CYP2C8 und 2C19 bis zu 2,4-fach in beiden Zelllinien. Des Weiteren wurde die Expression des Phase II-Enzyms GSTA2 bis zu 2,6-fach und des ABC-Transporters (*ATP binding cassette*, ATP bindende Kasette) ABCB1 bis zu 1,7-fach induziert. Im Gegensatz dazu wurde die Expression der CYP-Enzyme 1A2 und 2E1 bis zu 10-fach, und die der Phase II-Enzyme SULT1B1 und NAT2 bis zu 2,5-fach gehemmt (Abbildung 9 h, Rifa). Phenobarbital induzierte die Expression von CYP3A4 9-fach und CYP2C19 1,5-fach. Außerdem wurde die Expression der Phase II-Enzyme GSTA2 bis zu 8-fach und UGT1A1 um 1,8-fach erhöht. Die Transporter ABCB1, ABCG1 und SLCO1B1 waren bis zu 3-mal höher exprimiert. Dagegen wiesen CYP2C8, 2E1, SULT1B1, NAT1 und SLC22A7 eine Erniedrigung in der Expression um bis zu 5-fach auf (Abbildung 9 h PB).

Diese Daten stimmen mit früheren Studien zu den Effekten von Rifampicin und Phenobarbital auf Enzym-Aktivität und mRNA-Expression überein (Rae et al. 2001; Chen und Raymond 2006; Ohno et al. 2009). Auf Grundlage dieser Validierung wurden die upcyte® Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6 als geeignetes Modellsystem für die Analyse des Tamoxifenmetabolismus und der Auswirkungen von Tamoxifenmetaboliten auf CYP-Aktivität und mRNA-Expression von ADME-assoziierten Faktoren eingesetzt.

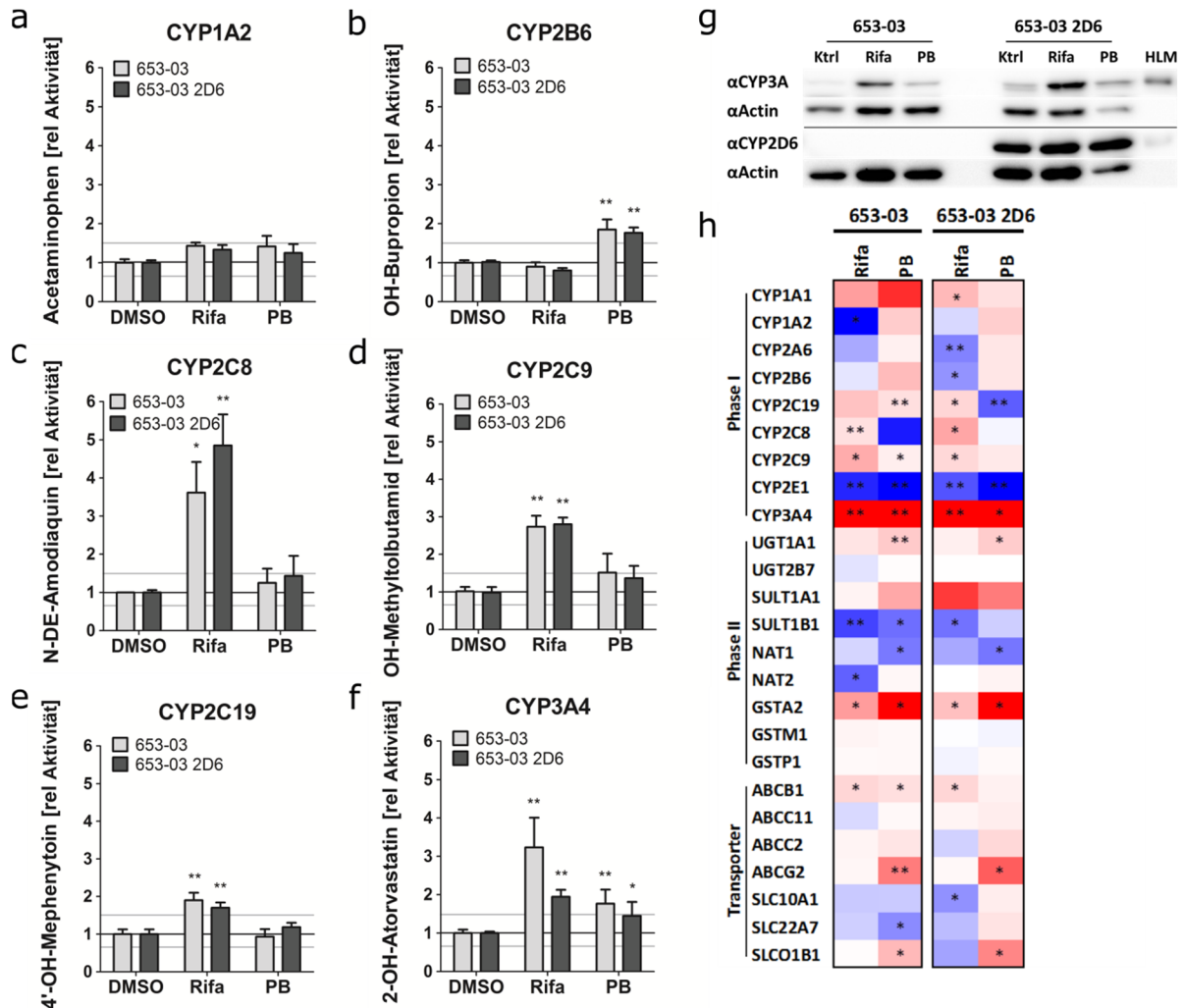


Abbildung 9 Charakterisierung der upcyte® Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6 nach Behandlung mit Rifampicin und Phenobarbital.

Die upcyte® Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6 wurden mit Rifampicin und Phenobarbital über 72 Std. behandelt und anschließend wurde die CYP-Aktivität mit Hilfe von Isoenzym-spezifischen Modellsubstraten und HPLC-MS/MS-Messungen (a-f), die Proteinexpression mit Hilfe spezifischer Antikörper für CYP3A4 und 2D6 (g) und die mRNA-Expression ADME-assoziiierter Gene via quantitativer PCR von 25 Genen (h) analysiert. Das Diagramm der quantitativen PCR zeigt die Expression bezogen auf die DMSO-Kontrolle von 25 Genen, die mit Fremdstoffmetabolismus und -Transport assoziiert sind. Die Farbkodierung ist wie folgt: maximale Intensität von Rot: 5-fache Hochregulation; maximale Intensität von Blau: 5-fach reduzierte Expression; Weiß: keine Änderung. (Ktrl: Kontrolle; Rifa: Rifampicin; PB: Phenobarbital). Signifikanzniveaus: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$. (Johanning et al. 2017)

3.3 Metabolismus von Tamoxifen zu Bisphenol und Metabolit E

Der Metabolismus von Tamoxifen und dessen Metaboliten zu den östrogenen Metaboliten Bisphenol und Metabolit E wurde *in vitro* mit humanen Lebermikrosomen (HLM), Supersomes™, welche spezifisch einzelne CYP- oder UGT-Isoenzyme exprimierten, und mit den upcyte® Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6 untersucht.

3.3.1 Identifikation der metabolischen Reaktion zu Bisphenol und Metabolit E

Ein Gemisch von HLM verschiedener Spender wurde verwendet, um die Bildung von Bisphenol und Metabolit E aus Tamoxifen und verschiedenen von Tamoxifen abgeleiteten Metaboliten in An- und Abwesenheit eines NADPH-regenerierenden Systems zu untersuchen.

Dabei wurden beide Isomere von Metabolit E 8- bis 273-mal stärker aus Tamoxifen, DM-Tamoxifen und DDM-Tamoxifen in Anwesenheit des NADPH-regenerierenden Systems gebildet als ohne dieses (Kontrolle). Dies weist auf eine NADPH-abhängige, mikrosomale Reaktion hin. Dabei zeigte Tamoxifen eine 2,3- bis 2,5-fach höhere Bildungsrate für (*Z*)-Metabolit E mit $9,4 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ als DM-Tamoxifen ($4,2 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) und DDM-Tamoxifen ($3,7 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) (Abbildung 10 a). Dies zeigte sich auch in der Bildung des (*E*)-Isomers von Metabolit E (Abbildung 10 b), wobei die Bildungsraten 6- bis 9-fach niedriger waren im Vergleich zur Bildung des (*Z*)-Isomers. Diese Ergebnisse weisen auf Tamoxifen als direkten Vorläufer von Metabolit E hin. Allerdings ist aufgrund der hohen *in vivo* Plasmakonzentrationen von DM-Tamoxifen dessen Rolle bei der Bildung beider Isomere von Metabolit E wahrscheinlich (Mürdter et al. 2011).

Ähnlich wie Metabolit E zeigte auch Bisphenol eine bis zu 18-mal höhere Bildung aus den hydroxylierten Tamoxifenmetaboliten 4-OH-Tamoxifen, Endoxifen und Norendoxifen verglichen zu der Kontrolle, so dass auch hier Hinweise auf eine aktive, NADPH-abhängige Seitenkettenabspaltung gefunden wurden (Abbildung 10 c). Dabei zeigte 4-OH-Tamoxifen die höchste Umsetzung zu Bisphenol mit $3,3 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Die Bildung von Bisphenol aus Endoxifen und Norendoxifen war mit 2,6 bzw. $1,2 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ bis zu 2,75-fach niedriger als aus 4-OH-Tamoxifen. Die Hydroxylierung von Metabolit E zu Bisphenol zeigte mit $16,5 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ für das (*Z*)-Isomer bzw. $7 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ für das (*E*)-Isomer eine bis zu 14-fach höhere Bildungsrate als die Seitenkettenabspaltung der anti-östrogenen Tamoxifenmetaboliten (Abbildung 10 d). Trotz der stärkeren Metabolisierungsrate von Metabolit E zu Bisphenol, ist die um Faktor 10 höhere Plasmakonzentration der anti-östrogenen Tamoxifenmetaboliten (Mürdter et al. 2011; Johänning et al. 2015) ein Grund dafür, dass auch diese Metaboliten wahrscheinlich zur Entstehung von Bisphenol beitragen.

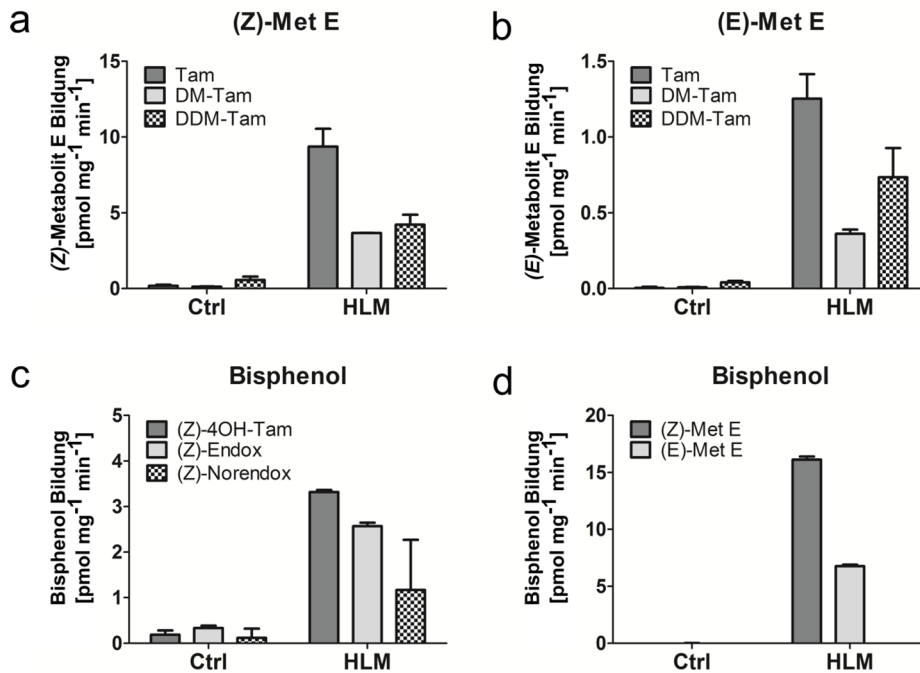


Abbildung 10 Metabolismus zu Metabolit E und Bisphenol aus möglichen Vorläufern in Lebermikrosomen.

Ein Gemisch von humanen Lebermikrosomen (HLM) verschiedener Spender wurde verwendet, um die Bildung von (Z)- (a) und (E)-Metabolit E (b) aus Tamoxifen (Tam), N-Desmethyltamoxifen (DM-Tam) und N-Didesmethyltamoxifen (DDM-Tam) sowie die Bildung von Bisphenol aus 4-Hydroxytamoxifen (4OH-Tam), N-Desmethyl-4-hydroxytamoxifen (Endox) und N-Didesmethyl-4-hydroxytamoxifen (Norendox) (c) und beiden Isomeren von Metabolit E (d) zu untersuchen. (Ctrl: Control (Kontrolle); HLM: humane Lebermikrosomen). (Johanning et al. 2017)

3.3.2 Identifikation der an der Bildung von Bisphenol und Metabolit E beteiligten CYP-Enzyme

Die CYP-Enzyme, die die NADPH-abhängige, mikrosomale Bildung von Bisphenol und Metabolit E aus Tamoxifen und daraus abgeleiteten Metaboliten katalysieren, wurden mit Hilfe von Insektenzellmikrosomen, welche durch Transfektion mit Baculoviren spezifische, humane CYP-Enzyme exprimieren (Supersomes™), identifiziert.

Die Bildung von (Z)-Metabolit E aus Tamoxifen wurde am stärksten durch CYP2C19, 3A und 1A2 mit bis zu $8,9 \text{ fmol} \cdot \text{pmol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ katalysiert. Die Isoenzyme CYP2D6, 2B6 und 1A1 zeigten mit bis zu $3,9 \text{ fmol} \cdot \text{pmol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ weniger hohe Bildungsraten. Die Abspaltung der Seitenkette von DM-Tamoxifen wurde hauptsächlich von CYP2D6, 1A2 und 3A mit bis zu $5,7 \text{ fmol} \cdot \text{pmol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ katalysiert. Für die Bildung von (Z)-Metabolit E aus DDM-Tamoxifen zeigten die CYP-Enzyme 2D6 und 3A4 mit $7,9$ und $3,2 \text{ fmol} \cdot \text{pmol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ die höchste Aktivität (Abbildung 11 a). Analog dazu wurde die Bildung des (E)-Isomers von Metabolit E durch die gleichen CYP-Enzyme katalysiert, dessen Bildungsraten allerdings ca. zehnfach niedriger als für (Z)-Metabolit E waren. Jedoch konnte kein Unterschied in den

Aktivitäten von CYP2D6, 3A4 und 1A2 zwischen DM-Tamoxifen und DDM-Tamoxifen beobachtet werden (Abbildung 11 b).

Die Bildung von Bisphenol aus den anti-östrogenen Tamoxifenmetaboliten 4-OH-Tamoxifen, Endoxifen und Norendoxifen wurde mit bis zu maximal $4,3 \text{ fmol}\cdot\text{pmol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ von mehreren CYP-Enzymen katalysiert, so dass die Reaktion keinem spezifischen Isoenzym zugeordnet werden konnte (Abbildung 11 c). Dahingegen wurde Metabolit E stereospezifisch von CYP2C19 ((*Z*)-Metabolit E: $64 \text{ fmol}\cdot\text{pmol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) und 2B6 ((*E*)-Metabolit E: $79 \text{ fmol}\cdot\text{pmol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) zu Bisphenol hydroxyliert, wohingegen die Stereospezifität der von CYP2C8 katalysierte Reaktion nicht so ausgeprägt war (Abbildung 11 d). Verglichen mit der Seitenkettenabspaltung der anti-östrogenen Tamoxifenmetaboliten war die Bildung von Bisphenol aus Metabolit E via Hydroxylierung somit bis zu 30-fach höher.

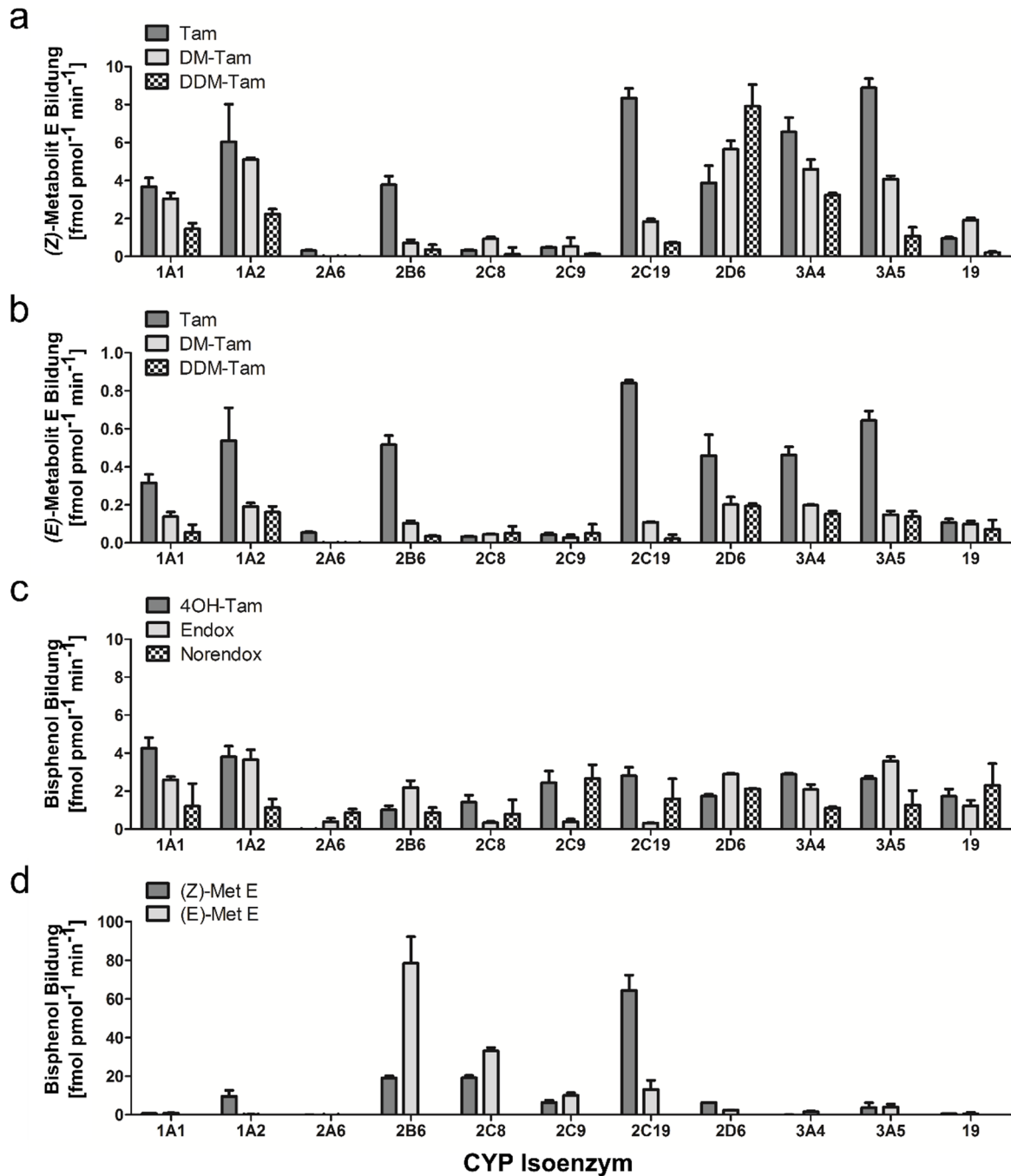


Abbildung 11 Identifikation der verantwortlichen CYP-Isoenzyme für die Bildung von Metabolit E und Bisphenol.

Supersomes™ spezifisch für einzelne CYP-Enzyme wurden verwendet, um die Isoenzyme zu identifizieren, die die Bildung von (Z)- (a) und (E)-Metabolit E (b) aus Tamoxifen (Tam), N-Desmethyltamoxifen (DM-Tam) und N-Didesmethyltamoxifen (DDM-Tam) sowie die Bildung von Bisphenol aus 4-Hydroxytamoxifen (4OH-Tam), N-Desmethyl-4-hydroxytamoxifen (Endox) und N-Didesmethyl-4-hydroxytamoxifen (Norendox) (c) und beiden Isomeren von Metabolit E (d) katalysieren. (Johanning et al. 2017)

3.3.3 Identifikation der UGT-Enzyme für die Umsetzung zu Bisphenol- und Metabolit E-Glucuroniden

Für die Identifikation der UGT-Enzyme, die Bisphenol und Metabolit E mit UDP-Glucuronsäure zu den jeweiligen Glucuroniden konjugieren, wurden wie in 3.3.2 beschrieben Supersomes™, die spezifische UGT-Isoenzyme exprimieren, genutzt.

Die Glucuronidierung von (*Z*)-Metabolit E wurde hauptsächlich von UGT2B7, 1A9 und 1A3 mit bis zu $143 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ katalysiert. Die Substitution der Hydroxylgruppe von (*E*)-Metabolit E durch UDP-Glucuronsäure erfolgte durch UGT1A8 mit $596 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ sowie 2B7 und 1A3 mit 412 bzw. $187 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Abbildung 12 a). Dadurch wurde das (*E*)-Isomer 4-14-mal schneller glucuronidiert als (*Z*)-Metabolit E. Das Isoenzym UGT1A8 glucuronidierte einzig (*E*)-Metabolit E, so dass hier Hinweise auf eine Stereospezifität der UGT-Enzyme gefunden wurden.

Durch die Glucuronidierung von Bisphenol wurden zwei Isomere des Bisphenol-Glucuronids gebildet. Dabei führte die Umsetzung von Bisphenol mit UDP-Glucuronsäure durch die UGT-Enzyme 2B7, 1A9, 1A3 und 1A1 mit einer Bildungsrate von $666 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ für UGT2B7 und bis zu $150 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ für die anderen Isoenzyme zu etwa gleichen Teilen zu beiden Isomeren. Dahingegen produzierte UGT1A8 mit $353 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, wie im Fall von Metabolit E, hauptsächlich das (*E*)-Isomer, während die Umsetzung von Bisphenol durch UGT2B17 ($128 \text{ pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) zum (*Z*)-Isomer führte (Abbildung 12 b).

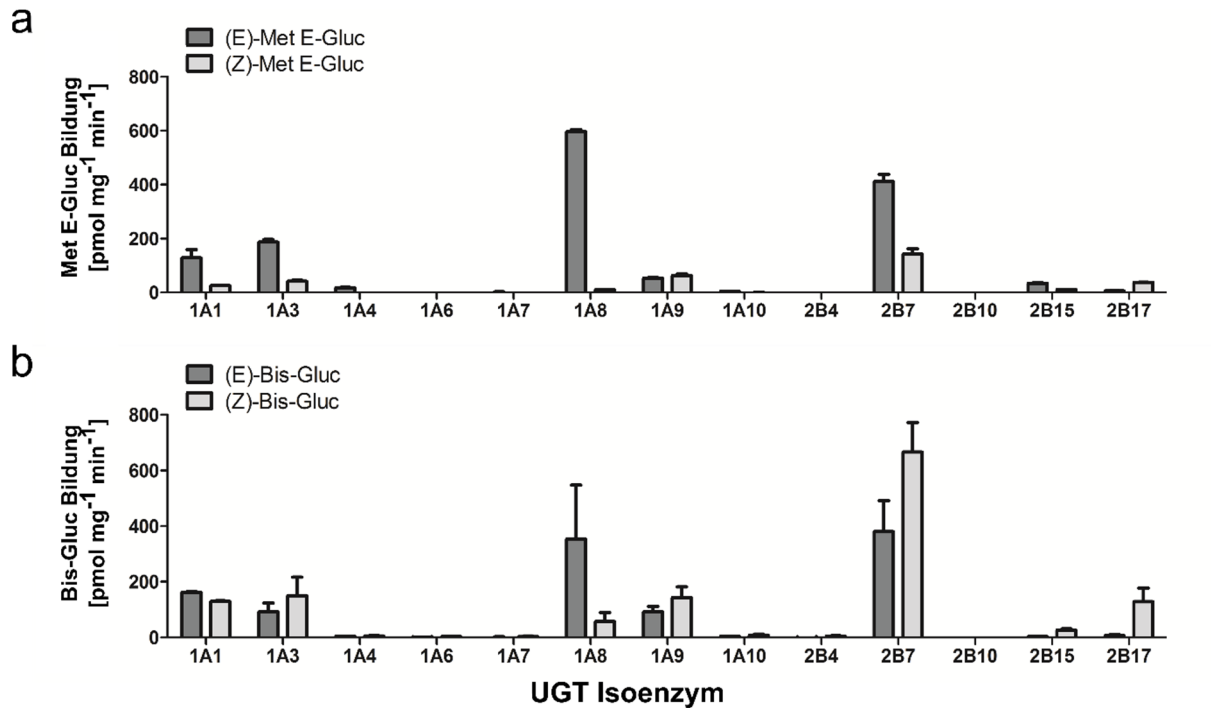


Abbildung 12 Identifikation der verantwortlichen UGT-Enzyme für die Glucuronidierung von (Z)- und (E)-Metabolit E und Bisphenol.

Supersomes™ spezifisch für einzelne UGT-Enzyme wurden verwendet, um die Isoenzyme zu identifizieren, die die Glucuronidierung von Metabolit E (a) und Bisphenol (b) katalysieren. (Met E-Gluc: Metabolit E-Glucuronid; Bis-Gluc: Bisphenol-Glucuronid). (Johanning et al. 2017)

3.3.4 Formationskinetiken von Metabolit E und Bisphenol

Die Formationskinetiken von Bisphenol und beider Isomere von Metabolit E aus metabolischen Vorläufern wurde mit Hilfe der Inkubation von HLM mit steigenden Substratkonzentrationen bestimmt.

Tamoxifen zeigte die höchste Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) mit $9,2 \text{ pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ zu (Z)-Metabolit E, wobei DDM-Tamoxifen die niedrigste K_m -Konzentration für die Formationen zu diesem Isomer aufwies. Die K_m -Werte für (E)-Metabolit E zeigten keinen Unterschied bei der Umsetzung von Tamoxifen und DM-Tamoxifen. Die intrinsische Clearance (Cl_{int}) von Tamoxifen, DM- und DDM-Tamoxifen zu beiden Isomeren von Metabolit E war mit $0,112$ bzw. $0,049 \text{ } \mu\text{l mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ für Tamoxifen am höchsten, gefolgt von DDM-Tamoxifen und DM-Tamoxifen (Tabelle 27). Dabei waren die Werte der Cl_{int} zu (E)-Metabolit E um den Faktor 2 niedriger als zu dem (Z)-Isomer.

Tabelle 27 Formationskinetik beider Isomere von Metabolit E aus Tamoxifen, DM- und DDM-Tamoxifen.

	<i>(Z)</i> -Metabolit E			<i>(E)</i> -Metabolit E		
	Tam	DM-Tam	DDM-Tam	Tam	DM-Tam	DDM-Tam
V_{max} [pmol mg⁻¹ min⁻¹]	9,2	6,1	5,2	0,57	0,32	0,70
K_m [μM]	82,3	102,0	55,1	11,5	11,5	20,7
V_{max} / K_m [μl mg⁻¹ min⁻¹]	0,112	0,060	0,095	0,049	0,028	0,034

Tam: Tamoxifen; DM-Tam: N-Desmethyltamoxifen; DDM-Tam: N-Didesmethyltamoxifen; Johanning et al. 2017

Bei der Bildung von Bisphenol aus Metabolit E war die Hydroxylierung von *(Z)*-Metabolit E zweimal schneller als die des *(E)*-Isomers (17,2 pmol mg⁻¹ min⁻¹ gegenüber 8,1 pmol mg⁻¹ min⁻¹), wobei die K_m-Werte vergleichbar waren (8,2 μM für *(Z)*-Metabolit E und 10,4 μM für *(E)*-Metabolit E). Dadurch wurde die höchste Cl_{int} von *(Z)*-Metabolit E zu Bisphenol mit 2,103 μl mg⁻¹ min⁻¹ beobachtet, wobei die Cl_{int} der anti-östrogenen Tamoxifenmetaboliten zu Bisphenol bis zu 40-fach und die des *(E)*-Isomers bis zu 16-fach niedriger waren (Tabelle 28).

Tabelle 28 Formationskinetiken von Bisphenol aus den anti-östrogenen Tamoxifenmetaboliten und beiden Isomeren von Metabolit E.

	Bisphenol				
	4-OH-Tam ^a	Endox ^a	Norendox ^a	<i>(Z)</i> -Met E	<i>(E)</i> -Met E
V_{max} [pmol mg⁻¹ min⁻¹]	-	-	-	17,2	8,1
K_m [μM]	-	-	-	8,2	10,4
V_{max} / K_m [μl mg⁻¹ min⁻¹]	0,046	0,033	0,041	2,103	0,780

a: aufgrund von Substratinhibition bei höheren Konzentrationen wurde V_{max}/K_m mit Hilfe der Steigung der linearen Regressionskurve ermittelt; 4-OH-Tam: 4-Hydroxytamoxifen; Endox: N-Desmethyl-4-hydroxytamoxifen; Norendox: N-Didesmethyl-4-hydroxytamoxifen; Met E: Metabolit E; Johanning et al. 2017

3.3.5 Zeitabhängiger Metabolismus von Tamoxifen in humanen Hepatozyten

Der zeitabhängige Metabolismus von Tamoxifen zu demethylierten, anti-östrogenen und östrogenen Metaboliten sowie den jeweiligen Glucuroniden wurde in humanen Hepatozyten über 6 Tage untersucht. Die verwendeten Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6 der Firma upcyte technologies GmbH, Hamburg, entsprachen dabei einem Modell für die An- bzw. Abwesenheit von funktionalem CYP2D6. Die Aktivität dieses CYP-Enzyms ist stark mit dem Metabolismus von Tamoxifen und zusätzlich

mit dem Therapieverlauf assoziiert (Desta 2004; Goetz et al. 2005; Jin et al. 2005; Schroth et al. 2007; Mürdter et al. 2011; Brauch et al. 2013; Saladores et al. 2013).

Im Medium beider Zelllinien nahm die Tamoxifen-Konzentration innerhalb der ersten 24 Std. um bis zu 88 % ab, wobei die 653-03 2D6 Zelllinie an späteren Zeitpunkten geringere Tamoxifen-Konzentrationen im Zellmedium aufwies als die 653-03 Zellen (Abbildung 13 a). Die Bildung von DM-Tamoxifen konnte mit Konzentrationen von bis zu 8 nM (653-03) bzw. 14 nM (653-03 2D6) nach 24 Std. in beiden Zelllinien beobachtet werden. Die Konzentration von DM-Tamoxifen nahm in dem Zellmedium der 653-03 2D6 Zellen allerdings nach 24 Std. ab (Abbildung 13 b). Dies kann durch die CYP2D6-abhängige Bildung von hydroxylierten Metaboliten erklärt werden. Dementsprechend wurde Endoxifen, welches hauptsächlich durch die CYP2D6-abhängige Hydroxylierung aus DM-Tamoxifen gebildet wird, alleinig im Zellmedium der CYP2D6 exprimierenden Zelllinie mit bis zu 11 nM quantifiziert (Abbildung 13 d). Im Gegensatz dazu wurde der hydroxylierte Tamoxifenmetabolit 4-OH-Tamoxifen im Zellmedium beider Zelllinien mit maximalen Konzentrationen von 0,9 nM (653-03) und 21 nM (653-03 2D6 Zellen) gefunden (Abbildung 13 c). Dieser 23-fache Unterschied zeigte sich auch in der Bildung des 4-OH-Tamoxifen-Glucuronids, der initial nach 24 Std. 30-fach war (653-03: 0,65 nM; 653-03 2D6: 20,8 nM) und sukzessiv auf den Faktor 5 sank (653-03: 18,8 nM; 653-03 2D6: 97,0 nM) (Abbildung 13 e). Das Endoxifen-Glucuronid konnte, obwohl das Aglykon im Zellmedium der 653-03 Zellen nicht nachweisbar war, in beiden Zelllinien quantifiziert werden (Abbildung 13 f). Dabei wurden in den 653-03 Zellen Konzentrationen bis 0,8 nM und in Anwesenheit der 653-03 2D6 Zellen bis 48,9 nM erreicht.

Die östrogenen Metaboliten Metabolit E und Bisphenol konnten ebenfalls in den Kulturmedien beider Zelllinien quantifiziert werden. Dabei wies das (*Z*)-Isomer von Metabolit E in 653-03 Zellen mit maximal 438 pM nach 24 Std. die höchsten Konzentrationen der östrogenen Tamoxifenmetaboliten auf, welche auf 350 pM nach 144 Std. sank. Im Zellmedium der 2D6 exprimierenden Zelllinie war die Konzentration von (*Z*)-Metabolit E nach 24 Std. um den Faktor 2 niedriger und sank bis zum Zeitpunkt 144 Std. weiter bis 29,5 pM (Abbildung 13 g). Gleiches konnte beim (*E*)-Isomer des Metabolits E beobachtet werden, wobei hier die absoluten Konzentrationen ca. 10 % des (*Z*)-Isomers entsprachen (Abbildung 13 h). Dies könnte auf eine CYP2D6-abhängige Hydroxylierung von Metabolit E zu weiterführenden Stoffwechselprodukten hindeuten. Die Glucuronide von Metabolit E wurden in Konzentrationen von bis zu 7 nM für das (*Z*)- und 2 nM für das (*E*)-Isomer gemessen (Abbildung 13 j, k). Dies entspricht einer 20-fach höheren Konzentration der Glucuronide relativ zum entsprechenden Aglykon. Zusätzlich verschob sich das Isomerenverhältnis von 10 % (*E*)-Isomer bei den Aglykons zu ca. 30 % (*E*)-Isomer bei den Glucuroniden, so dass hier ein Hinweis auf eine schnellere Glucuronidierung des (*E*)-Isomers gefunden wurde, wie sie auch bei den Umsetzungen der UGT-Supersomes™ gefunden wurde. Ferner konnte bei beiden Isomeren kein Unterschied zwischen den Zelllinien festgestellt werden. Im

Gegensatz zu Metabolit E war die Konzentration von Bisphenol bis zu 4-mal höher im Überstand der 653-03 2D6 Zellen als in der 653-03 Zelllinie (653-03: 26,6 nM, 653-03 2D6: 107,8 nM bei 144 Std.) (Abbildung 13 i). Auch die Bisphenol-Glucuronide waren in Anwesenheit der 2D6 exprimierenden Zellen 2,5-mal höher im Zellmedium konzentriert als im Überstand der 653-03 Linie. Vergleichbar zu den Glucuroniden der Metabolit E Isomere waren die Konzentrationen der Phase II Metaboliten von Bisphenol zwischen 30-50-mal höher als die der Aglykons (Abbildung 13 l). Dies weist auf die Glucuronidierung der östrogenen Metaboliten als wichtigen Exkretionsweg hin, wie er auch bei anderen Tamoxifenmetaboliten gefunden wurde (Lien et al. 1989; Sun et al. 2006; Zheng et al. 2007).

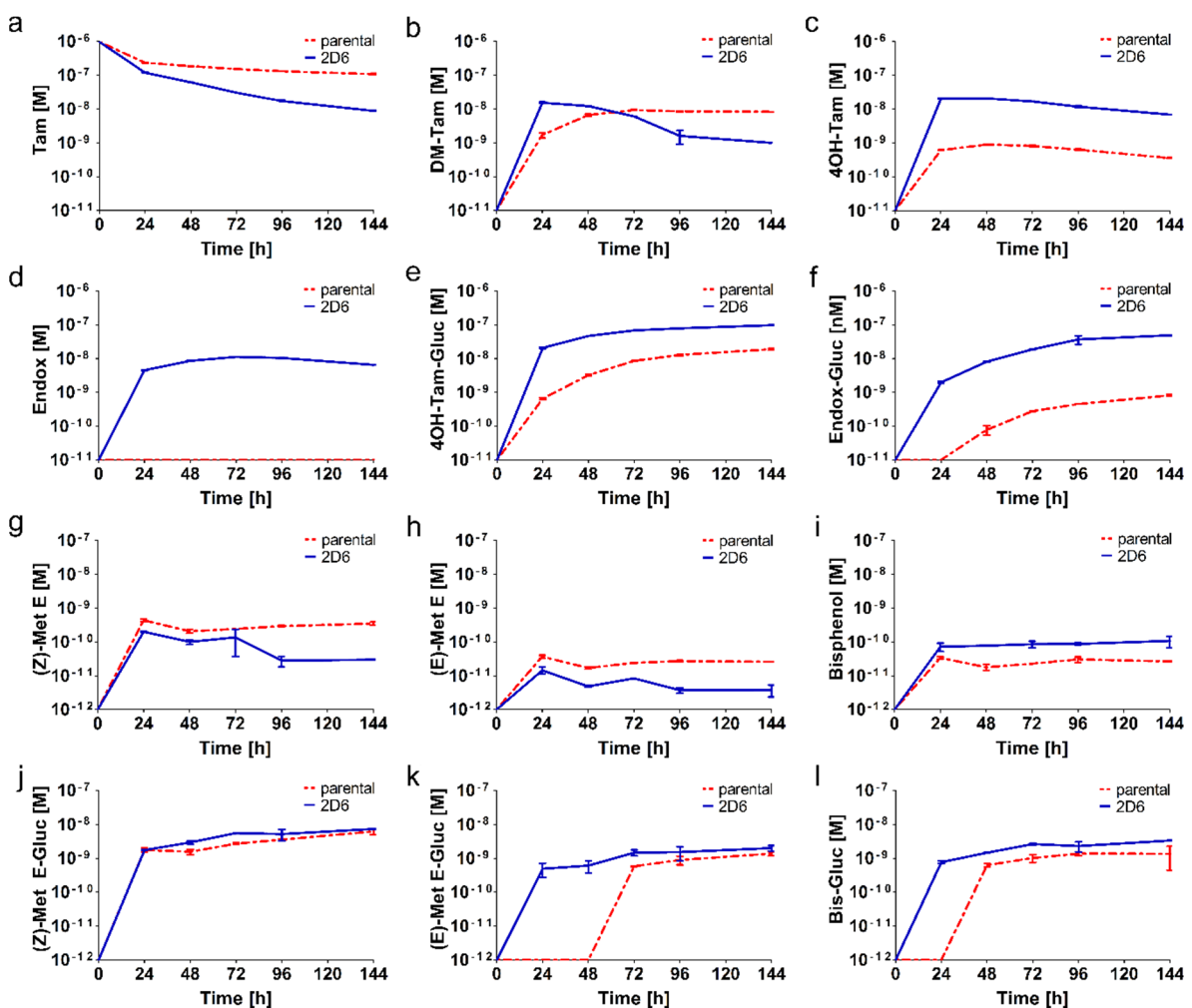


Abbildung 13 Zeitabhängiger Metabolismus von Tamoxifen in Hepatozyten über 144 Std.

Die upcyte® Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6 wurden mit $1 \mu\text{M}$ Tamoxifen über 6 Tage inkubiert. Dabei wurden alle 24 Std. Proben entnommen und folgende Metaboliten quantifiziert: Tamoxifen (Tam) (a), N-Desmethyltamoxifen (DM-Tam) (b), 4-Hydroxytamoxifen (4OH-Tam) (c), N-Desmethyl-4-hydroxytamoxifen (Endox) (d), Tamoxifen-4-O-Glucuronid (4OH-Tam-Gluc) (e), N-desmethyl-Tamoxifen-4-O-glucuronid (Endox-Gluc) (f), (Z)-Metabolit E ((Z)-Met E) (g), (E)-Metabolit E ((E)-Met E) (h), Bisphenol (i), (Z)-Metabolit E-Glucuronid ((Z)-Met E-Gluc) (j), (E)-Metabolit E-Glucuronid ((E)-Met E-Gluc) (k) und Bisphenol-Glucuronid (Bis-Gluc) (l). (Johanning et al. 2017)

3.4 Biologische Charakterisierung von Bisphenol und Metabolit E *in vitro*

Die östrogenen Tamoxifenmetaboliten Bisphenol und Metabolit E wurden hinsichtlich ihrer östrogenen Wirkung in MCF7-Zellen und ihrer Wirkung auf das Fremdstoff-metabolisierende System auf Ebene der mRNA-Expression und Enzymaktivität in Hepatozyten charakterisiert. Dadurch können Rückschlüsse auf die Pharmakodynamik und die möglichen Arzneimittelwechselwirkungen gezogen werden.

3.4.1 Östrogene Wirkung

Die östrogene Wirkung von Bisphenol und beider Isomere von Metabolit E wurde mit Hilfe von MCF7-Zellen, die stabil mit einem Östrogen-sensitiven Luciferase-Reporter gen transfiziert waren (MCF7-5xERE, 2.2.6.2.3), ermittelt. Dabei wurde die östrogene Wirkung der Reinsubstanzen und in Gegenwart von Endoxifen und Östradiol analysiert.

3.4.1.1 Östrogenes Potential der Reinsubstanzen

Um das östrogene Potential von reinem (*Z*)- und (*E*)-Metabolit E und Bisphenol zu ermitteln, wurden MCF7-5xERE-Zellen mit steigenden Konzentrationen der Reinsubstanzen behandelt (2.2.7.2). Als Positiv-Kontrolle diente dabei reines Östradiol.

Die Behandlung mit steigenden Konzentrationen von Östradiol führte zu einem sigmoidalen Anstieg des Luciferasesignals mit einem EC₅₀-Wert von 7,1 pM (95 % Konfidenzintervall, KI: 6,5-7,8 pM) (Abbildung 14, Estradiol). Die Behandlung der Zellen mit steigenden Konzentrationen der östrogenen Tamoxifenmetaboliten Metabolit E und Bisphenol führte ebenfalls zu sigmoidal ansteigenden Luciferasesignalen, die denen der Positiv-Kontrolle Östradiol entsprachen. Hier zeigte (*E*)-Metabolit E mit einem EC₅₀-Wert von 103 pM (KI: 97-109 pM) das stärkste östrogene Potential, gefolgt von Bisphenol (EC₅₀: 413 pM; KI: 389-438 pM) und (*Z*)-Metabolit E (EC₅₀: 1602 pM; KI: 1392-1845 pM) (Abbildung 14). Somit war die östrogene Wirkung von (*E*)-Metabolit E 4-mal potenter als Bisphenol und 15,5-mal stärker als die des entsprechenden (*Z*)-Isomers und es konnte gezeigt werden, dass die Tamoxifenmetaboliten Metabolit E und Bisphenol in ihrer agonistischen Wirkung am ER Östradiol entsprechen, wenn auch mit 14-, 68-, bzw. 225-fach geringerer Potenz.

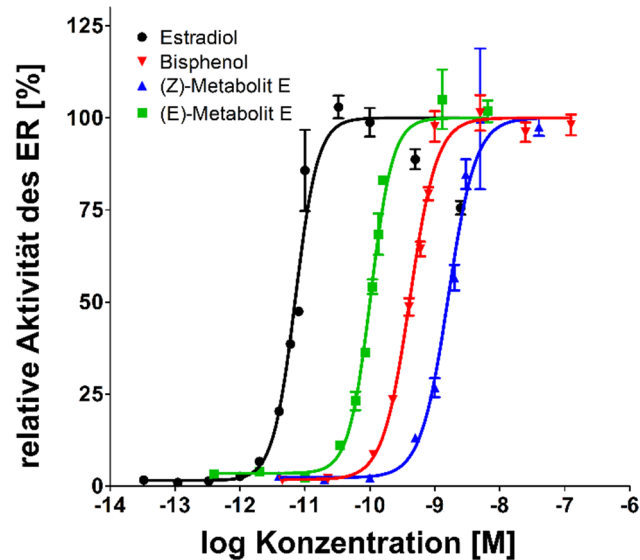


Abbildung 14 Aktivierung des Östrogen-Rezeptors durch Östradiol, (Z)- und (E)-Metabolit E und Bisphenol.

MCF7-5xERE Zellen, die stabil mit einem Östrogen-sensitiven Luciferase-Reportergen transfiziert waren, wurden mit steigenden Konzentrationen von Östradiol, (Z)- und (E)-Metabolit E und Bisphenol für 24 Std. inkubiert und anschließend mit Hilfe der Biolumineszenz-freisetzenden Oxidation von Luciferol der Luciferase die Aktivierung des Östrogenrezeptors bestimmt. (ER: Östrogenrezeptor)

3.4.1.2 Östrogenes Potential in Gegenwart von Endoxifen

Zur Abschätzung der Wechselwirkungen der beiden Metabolit E Isomere und Bisphenol mit anti-östrogenen Tamoxifenmetaboliten wurde dessen Wirkung am ER in Anwesenheit von physiologischen Konzentrationen von Endoxifen und Östradiol untersucht (2.2.7.2).

Zunächst wurde die anti-östrogene Wirkung von (Z)-Endoxifen in Gegenwart von Östradiol bestimmt. In Gegenwart von 25 pM Östradiol zeigte die Inkubation mit steigenden Konzentrationen von Endoxifen eine Hemmung der Luciferaseaktivität und somit der Aktivierung des ERs mit einem IC50-Wert von 0,23 nM (95 % KI: 0,18-0,28 nM).

Wurden die MCF7-5xERE-Zellen mit steigenden Konzentrationen von Metabolit E und Bisphenol zusammen mit 25 pM Östradiol und 35 nM Endoxifen inkubiert, so zeigte sich bei allen drei östrogenen Substanzen sigmoidale Aktivierungskurven wie sie bei den Reinsubstanzen bereits beobachtet wurden. Somit weisen Bisphenol und beide Isomere von Metabolit E auch in der Gegenwart des Östrogen-Antagonisten Endoxifen ein typisch östrogenes Aktivierungsmuster auf (Abbildung 15 a). Allerdings wurde in der Antagonisierung von Endoxifen durch die östrogenen Tamoxifenmetaboliten nur noch eine maximale Aktivierung des ER von bis zu 71,5-92,2 % verglichen mit der Aktivierung durch reines Östradiol erreicht. Des Weiteren waren die gemessenen EC50-Werte um bis zu den Faktor 10^3 wie folgt

stark erhöht: (*E*)-Metabolit E 31,6 nM (95 % KI: 22,1 – 43,8 nM); Bisphenol 261 nM (95 % KI: 184 – 369 nM); (*Z*)-Metabolit E 1691 nM (95 % KI: 1245 – 2296 nM).

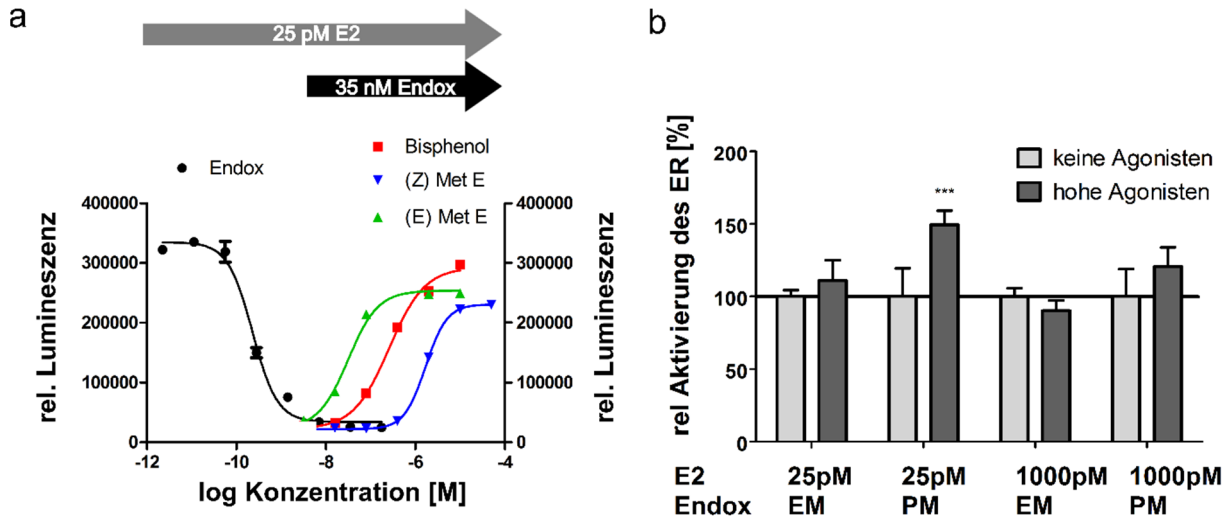


Abbildung 15 Aktivierung des Östrogenrezeptors durch Bisphenol, (*Z*)- und (*E*)-Metabolit E in Anwesenheit von Endoxifen und Östradiol.

MCF7-5xERE-Zellen wurden in Gegenwart von 25 pM Östradiol mit steigenden Konzentrationen Endoxifen und in Anwesenheit von 25 pM Östradiol und 35 nM Endoxifen mit steigenden Konzentrationen von (*Z*)- und (*E*)-Metabolit E und Bisphenol inkubiert (a). Des Weiteren wurden MCF7-5xERE-Zellen mit Östradiol (postmenopausal: 25 pM; prämenopausal: 1000 pM) und verschiedenen Konzentrationen von Endoxifen, welche den *in vivo* Konzentrationen bei niedriger und normaler CYP2D6-Aktivität entsprechen, (EM: 36,3 nM; PM: 9,8 nM) behandelt. Zusätzlich wurden Bisphenol und Metabolit E in Konzentrationen zu den Zellen geben, wie sie dem 90%-Perzentil der in prämenopausalen Patientinnen unter Tamoxifen gemessenen Konzentrationen entsprechen (hohe Agonisten) (b). Als Kontrolle diente dabei jeweils die Behandlung ohne Bisphenol und Metabolit E (keine Agonisten). Die Aktivität des Östrogenrezeptors wurde jeweils durch die Biolumineszenz-freisetzenden Oxidation von Luciferol der Luciferase quantifiziert. Signifikanzniveaus: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$ (E2: Östradiol; Endox: Endoxifen; Met E: Metabolit E; EM: *extensive metabolizer*, normaler Metabolisierer; PM: *poor metabolizer*, langsamer Metabolisierer, ER: Östrogenrezeptor)

Weiterführend wurde der Effekt einer hohen Konzentration östrogenen Metaboliten (3.5.1.1, 90 % Perzentil bei prämenopausalen Patientinnen: Bisphenol 342 pM, (*Z*)-Metabolit E 1551 pM, (*E*)-Metabolit E 453 pM), auf die relative Aktivierung des ERs in Anwesenheit von Östradiol und Endoxifen-Konzentrationen bei niedriger (PM, Median 9,8 nM) und normaler (EM, Median 36,3 nM) CYP2D6-Aktivität untersucht. Die Östradiol-Konzentrationen von 25 pM und 1000 pM wurden dabei verwendet, um eine post- bzw. prämenopausale Hormonsituation zu simulieren. Als Kontrolle diente die jeweilige Behandlung ohne Bisphenol und Metabolit E.

Die Anwesenheit von hohen Konzentrationen von Bisphenol und Metabolit E erhöhten die relative ER-Aktivität, gemessen als Stärke des Luciferasesignals des Reportergens, signifikant um den Faktor 1,5 in der postmenopausalen Situation bei niedriger Endoxifenkonzentration (PM, Abbildung 15 b). Jedoch

konnte keine Auswirkung auf die Aktivität des ERs bei Anwesenheit von hohen (EM) Endoxifenkonzentrationen oder in der prämenopausalen Östrogensimulation beobachtet werden.

3.4.2 Wirkung auf das ADME-System

Für die weitergehende Charakterisierung der östrogenen Tamoxifenmetaboliten Metabolit E und Bisphenol wurde deren Wirkung auf die mRNA-Expression von Phase I- und Phase II-Enzymen und Transportern des ADME-Systems, auf die Aktivität ausgewählter CYP-Enzyme sowie auf das Transkriptom von MCF7-Zellen analysiert.

3.4.2.1 Einfluss auf die mRNA Expression von ADME assoziierten Proteinen

Die Wirkung von Tamoxifen, den anti-östrogenen Metaboliten 4-OH-Tamoxifen, Endoxifen und Norendoxifen sowie den östrogenen Metaboliten Metabolit E und Bisphenol auf die Expression von ausgewählten Phase I- und Phase II-Enzymen und Transportern des ADME-Systems wurde in den upcyte® Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6 untersucht. Dafür wurden Gene ausgewählt, die eine elementare Rolle im Fremdstoffmetabolismus innehaben und zusätzlich nach Behandlung mit den prototypischen Modellsubstraten Rifampicin und Phenobarbital typische Expressionsmuster aufwiesen (3.2.2). Für die Auswertung der Genexpressionsmuster wurden die Gene gefiltert, die nach Behandlung in beiden Zelllinien signifikant reguliert wurden.

Die Expression von CYP3A4 wurde bis zu 5,6-fach durch Tamoxifen und 4-OH-Tamoxifen induziert (Abbildung 16). Weiterhin wurde CYP1A1 durch die Behandlung mit Endoxifen 2,3-fach stärker exprimiert als in den DMSO-behandelten Kontrollen. Im Gegensatz dazu war die Expression von CYP2A6 und dem Transportergen SLC10A1 nach Behandlung der Zellen mit 4-OH-Tamoxifen bis zu 2-fach erniedrigt (Abbildung 16). In Bezug auf die östrogenen Tamoxifenmetaboliten zeigte die Behandlung mit Bisphenol eine bis zu 4,5-fache Induktion der Expression der Gene für CYP3A4, CYP1A1 und den Effluxtransporter ABCG2. Dahingegen war die Expression der Transportproteine SLC10A1 und SLC22A7 nach Behandlung der Zellen mit Bisphenol bis zu 2,5-fach erniedrigt (Abbildung 16). Weiterführend induzierte das (Z)-Isomer des Metaboliten E die Expression von CYP1A1 um den Faktor 3,3 (Abbildung 16). Obwohl weitere der ausgewählten ADME-Gene eine Hochregulation nach der Behandlung der Zellen mit Metabolit E aufwiesen, deren Muster sich von den Genexpressions-Modulationen der anti-östrogenen Tamoxifenmetaboliten unterschied, waren die Daten nicht in beiden Zelllinien reproduzierbar.

Die auffallende Induktion der mRNA-Expression verschiedener CYP-Enzyme, insbesondere CYP3A4, durch die Behandlung mit unterschiedlichen Tamoxifenmetaboliten könnte Hinweise auf einen positiven Rückkopplungsmechanismus enthalten sowie ein Indiz für mögliche Arzneimittelwechselwirkungen in Folge einer Tamoxifenbehandlung darstellen.

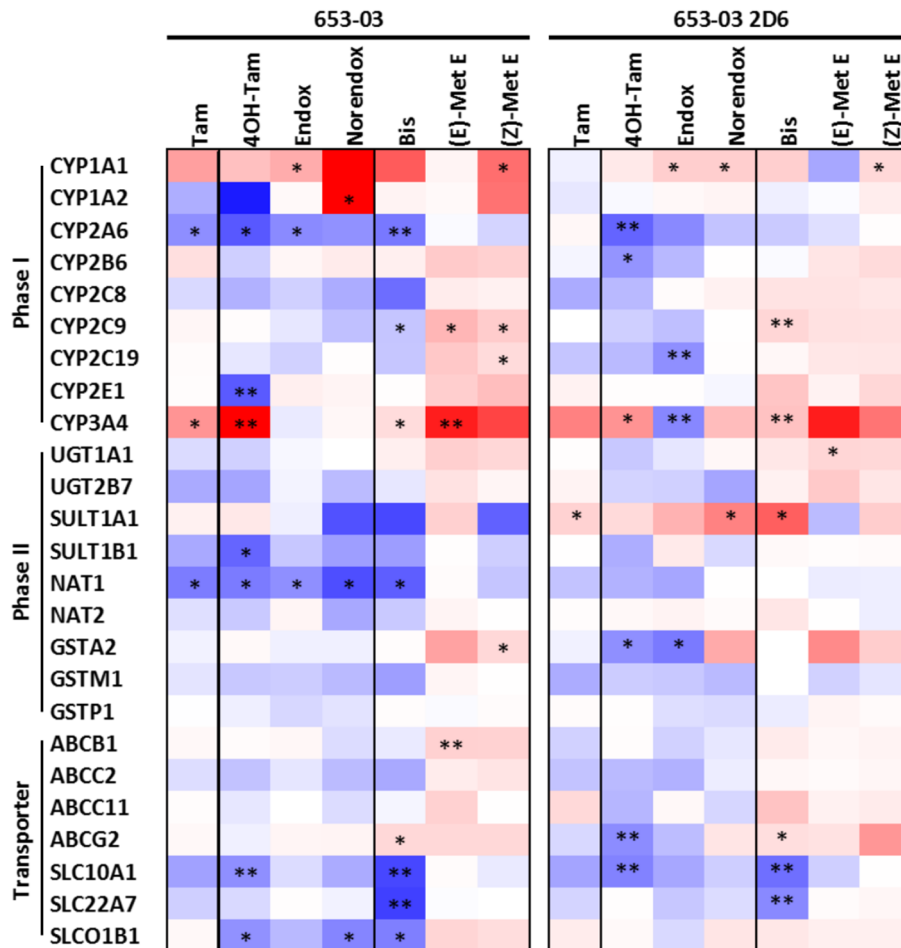


Abbildung 16 Modulation der Expression ADME-assoziiierter Gene durch Tamoxifen sowie anti-östrogenen und östrogenen Metaboliten in Hepatozyten.

Die Wirkung von Tamoxifen (Tam), den anti-östrogenen Metaboliten 4-Hydroxytamoxifen (4OH-Tam), N-Desmethyl-4-hydroxytamoxifen (Endox) und N-Didesmethyl-4-hydroxytamoxifen (Norendox) sowie der östrogenen Metaboliten Bisphenol (Bis) und beiden Isomeren von Metabolit E (Met E) auf Phase I und Phase II-Enzyme und Transporter des ADME-Systems wurde anhand der Expression von 25 Genen via quantitativer PCR in den upcyte® Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6 untersucht. Das Diagramm der quantitativen PCR zeigt die Expression bezogen auf die DMSO-Kontrolle von 25 Genen, die mit Fremdstoffmetabolismus und -Transport assoziiert sind. Die Farbkodierung ist wie folgt: maximale Intensität von Rot: 5-fache Hochregulation; maximale Intensität von Blau: 5-fache erniedrigte Regulation; Weiß: keine Änderung. Signifikanzniveaus: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$. (Johanning et al. 2017)

3.4.2.2 Einfluss der Tamoxifenmetaboliten auf die Aktivität von CYP-Enzymen

Der Einfluss von Tamoxifen, der anti-östrogenen sowie östrogenen Metaboliten (je 5 μM) und Östradiol (500 nM) auf die Aktivität von ausgewählten CYP-Enzymen wurde in den upcyte[®] Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6 analysiert. Dabei wurden Enzymaktivitäten, die mindestens um den Faktor 1,5 induziert oder gehemmt waren, als biologisch relevant betrachtet.

Tamoxifen und 4-OH-Tamoxifen induzierten die CYP3A4-Aktivität signifikant um den Faktor 1,8 bis 2,1 (Abbildung 17), wie es auch auf mRNA-Ebene beobachtet wurde (vgl. Abbildung 16). Im Gegensatz dazu wurde die Enzymaktivität der Isoenzyme der CYP2C-Familie stark durch Tamoxifen und die anti-östrogenen Tamoxifenmetaboliten gehemmt. Insbesondere inhibierten 4-OH-Tamoxifen und Endoxifen die Aktivität von CYP2C8 bis zu 90 %, während Tamoxifen und Norendoxifen die Enzymaktivität um 50-70 % reduzierten. Das Isoenzym CYP2C9 wurde durch Endoxifen um bis zu 70 % und durch Norendoxifen nahezu vollständig (90-97 %) gehemmt. Die Aktivität des Isoenzym CYP2C19 wurde ausschließlich durch Norendoxifen um 74 % gehemmt (Abbildung 17), welches bereits in einer früheren Studie von Liu *et al.* gezeigt wurde (Liu et al. 2013). Dies wird in den IC₅₀-Konzentrationen, welche in humanen Lebermikrosomen ermittelt wurden, widerspiegelt. Hier zeigten Endoxifen und Norendoxifen IC₅₀-Konzentrationen von 8,1 und 2,4 μM für die Inhibition von CYP2C8, wohingegen 4-OH-Tamoxifen nur eine geringe Inhibition aufwies. CYP2C9 wurde stark von Norendoxifen mit einer IC₅₀-Konzentration von 0,21 μM und schwach von Endoxifen inhibiert. Wie bereits im Zellsystem beobachtet wurde, inhibierte ausschließlich Norendoxifen die Aktivität von CYP2C19 mit einer IC₅₀-Konzentration von 0,32 μM .

Tabelle 29 IC₅₀ Konzentrationen der hydroxylierten Tamoxifenmetaboliten und EC₅₀-Konzentrationen von Bisphenol und Metabolit E in humanen Lebermikrosomen.

CYP Isoenzym	IC ₅₀ [μM]			EC ₅₀ [nM]		
	4-OH-Tam	Endox	Norendox	Bis	(E)-Met E	(Z)-Met E
CYP1A2	n.e.	n.e.	n.e.	518	-	-
CYP2B6	n.e.	n.e.	n.e.	187	-	-
CYP2C8	> 10	8,1	2,4	400	-	-
CYP2C9	-	>10	0,21	488	-	-
CYP2C19	-	-	0,32	30,5	-	-
CYP3A4	n.e.	n.e.	n.e.	178	277	308

n.e.: nicht ermittelt; 4-OH-Tam: 4-Hydroxytamoxifen; Endox: N-Desmethyl-4-hydroxytamoxifen; Norendox: N-Didesmethyl-4-hydroxytamoxifen; Bis: Bisphenol; Met E: Metabolit E; Johanning et al. 2017

Im Kontrast zur hemmenden Wirkung der anti-östrogenen Tamoxifenmetaboliten führte die Behandlung mit Bisphenol zu einer starken Induktion der Aktivität aller getesteter CYP-Isoenzyme um den Faktor 2 bis 3,8 wie folgt (steigende Induktion): CYP1A2, 2C19, 2C9, 2B6, 3A4 und 2C8 (Abbildung 17). Dabei wurde die niedrigste EC₅₀-Konzentration für die Induktion von CYP2C19 (30,5 nM) gefunden, gefolgt von CYP3A4 (178 nM) und CYP2B6 (187 nM). Die weiteren CYP-Enzyme wiesen EC₅₀-Konzentrationen von über 400 nM auf (Tabelle 29). Beide Isomere des Metaboliten E wirkten ebenfalls als schwache Induktoren. Dabei induzierte (*E*)-Metabolit E CYP2C9 und 3A4 bis zu 1,7-fach und das (*Z*)-Isomer erhöhte die Enzymaktivität von CYP3A4 um den Faktor 1,5 (Abbildung 17). Für die Induktion von CYP3A4 wiesen beide Isomere von Metabolit E ähnliche EC₅₀-Konzentrationen von 308 (*Z*-Metabolit E) und 277 nM (*E*-Metabolit E) auf (Tabelle 29). Die Behandlung beider Zelllinien mit Östradiol hatte keinen Einfluss auf die gemessene Aktivität der ausgewählten CYP-Enzyme (Abbildung 17).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass anti-östrogene wie auch östrogene Metaboliten die Aktivität von CYP-Enzymen stark beeinflussen, so dass eine Auswirkung auf die Pharmakokinetik von Tamoxifen selbst sowie auf den Metabolismus anderer Medikamente, die zeitgleich mit Tamoxifen eingenommen werden, naheliegt.

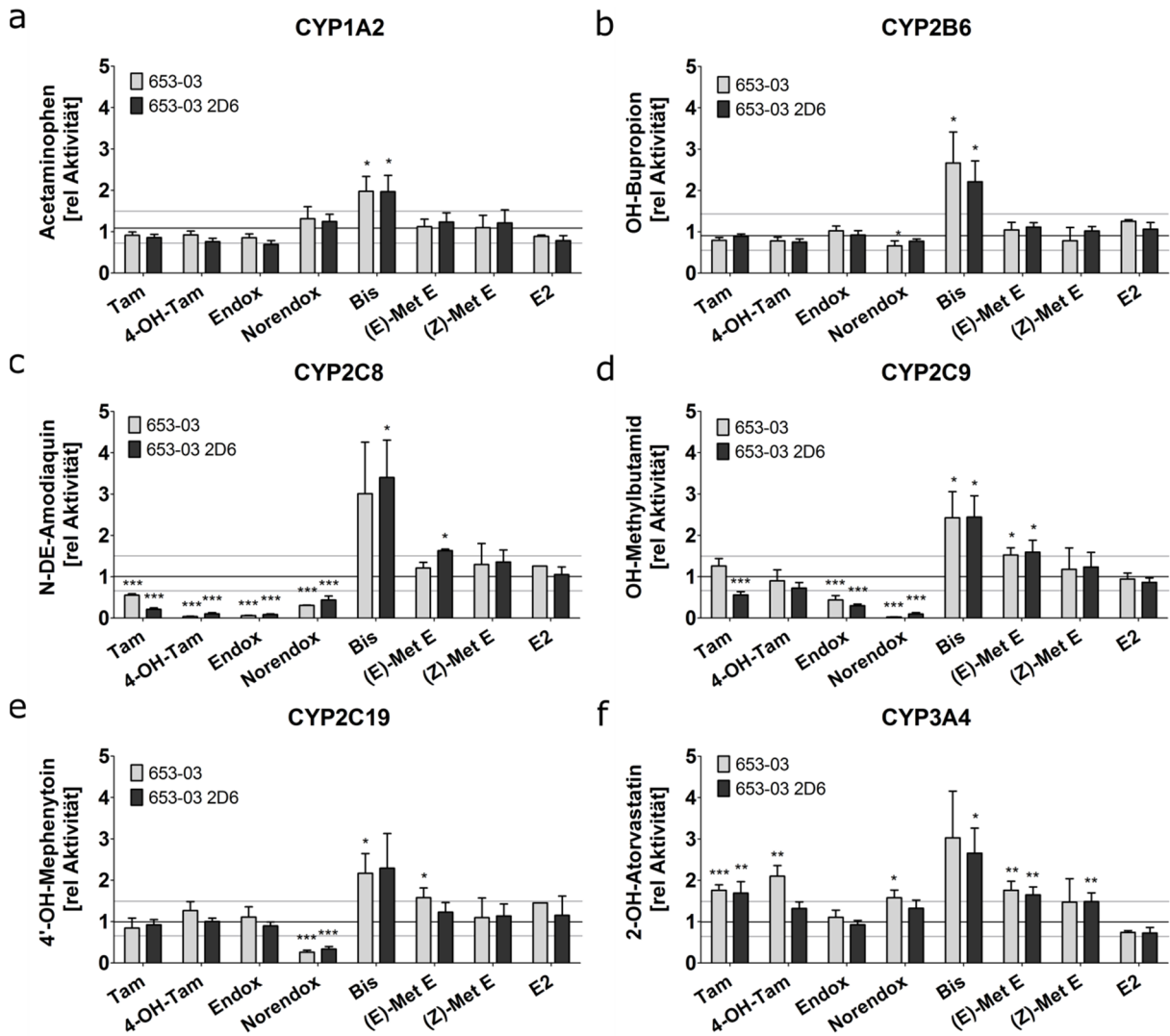


Abbildung 17 Modulation der CYP-Enzymaktivität nach Behandlung mit Tamoxifen, anti-östrogenen und östrogenen Metaboliten in Hepatozyten.

Die upcyte® Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6 wurden für 72 Std. mit 5 μ M Tamoxifen (Tam), 4-Hydroxytamoxifen (4OH-Tam), N-Desmethyl-4-hydroxytamoxifen (Endox), N-Didesmethyl-4-hydroxytamoxifen (Norendox), Bisphenol (Bis), beiden Isomeren von Metabolit E (Met E) sowie 500 nM Östradiol (E2) behandelt. Anschließend wurde die CYP-Aktivität ausgewählter Isoenzyme mit Hilfe von Isoenzym-spezifischen Modellsubstraten (1A2: Phenacetin; 2B6: Bupropion; 2C8: Amodiaquin; 2C9: Tolbutamid; 2C19: Mephenytoin; 2D6: Propafenon; 3A4: Atorvastatin) inkubiert und die Umsetzung der Substrate via HPLC-MS/MS quantifiziert. Die Daten sind relativ zur DMSO-behandelten Kontrolle dargestellt. Signifikanzniveaus: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$. Johänning et al. 2017

3.4.3 Einfluss auf das Transkriptom von MCF7-Zellen

Für die weiterführende Untersuchung der Pharmakodynamik von Metabolit E und Bisphenol wurde eine Transkriptomanalyse von MCF7-Zellen durchgeführt, die mit je (Z)- und (E)-Metabolit E, Bisphenol, Endoxifen und Östradiol behandelt wurden.

Das Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse zeigt dabei, dass das mRNA-Expressionsmuster der Zellen, die mit den östrogenen Tamoxifenmetaboliten behandelt wurden, stark unterschiedlich zu den Expressionsmustern der mit Endoxifen behandelten Zellen und der Kontrolle ist. Weitergehend ähnelt die Genexpression nach Behandlung mit Metabolit E und Bisphenol der von Östradiol, wobei beide Isomere von Metabolit E zusammen gruppieren und Bisphenol eine eigene Gruppe bildet (Abbildung 18 a).

Diese Behandlungseffekte wurden durch die Analyse der Gen-Anreicherung verschiedener Signal- und Metabolismuswege bestätigt. Gensets, welche frühe und späte Östrogen-Resonanz darstellen sowie selektierte KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) Signalwege und Gen-Ontologien biologischer Prozesse zeigten identische Expressionsmuster nach der Behandlung der Zellen mit Östradiol und der östrogenen Tamoxifenmetaboliten. Dabei wurden Gene, welche mit dem Zellzyklus, Transkription, DNA-Replikation, Mitose, Proliferation und Nukleotidmetabolismus assoziiert sind, verstärkt exprimiert (Abbildung 18 b, c, d). Obwohl die Gen-Anreicherung leichte Unterschiede bei der Gen-Aktivierung durch Bisphenol zeigte, konnte kein spezifischer Signal- oder Metabolismusweg identifiziert werden, der diese Unterschiede erklärt.

3.5 Charakterisierung von Bisphenol und Metabolit E *in vivo*

Für die weitergehende Charakterisierung der östrogenen Tamoxifenmetaboliten Bisphenol und Metabolit E hinsichtlich der Plasmakonzentrationen *in vivo*, der Pharmakodynamik und der Auswirkung auf den Therapieverlauf wurden die Metaboliten in prä- und postmenopausalen Brustkrebspatientinnen mit Hilfe der eigens etablierten und validierten Analytik-Methode (2.2.1 und 3.1) quantifiziert und anschließend mit den Plasmakonzentrationen möglicher metabolischer Vorläufer sowie genetischen und klinischen Markern korreliert.

3.5.1 Metabolit E und Bisphenol in prämenopausalen Frauen unter Tamoxifen

3.5.1.1 Plasmakonzentrationen von Tamoxifen und Tamoxifenmetaboliten

Die Plasmakonzentrationen von Bisphenol und Metabolit E wurden mit Hilfe der in 2.2.1 beschriebenen Methode gemessen und sind in Abbildung 19 dargestellt. Dabei wies (*Z*)-Metabolit E die höchste Konzentration der östrogenen Metaboliten mit einer Mediankonzentration von 889 pM (Spanne 128 - 2484 pM) auf. Für das (*E*)-Isomer wurde eine Mediankonzentration von 213 pM (Spanne 15,5 - 1029 pM) und für Bisphenol eine Mediankonzentration von 187 pM (Spanne 13,1 - 832 pM) beobachtet. Damit waren beide Isomere von Metabolit E um ca. den Faktor 1000 niedriger konzentriert als ihre metabolischen Vorläufer Tamoxifen (2,7 - 943 nM; Median 298 nM), DM-Tamoxifen (6,8 - 1948 nM; Median 586 nM) und DDM-Tamoxifen (1,3 - 325 nM; Median 77,1 nM). Bisphenol wies eine bis zu 120-fach niedrigere Konzentration auf als seine metabolischen Vorläufer 4-OH-Tamoxifen (0,76 - 18,7 nM; Median 5,7 nM), Endoxifen (1,1 - 86,1 nM, Median 21,9 nM) und Norendoxifen (0,66 - 9,4 nM, Median 3,3 nM).

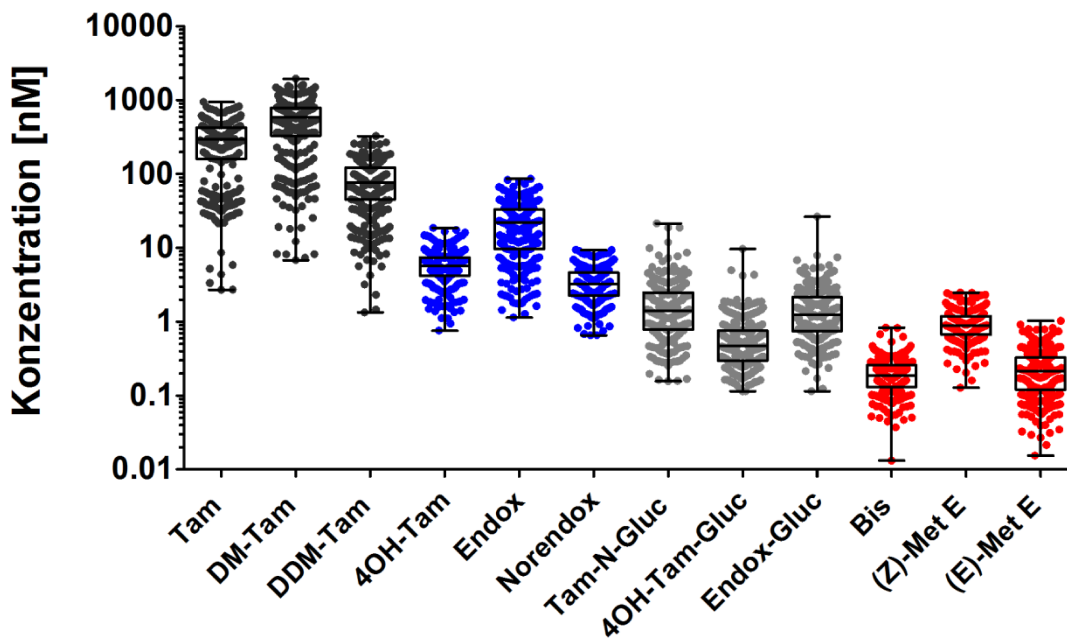


Abbildung 19 Plasmakonzentrationen von Tamoxifen und dessen Metaboliten in prämenopausalen Frauen der POSH-Studie.

Farbkodierung: Schwarz: Tamoxifen und demethylierte Metaboliten; blau: anti-östrogene Metaboliten; grau: Glucuronide; rot: östrogene Metaboliten

3.5.1.2 Korrelation von Bisphenol und Metabolit E mit nicht-östrogenen Tamoxifenmetaboliten

Um mögliche metabolische Abhängigkeiten zwischen Bisphenol und Metabolit E zu Tamoxifen und weiteren Tamoxifenmetaboliten anhand der gemessenen *in vivo* Konzentrationen zu untersuchen, wurden der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient (R) der jeweiligen Paare ermittelt (Tabelle 30). Dabei wies (Z)-Metabolit E mit allen metabolischen Vorläufern, bis auf Tamoxifen-N-Oxid, eine hohe Korrelation mit $R \geq 0,5$ auf. Die stärkste Korrelation wurde zu DM-Tamoxifen mit $R = 0,68$ beobachtet, gefolgt von DDM-Tamoxifen ($R = 0,59$) und Tamoxifen ($R = 0,57$). Aufgrund des höchsten Rangkorrelationskoeffizienten zu DM-Tamoxifen sowie dessen hoher Plasmakonzentration (Abbildung 19) ist es wahrscheinlich, dass DM-Tamoxifen einer der wichtigsten metabolischen Vorläufer von (Z)-Metabolit E ist.

Das (E)-Isomer von Metabolit E hingegen wies zu Tamoxifen und den demethylierten Metaboliten DM- und DDM-Tamoxifen geringere Rangkorrelationskoeffizienten als sein (Z)-Isomer von maximal 0,44 auf. Dabei wurde wiederum die stärkste Korrelation mit DM-Tamoxifen erreicht. Des Weiteren konnte eine starke Korrelation zwischen beiden Isomeren von $R = 0,5$ festgestellt werden.

Bisphenol wies die stärkste Korrelation mit dem anti-östrogenen Tamoxifenmetaboliten Norendoxifen auf ($R = 0,63$), gefolgt von (*Z*)-Metabolit E und 4-OH-Tamoxifen (beide $R = 0,57$).

Tabelle 30 Korrelation von Bisphenol und Metabolit E mit Tamoxifenmetaboliten in prämenopausalen Frauen der POSH-Studie (N=306)

	Bis		<i>(Z)</i> -Met E		<i>(E)</i> -Met E	
	R	P	R	P	R	p
Tam			0,576	2,12E-28	0,398	4,63E-13
Tam-NO			0,467	5,49E-18	0,264	2,87E-06
DM-Tam			0,684	1,75E-43	0,444	3,17E-16
DDM-Tam			0,593	1,90E-30	0,415	3,71E-14
Endox	0,469	3,90E-18				
4OH-Tam	0,565	3,34E-27				
Norendox	0,630	2,82E-35				
Bis	-	-	-	-	-	-
<i>(Z)</i>-Met E	0,569	1,21E-27	-	-	0,502	6,25E-21
<i>(E)</i>-Met E	0,331	3,10E-09	0,502	6,25E-21	-	-

Bis: Bisphenol; Met E: Metabolit E; Tam: Tamoxifen; Tam-NO: Tamoxifen-N-Oxid; DM-Tam: Desmethyltamoxifen; DDM-Tam: Didesmethyltamoxifen; Endox: Endoxifen; 4OH-Tam: 4-Hydroxytamoxifen; Norendox: Norendoxifen; R: Spearmans Rangkorrelationskoeffizient

3.5.1.3 Korrelation von Bisphenol und Metabolit E mit genetischen Markern

Zur Identifizierung eines Einflusses von pharmakogenetisch relevanten Genpolymorphismen von CYP-Enzymen, welche in vorhergehenden *in vitro* Experimenten (3.3.2) die höchste Umsatzrate zu den östrogenen Metaboliten Bisphenol und Metabolit E aufwiesen, wurden die wichtigsten Polymorphismen auf eine Assoziation mit der metabolischen Ratio (MR) von Bisphenol und Metabolit E und deren möglichen Vorläufersubstanzen untersucht. Dazu wurden die Plasmakonzentrationen sowie die metabolischen Verhältnisse mittels des Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten und dem Kruskal-Wallis-Test analysiert (2.2.14.2).

So zeigte der Polymorphismus *2 des CYP-Enzyms 2C19, welcher eine nicht-funktionale Variante des Enzyms kodiert (Bertilsson 1995; Desta et al. 2002), einen signifikanten Einfluss auf die MR von Bisphenol zu jeweils beiden Isomeren des Metaboliten E. Die MR nahm mit der Anzahl varianter Allele bei heterozygoten und homozygoten varianten Genotypen ab und impliziert somit eine pharmakogenetisch reduzierte Bildung von Bisphenol bei Patientinnen mit reduzierter CYP2C19

Enzymaktivität (Abbildung 20 a, b). Dies stimmt mit *in vitro* Daten der Supersome™-Experimente überein, in denen CYP2C19, neben anderen CYP-Enzymen, eine der höchsten Umsatzraten von Metabolit E zu Bisphenol aufwies (3.3.2). Weiterhin zeigte der CYP2D6-Phänotyp einen Einfluss auf die MR von Bisphenol zu (Z)-Metabolit E. Hier nahm die MR mit zunehmender Enzym-Aktivität signifikant zu (Abbildung 20 c).

Der Polymorphismus *22 des CYP-Enzyms 3A4, welcher mit einer erniedrigten Proteinexpression in der Leber und einer verringerten Enzym-Aktivität assoziiert ist (Elens et al. 2013; Okubo et al. 2013), führte zu einer verringerten MR von (Z)-Metabolit E zu Tamoxifen und DM-Tamoxifen (Abbildung 20 d, e). Als Folge dessen war die Konzentration von (Z)-Metabolit E in Gegenwart einer geringeren Enzymaktivität ebenfalls erniedrigt. Diese Beobachtung deckt sich mit den *in vitro* Daten der Supersome™-Experimente, welche eine hohe Bildungsrate von Tamoxifen und DM-Tamoxifen durch CYP3A4 zu (Z)-Metabolit E zeigen (3.3.2). Der Polymorphismus *3 von CYP3A5 zeigte keinen Einfluss auf die MR von (Z)-Metabolit E zu seinen metabolischen Vorläufern.

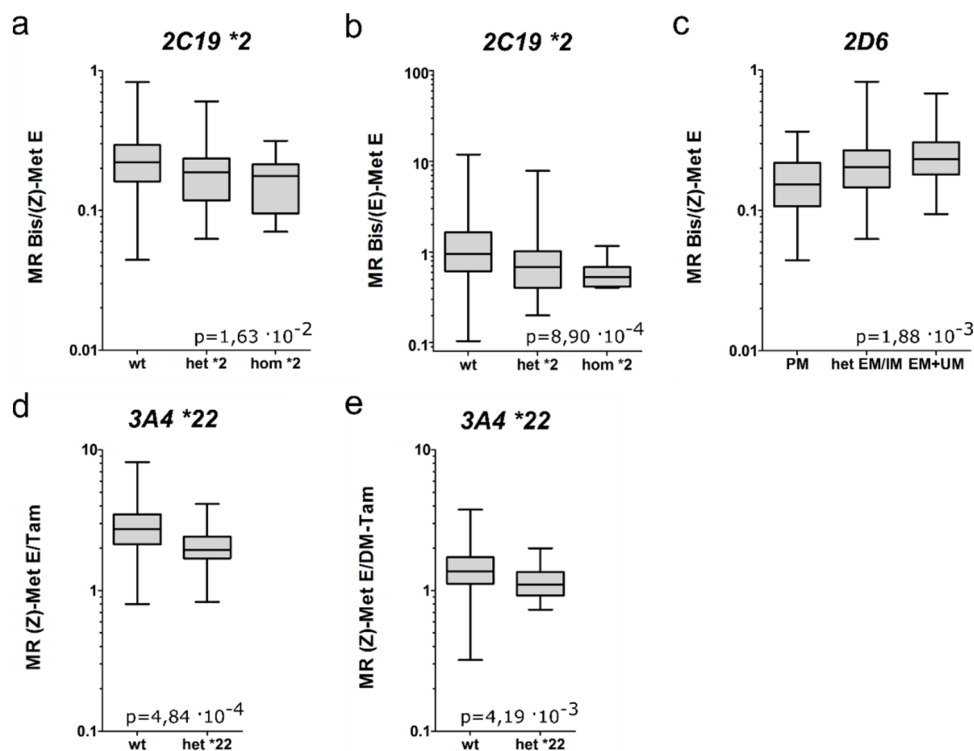


Abbildung 20 Einfluss der Polymorphismen von CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 auf das metabolische Verhältnis von Bisphenol und (Z)-Metabolit E zu metabolischen Vorläufern in prämenopausalen Frauen der POSH-Studie.

Der Polymorphismus *2 des Enzyms CYP2C19 (*rs4244285*) wurde hinsichtlich seines Einflusses auf das metabolische Verhältnis von Bisphenol zu (Z)-Metabolit E (a) und (E)-Metabolit E (b) getestet (N=303; wt=222; het *2=71; hom *2=10). Der Einfluss der Aktivität von CYP2D6 wurde auf (N=225) das Verhältnis von Bisphenol zu (Z)-Metabolit E (c) getestet. Dafür wurden drei Phänotypgruppen analysiert: PM (*poor metabolizer*; N=24), heterozygot EM/IM (*extensive/ intermediate metabolizer*; N=181) und EM/UM (*extensive/ultrarapid metabolizer*; N=24). Der CYP3A4*22 Polymorphismus wurde als Wildtyp und als heterozygoter Genotyp gefunden (N=255; wt=226; het*22=29) und zeigte einen Einfluss auf das metabolische Verhältnis von (Z)-

Metabolit E zu Tamoxifen (d) und DM-Tamoxifen (e). Die p-Werte wurden nach dem Spearman Rangkorrelationskoeffizienten berechnet und nach Benjamini-Hochberg auf multiples Tseten adjustiert. (MR: *metabolic ratio*, metabolisches Verhältnis; wt: Wildtyp; het: heterozygot; hom: homozygot)

3.5.1.4 Assoziation von Bisphenol und Metabolit E mit klinischen Parametern

Der Einfluss der östrogenen Tamoxifenmetaboliten Bisphenol und Metabolit E auf klinische Endpunkte in prämenopausalen Frauen wurde univariat mittels des Kaplan-Meier-Schätzers und multivariat mit Hilfe der Cox-Regression analysiert. Dabei wurden die rezidivfreie Zeit (*time to relapse*) und das rezidivfreie Überleben (RFÜ) als klinische Endpunkte gewählt. Die Patientinnen wurden für diese Analyse auf Basis der Quartile der getesteten Plasmakonzentrationen und metabolischen Verhältnisse in drei Gruppen eingeteilt: unteres Quartil (Q1; $\leq 25\%$), Interquartil (Q2-3; 25-75%), oberes Quartil (Q4; $\geq 75\%$). Mittels dieser Einteilung wurde der Therapieverlauf von Patientinnen mit niedrigen, mittleren und hohen Konzentrationen von Bisphenol und Metabolit E verglichen.

Für die multivariate Cox-Regression wurde vorab der Effekt verschiedener Einflussgrößen, die in Tabelle 31 aufgelistet sind, auf die Endpunktanalyse untersucht. Dadurch wurden mit dem klinischen Verlauf signifikant assoziierte Parameter ermittelt und numerisch (Alter der Patientinnen, Differenzierungsgrad und Tumorgröße) oder kategorial (Lymphknotenbefall, metabolische Ratio von DM-Tam/Endox (Saladores et al. 2015), Anwendung einer Chemotherapie) in die Regressionsanalyse miteinbezogen.

Tabelle 31 Univariater Effekt der klinischen Parameter auf die Endpunktanalysen „rezidivfreie Zeit“ (*time to relapse*) und „rezidivfreies Überleben“ bei prämenopausalen Frauen der POSH-Studie.

Parameter		Time to relapse								rezidivfreies Überleben		
		Gruppe	p	HR	95% Konfidenzintervall		p	HR	95% Konfidenzintervall			
					Untere	Obere			Untere	Obere		
Alter	num		1,01E-02	0,93	0,88	0,98	4,07E-02	0,95	0,90	1,00		
Differenzierungsgrad	num		4,96E-02	1,45	1,00	2,09	2,32E-02	1,49	1,06	2,09		
Lymphknotenbefall	kat		2,96E-03	2,10	1,29	3,42	6,96E-04	2,20	1,40	3,48		
Chemotherapie	kat		4,20E-02	1,94	1,02	3,68	2,99E-02	1,92	1,07	3,46		
Tumorgröße	kat	1	4,26E-01				5,74E-02					
		2	4,50E-01	1,20	0,75	1,94	6,81E-02	1,51	0,97	2,36		
		3	2,17E-01	1,73	0,72	4,13	4,00E-02	2,24	1,04	4,84		
Tumorgröße	num		9,48E-02	1,01	1,00	1,03	1,53E-02	1,02	1,00	1,03		
CYP2D6 Phänotyp	num		3,99E-01	1,17	0,81	1,70	1,02E-01	1,33	0,95	1,86		
CYP2D6 Phänotyp	kat	1	3,13E-01				1,85E-01					
		2	1,49E-01	1,45	0,88	2,40	6,98E-02	1,55	0,96	2,50		
		3	9,58E-01	1,03	0,39	2,71	3,03E-01	1,52	0,68	3,38		
Endoxifen (Quartile)	num		5,79E-01	0,95	0,78	1,15	1,84E-01	0,89	0,74	1,06		
Endoxifen (Quartile)	kat	1	4,07E-01				3,43E-01					
		2	7,67E-01	0,91	0,48	1,71	4,00E-01	0,78	0,45	1,38		
		3	4,39E-01	1,27	0,69	2,34	9,52E-01	0,98	0,56	1,72		
		4	3,57E-01	0,74	0,39	1,41	1,02E-01	0,61	0,34	1,10		
MR DM-Tam/Endox	num		2,64E-01	1,26	0,84	1,88	2,07E-02	1,54	1,07	2,21		
MR DM-Tam/Endox	kat	1	5,36E-01				1,73E-02					
		2	3,20E-01	1,26	0,80	1,97	1,63E-01	1,35	0,89	2,06		
		3	5,19E-01	1,60	0,39	6,61	6,49E-03	3,62	1,43	9,13		

HR: Hazard Ratio; kat: kategorial; num: numerisch; MR: *metabolic ratio* (metabolisches Verhältnis); DM-Tam: N-Desmethyltamoxifen; Endox: Endoxifen (N-Desmethyl-4-hydroxytamoxifen)

3.5.1.4.1 *Time to relapse*

Für den klinischen Endpunkt des *time to relapse* wurde der Einfluss der Plasmakonzentrationen von Bisphenol und beider Isomere von Metabolit E sowie die metabolischen Verhältnisse zu Vorläufersubstanzen in Hinblick auf Mammakarzinom-Rezidive (ipsilaterales Rezidiv) bzw. kontralaterale Zweittumore oder Fern-Metastasen untersucht.

So war *time to relapse* von Patientinnen, die eine hohe MR von (*E*)-Metabolit E zu Tamoxifen (Quartil 4, Q4) aufwiesen, signifikant verkürzt im Vergleich zu Patientinnen von Quartil 1 (Q1, Median 10,75 Jahre; $\chi^2=9,65$, $p=0,002$). Ebenfalls war *time to relapse* der Patientinnen in Q4 gegenüber denen im Interquartil (Q2-3; Median 9,59 Jahre) signifikant niedriger ($\chi^2=4,38$, $p=0,036$), während die Erniedrigung des *time to relapse* zwischen den Patientinnengruppen in Q2-3 gegenüber Q1 nur als Trend beobachtet werden konnte ($\chi^2=3,66$, $p=0,056$) (Abbildung 21 a). Diese Assoziation wurde multivariat mit Hilfe der Cox-Regressionsanalyse bestätigt: Wenn die Patientinnengruppe in Q1 als Referenzwert gesetzt wurde, stieg das Risiko (*hazard ratio*; HR) auf 1,769 (95 % KI: 0,896-3,494; $p=0,1$) bei Patientinnen in Q2-3, und mit steigender MR von (*E*)-Metabolit E zu Tamoxifen (Q4) signifikant auf eine HR von 2,813 (95 % KI: 1,372-5,767; $p=0,005$). Dieser Einfluss auf *time to relapse* prämenopausaler Brustkrebspatientinnen der POSH-Studie konnte ebenfalls beobachtet werden, wenn die Patientinnen aufgrund der MR von (*E*)-Metabolit E zu DM-Tamoxifen sowie DDM-Tamoxifen in Gruppen eingeteilt wurden: Hier zeigten Patientinnen in Q4 signifikant eine verringerte rezidivfreie Zeit als Patientinnen in Q1 (MR (*E*)-Metabolit E/DM-Tamoxifen: $\chi^2=7,08$, $p=0,008$; MR (*E*)-Metabolit E/DDM-Tamoxifen: $\chi^2=4,47$, $p=0,035$) (Abbildung 21 b, c). Allerdings war der Effekt weniger stark ausgeprägt im Vergleich zur MR von (*E*)-Metabolit E zu Tamoxifen. Der Einfluss der MR von (*E*)-Metabolit E zu DM-Tamoxifen auf das Risiko des Wiederauftretens von Brustkrebs konnte anhand der Cox-Regressionsanalyse bestätigt werden. Hier stieg die HR auf 2,314 (95 % KI: 1,155-4,637; $p=0,018$) bei Patientinnen in Q4 im Vergleich zu Patientinnen in Q1. Patientinnen im Interquartil zeigten kein signifikant erhöhtes Risiko (HR=1,688; 95 % KI: 0,881-3,237; $p=0,115$). Im Gegensatz zu den MRs von (*E*)-Metabolit E zu Tamoxifen und DM-Tamoxifen konnte der Einfluss des Verhältnisses zu DDM-Tamoxifen nicht durch die Cox-Regressionsanalyse bestätigt werden (Q2-3: HR=1,344, 95 % KI: 0,727-2,484, $p=0,345$; Q4: HR=1,694, 95 % KI: 0,869-3,303, $p=0,122$).

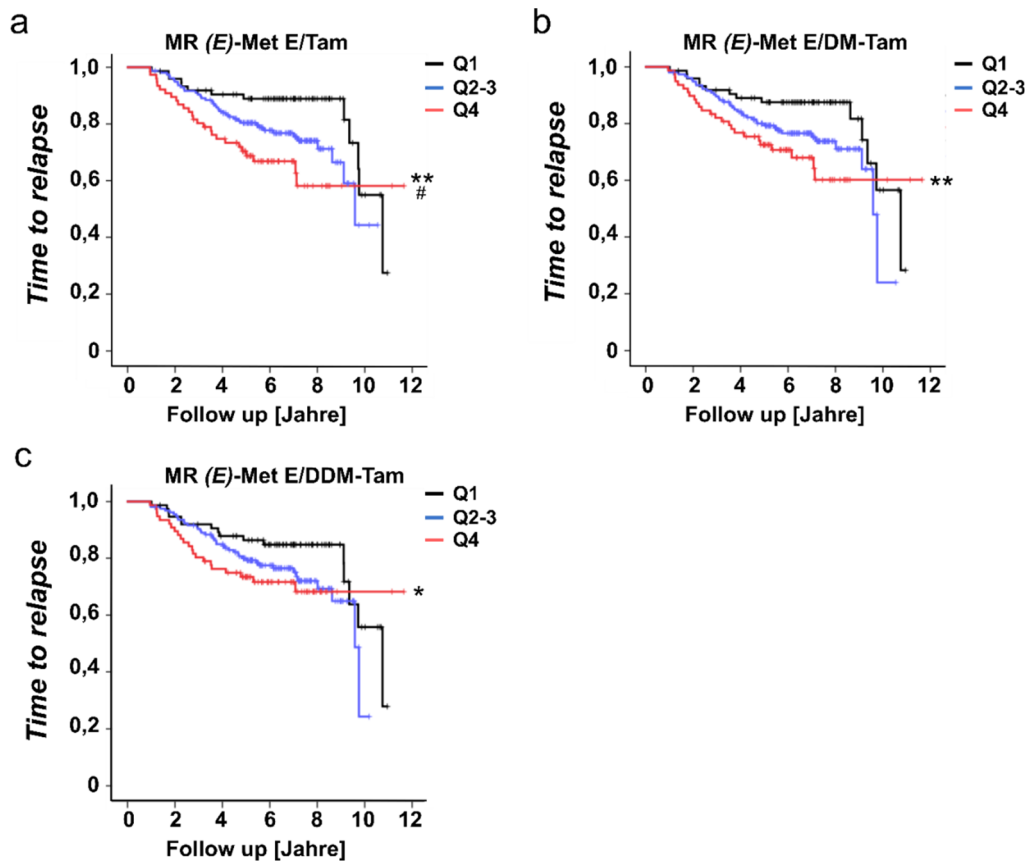


Abbildung 21 Einfluss der metabolischen Verhältnisse von Metabolit E zu metabolischen Vorläufern auf die rezidivfreie Zeit von prämenopausalen Brustkrebspatientinnen der POSH-Studie.

Kaplan-Meier-Kurven für das Wiederauftreten von Mammakarzinomen (ipsilateral, kontralateral oder Metastasen; rezidivfreie Zeit, *time to relapse*) in Abhängigkeit des metabolischen Verhältnisses (MR) von (E)-Metabolit E zu Tamoxifen (a), DM-Tamoxifen (b) und DDM-Tamoxifen (c). Die Patientinnen (N=306) wurden anhand der Quartile der MRs wie folgt eingeteilt: (E)-Metabolit E zu Tamoxifen: Q1 $\leq 0,36$; Q2 = 0,37-0,91; Q3 $\geq 0,92$; (E)-Metabolit E zu DM-Tamoxifen: Q1 $\leq 0,18$; Q2-3 = 0,19-0,45; Q4 $\geq 0,46$; (E)-Metabolit E zu DDM-Tamoxifen: Q1 $\leq 1,43$; Q2-3 = 1,44-3,42; Q4 $\geq 3,43$. (MR: *metabolic ratio*, metabolisches Verhältnis; Q: Quartil; *: $p \leq 0,05$ (Q1 zu Q4); **: $p \leq 0,01$ (Q1 zu Q4); #: $p \leq 0,05$ (Q2-3 zu Q4))

3.5.1.4.2 Rezidivfreies Überleben

Des Weiteren wurde der Einfluss der Plasmakonzentrationen von Bisphenol und beider Isomere von Metabolit E sowie die MRs zu Vorläufersubstanzen in Hinblick auf Mammakarzinom-Rezidive (ipsilaterales Rezidiv), kontralaterale Zweittumore und Fern-Metastasen sowie den Tod der Patientinnen (rezidivfreies Überleben, RFÜ) untersucht. Wie auch in der vorangegangenen Analyse zu *time to relapse* wurden die Patientinnen mittels der Quartile der Metabolitenkonzentrationen oder der MRs in drei Gruppen eingeteilt.

Die MR von (E)-Metabolit E zu Tamoxifen zeigte, analog zu *time to relapse*, auch auf das RFÜ der Patientinnen einen signifikanten Einfluss. So war das RFÜ der Patientinnen in Q4 im Vergleich zu Patientinnen in Q1 verringert ($\chi^2=5,38$, $p=0,02$). Ebenfalls gab es zwischen der Patientinnengruppe im

Interquartil (Q2-3) zu Patientinnen in Q4 einen signifikanten Unterschied ($\chi^2=3,84$, $p=0,05$) (Abbildung 22). Dies wurde in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse bestätigt. Wurde hier die Patientinnengruppe in Q1 als Referenzwert gesetzt, zeigte sich ein signifikant erhöhtes Risiko bei Patientinnen in Q4 (HR=2,022; 95 % KI: 1,079-3,791; $p=0,028$). Der Effekt für die mittlere Gruppe war verglichen zum unteren Quartil nicht signifikant (HR=1,348; 95 % KI: 0,761-2,388; $p=0,306$). Ebenfalls zeigten die MRs von (*E*)-Metabolit E zu DM- oder DDM-Tamoxifen keinen signifikanten Einfluss auf das RFÜ.

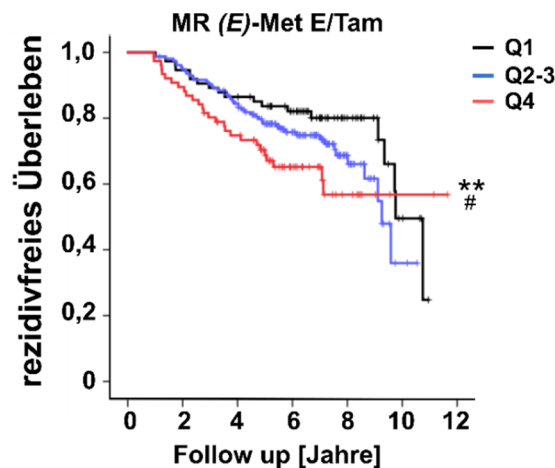


Abbildung 22 Einfluss des metabolischen Verhältnisses von (*E*)-Metabolit E zu Tamoxifen auf das rezidivfreie Überleben von prämenopausalen Brustkrebspatientinnen der POSH-Studie.

Kaplan-Meier-Kurven für das rezidivfreie Überleben in Abhängigkeit der MR von (*E*)-Metabolit E zu Tamoxifen. Die Patientinnen (N=306) wurden anhand der Quartile der MR wie folgt eingeteilt: Q1 $\leq 0,36$; Q2-3 = 0,37-0,91; Q4 $\geq 0,92$. (MR: *metabolic ratio*, metabolisches Verhältnis; Q: Quartil; *: $p \leq 0,05$ (Q1 zu Q4); **: $p \leq 0,01$ (Q1 zu Q4); #: $p \leq 0,05$ (Q2-3 zu Q4))

3.5.2 Metabolit E und Bisphenol in postmenopausalen Frauen unter Tamoxifen

3.5.2.1 Plasmakonzentrationen von Tamoxifen und Tamoxifenmetaboliten

Die *in vivo* Plasmakonzentrationen von Bisphenol und beider Isomere von Metabolit E wurden in postmenopausalen Brustkrebspatientinnen der IKP211-Studie quantifiziert und sind in Abbildung 23 im Vergleich zu Tamoxifen, den demethylierten Metaboliten DM- und DDM-Tamoxifen, den anti-östrogenen Metaboliten 4-OH-Tamoxifen, Endoxifen und Norendoxifen sowie den Phase II Glucuroniden von Tamoxifen, 4-OH-Tamoxifen und Endoxifen dargestellt.

Wie bei den prämenopausalen Patientinnen der POSH-Studie wies (*Z*)-Metabolit E die höchste Konzentration der östrogenen Tamoxifenmetaboliten in postmenopausalen Frauen der IKP211-Studie

mit einer Mediankonzentration von 1434 pM (Spanne 65,4 - 11.560 pM) auf. Das (*E*)-Isomer des Metaboliten E war mit einer Mediankonzentration von 119 pM (Spanne 21,8 - 4593 pM) um circa eine Zehnerpotenz niedriger konzentriert als das (*Z*)-Isomer. Somit fanden sich für den (*Z*)-Metaboliten E eine um den Faktor 65-490 und den (*E*)-Metabolit E eine um mehr als den Faktor 1000 niedrigere Konzentration verglichen zu den metabolischen Vorläufern Tamoxifen (Spanne 12,7 - 1609 nM; Median 403 nM), DM-Tamoxifen (Spanne 32,4 - 2014; Median 698 nM) und DDM-Tamoxifen (Spanne 7,4 - 360 nM; Median 93 nM). Des Weiteren wurde Bisphenol mit einer Mediankonzentration von 166 pM (Spanne 19,4 - 679 pM) im Plasma quantifiziert. Im Vergleich zu den metabolischen Vorläufern 4-OH-Tamoxifen (Spanne 0,27 - 22,3 nM; Median 5,7 nM), Endoxifen (Spanne 3,1 - 95,4 nM; Median 27,7 nM) und Norendoxifen (Spanne 0,4 - 17,4 nM; Median 3,0 nM) zeigte Bisphenol eine bis zu 170-fach niedrigere Plasmakonzentration.

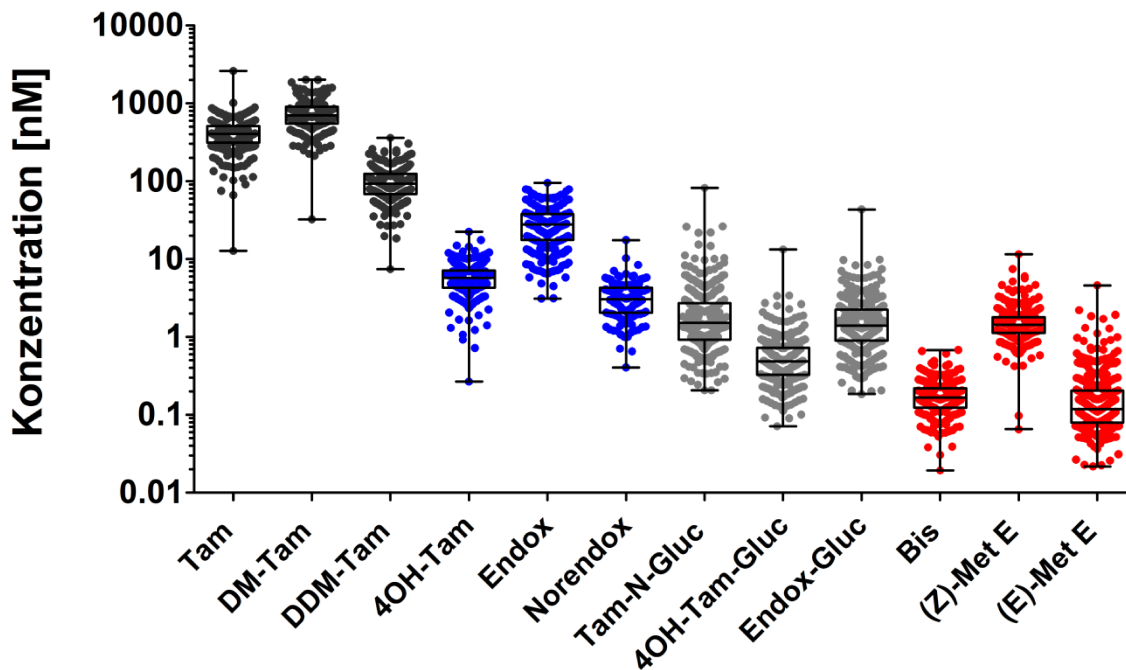


Abbildung 23 Plasmakonzentrationen von Tamoxifen und dessen Metaboliten in postmenopausalen Frauen der IKP211-Studie nach 6 Monaten unter Tamoxifen.

Farbkodierung: Schwarz: Tamoxifen und demethylierte Metaboliten; blau: anti-östrogene Metaboliten; grau: Glucuronide; rot: östrogene Metaboliten

3.5.2.2 Korrelation von Bisphenol und Metabolit E mit nicht-östrogenen Tamoxifenmetaboliten

Analog der Studie mit prämenopausalen Frauen (3.5.1.2) wurden die *in vivo* Konzentrationen von Bisphenol und Metabolit E mit Hilfe des Spearman Rangkorrelationskoeffizienten mit den Plasmakonzentrationen der jeweilig möglichen metabolischen Vorläufersubstanzen korreliert, um die metabolischen Zusammenhänge weitergehend zu charakterisieren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 32 dargestellt.

Hier zeigte (Z)-Metabolit E die stärkste Korrelation mit Tamoxifen-N-Oxid (R=0,60), gefolgt von DM-Tamoxifen (R=0,59). Die Korrelation mit Tamoxifen (R=0,46) und DDM-Tamoxifen (R=0,45) war mit einem Rangkorrelationskoeffizienten von unter 0,5 weniger stark ausgeprägt. Das (E)-Isomer des Metaboliten E zeigte durchgängig um 0,2-0,3 niedrigere Korrelationen mit diesen möglichen Vorläufersubstanzen. Allerdings konnte eine starke Korrelation der beiden Isomere mit R=0,55 beobachtet werden.

Bisphenol wies die stärkste Korrelation mit Norendoxifen (R=0,58) und (Z)-Metabolit E (R=0,56) auf. Die Korrelationskoeffizienten mit 4-OH-Tamoxifen, Endoxifen und (E)-Metabolit E waren jeweils kleiner als 0,5.

Tabelle 32 Korrelation von Bisphenol und Metabolit E mit nicht-östrogenen Tamoxifenmetaboliten in postmenopausalen Frauen der IKP211-Studie (N=377)

	Bis		(Z)-Met E		(E)-Met E	
	R	p	R	p	R	p
Tam			0,463	1,90E-21	0,219	1,86E-05
Tam-NO			0,602	1,76E-38	0,296	4,77E-09
DM-Tam			0,588	1,78E-36	0,258	3,75E-07
DDM-Tam			0,446	8,03E-20	0,200	9,39E-05
Endox	0,392	2,79E-15				
4OH-Tam	0,493	1,56E-24				
Norendox	0,579	3,14E-15				
Bis	-	-	-	-	-	-
(Z)-Met E	0,561	1,31E-32	-	-	0,550	3,95E-31
(E)-Met E	0,326	8,96E-11	0,550	3,95E-31	-	-

Bis: Bisphenol; Met E: Metabolit E; Tam: Tamoxifen; Tam-NO: Tamoxifen-N-Oxid; DM-Tam: Desmethyltamoxifen; DDM-Tam: Didesmethyltamoxifen; Endox: Endoxifen; 4OH-Tam: 4-Hydroxytamoxifen; Norendox: Norendoxifen

3.5.2.3 Korrelation von Bisphenol und Metabolit E mit genetischen Markern

Des Weiteren wurde der Einfluss der wichtigsten Polymorphismen von CYP-Enzymen, die in Experimenten mit Supersomes™ (3.3.2) die höchste Umsatzrate zu Bisphenol und Metabolit E aufwiesen, auf die MR von Bisphenol und Metabolit E zu möglichen Vorläufermetaboliten unter Verwendung von Spearman Rangkorrelationskoeffizienten und dem Kruskal-Wallis-Test untersucht (2.2.14.4).

Hier zeigte die nicht-funktionale Variante *2 des Enzymes CYP2C19 eine signifikante Erniedrigung der MR von Bisphenol zu (Z)-Metabolit E (Abbildung 24 a). Somit nahm die Plasmakonzentration von Bisphenol im Verhältnis zu dem metabolischen Vorläufer (Z)-Metabolit E mit reduzierter Enzymaktivität ab. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Daten aus der POSH-Studie (3.5.1.3) und den *in vitro* Experimenten mit Supersomes™, bei denen CYP2C19 eine hohe Hydroxylierungsrate von (Z)-Metabolit E zu Bisphenol aufwies (3.3.2). Weitergehend konnte ein negativer Einfluss des *2-Allels von CYP2C19 auf die MR von (E)-Metabolit E zu DDM-Tamoxifen sowie zu dem (Z)-Isomer beobachtet werden (Abbildung 24 b, c). Es fanden sich bei einer reduzierten Enzymaktivität niedrigere Plasmakonzentrationen von (E)-Metabolit E relativ zu den zwei metabolischen Vorläufern.

Überdies hinaus beeinflusste der CYP2D6-Phänotyp signifikant die MR von Bisphenol zu (Z)-Metabolit E, so dass bei höherer Enzymaktivität mehr Bisphenol im Vergleich zu weniger (Z)-Metabolit E im Plasma quantifiziert werden konnte (Abbildung 24 d). Die MR von (Z)-Metabolit E zu DM-Tamoxifen wurde in gleicher Weise durch die CYP2D6 Aktivität beeinflusst (Abbildung 24 e).

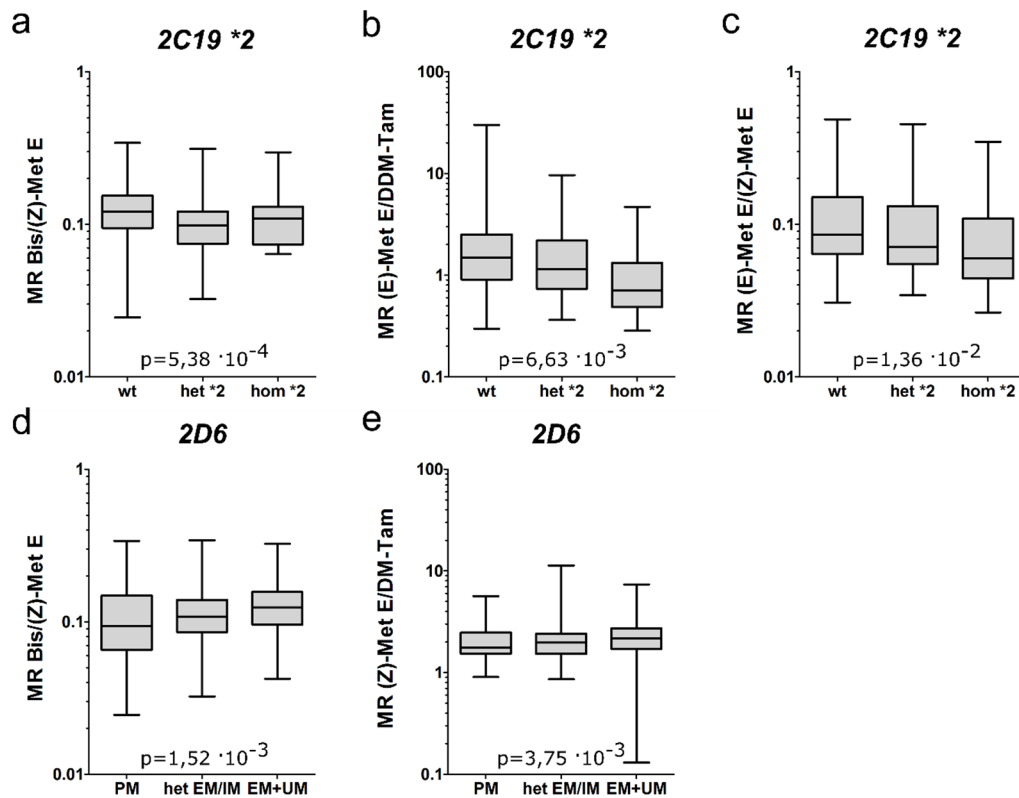


Abbildung 24 Einfluss der Polymorphismen von CYP2C19 und CYP2D6 auf das metabolische Verhältnis von Bisphenol und Metabolit E zu metabolischen Vorläufern in postmenopausalen Frauen der IKP211-Studie.

Der Einfluss des Polymorphismus *2 des Enzyms CYP2C19 (*rs4244285*) wurde auf die MR von Bisphenol zu (Z)-Metabolit E (a) sowie von (E)-Metabolit E zu DDM-Tamoxifen (b) und (Z)-Metabolit E (c) getestet (N=372; wt=271; het *2=87; hom *2=14). Der Einfluss der Aktivität von CYP2D6 wurde auf (N=360) die MR von Bisphenol zu (Z)-Metabolit E (d) und von (Z)-Metabolit E zu DM-Tamoxifen (e) getestet und dafür die Patientinnen in drei CYP2D6 Phänotypgruppen eingeteilt: PM (*poor metabolizer*; N=20), heterozygot EM/IM (*extensive/ intermediate metabolizer*; N=194) und EM/UM (*extensive/ultrarapid metabolizer*; N=146). Für die Ermittlung der p-Werte wurden Spearman Rangkorrelationskoeffizienten und das Benjamini-Hochberg Verfahren für multiples Testen angewendet (MR: *metabolic ratio*, metabolisches Verhältnis; wt: Wildtyp; het: heterozygot; hom: homozygot)

3.5.2.4 Plasmakonzentrationen der Sexualhormone

Die Plasmakonzentrationen der Sexualhormone Östradiol, Östron, Testosteron, Androstendion und Progesteron wurden in Plasmaproben postmenopausaler Brustkrebspatientinnen vor und nach 6 Monaten unter Tamoxifentherapie quantifiziert und sind in Abbildung 25 dargestellt.

Vor Beginn der Therapie betrug die Mediankonzentrationen der Östrogene Östradiol und Östron jeweils 16,5 pM und 80,7 pM (Spanne Östradiol: 3,8 - 71,6 pM; Spanne Östron: 19,6 - 957,5 pM). Die Androgene Testosteron (Spanne: 119 - 2564 pM, Median: 577 pM) und Androstendion (Spanne: 240 - 6531 pM, Median: 1717 pM) waren im Median bis zu 100-fach höher konzentriert als die Östrogene, während der Vorläufer Progesteron mit 32,8 - 607 pM (Median 181 pM) im Plasma gefunden wurde.

Nach 6 Monaten unter Tamoxifentherapie wurden Östradiol und Östron mit Mediankonzentrationen von jeweils 16,9 pM und 93,8 pM quantifiziert (Spanne Östradiol: 3,4 - 72,7 pM; Spanne Östron: 5,1 - 1249 pM). Die Androgene Testosteron und Androstendion wiesen eine Mediankonzentration von 680 pM und 1574 pM (Spanne Testosteron: 53,3 - 3423 pM; Spanne Androstendion: 89,5 - 5895 pM) auf. Der Vorläufer Progesteron wurde mit Konzentrationen zwischen 20,2 pM und 1062 pM (Median 137,7 pM) im Plasma gefunden.

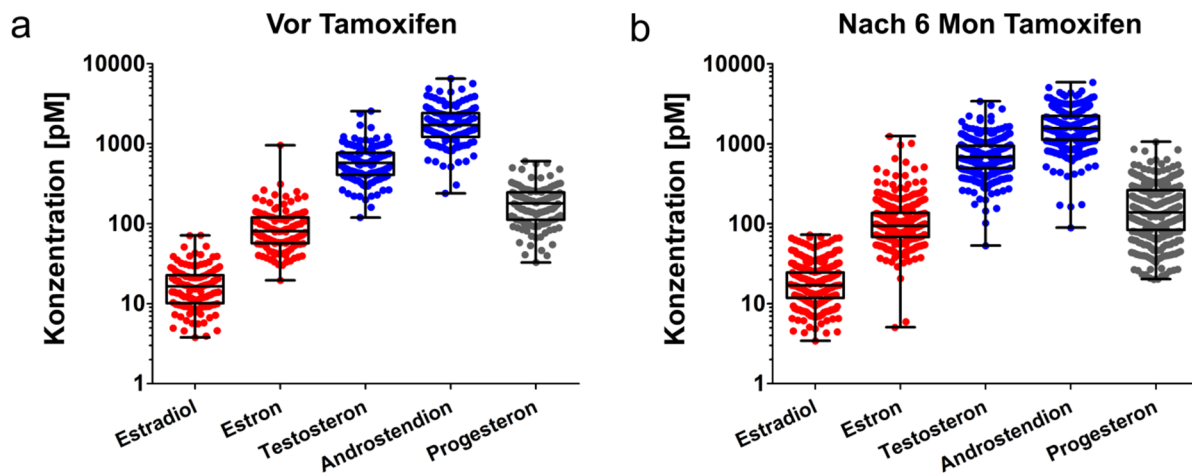


Abbildung 25 Plasmakonzentrationen der Sexualhormone in postmenopausalen Frauen der IKP211-Studie vor Therapiebeginn (N=129) (a) und nach 6 Monaten unter Tamoxifen (N=376) (b).

3.5.2.5 Einfluss der Tamoxifentherapie auf die Plasmaspiegel von Sexualhormonen

In früheren Studien wurde gezeigt, dass Tamoxifen in prämenopausalen Frauen zu einer 2-3-fachen Erhöhung der Plasmakonzentrationen von Östradiol und Progesteron führt (Sherman et al. 1979; Jordan et al. 1991), während ein Effekt in postmenopausalen Brustkrebspatientinnen kontrovers in Publikationen diskutiert wird (Golder et al. 1976; Daxenbichler et al. 1979; Coombes et al. 1982). Daher wurde der Einfluss von Tamoxifen auf die *in vivo* Konzentration der Sexualhormone Östradiol, Östron, Testosteron, Androstendion und Progesteron in postmenopausalen Frauen der IKP211-Studie untersucht. Die Konzentrationen der Hormone im Plasma wurden vor und 6 Monate nach Therapiebeginn quantifiziert und mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 zusammengefasst. Es konnte ein signifikanter Anstieg im Median der Plasmakonzentrationen von Östron von 80,7 pM auf 91 pM ($p=0,0033$) und Testosteron von 576,8 pM auf 639,3 pM ($p=2,1 \cdot 10^{-6}$) beobachtet werden. Dabei waren die *in vivo* Konzentrationen von Östron in 78 und von Testosteron in 85 von 127 Fällen erhöht.

Des Weiteren war die MR von Androstendion zu Testosteron, dessen Umwandlung von der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase katalysiert wird, in 90 von 127 Fällen verringert (Median 3,08 *versus* 2,27; $p=7,3 \cdot 10^{-9}$). Im Gegensatz dazu konnte kein Einfluss auf das metabolische Verhältnis von Östradiol zu Östron, dessen Reaktion ebenfalls von diesem Enzym katalysiert wird, festgestellt werden.

Tabelle 33 Einfluss der Tamoxifentherapie auf *in vivo* Konzentrationen von Sexualhormonen in postmenopausalen Frauen der IKP211 Studie (N=127)

	Ränge			Mediankonzentration [pM]	
	neg	pos	p	vor Therapie	nach 6 Mon Tam
Östradiol	51	76	1,50E-02	16,2	18,0
Östron	49	78	3,26E-03	80,7	91,0
Testosteron	42	85	2,09E-06	576,8	639,3
Androstendion	75	52	2,28E-02	1717	1568
Progesteron	75	51	5,51E-02	183,2	137,7
MR Östradiol/Östron	58	69	1,00E+00	0,194	0,185
MR Östradiol/Testosteron	68	59	3,94E-06	0,026	0,026
MR Östron/Androstendion	43	84	2,60E-01	0,049	0,056
MR Androstendion/Testosteron	90	37	7,32E-09	3,081	2,268

neg: negativ; pos: positiv; Mon: Monaten; MR: *metabolic ratio* (metabolisches Verhältnis); Signifikanz ab $p \leq 5,6 \cdot 10^{-3}$

4. Diskussion

Tamoxifen ist die Standardtherapie für Östrogenrezeptor-positiven Brustkrebs bei prämenopausalen Frauen und die Alternative zu Aromataseinhibitoren bei postmenopausalen Frauen. Dabei wird Tamoxifen exzessiv hauptsächlich durch CYP-Enzyme metabolisiert, wodurch unter anderem anti-östrogen sowie östrogen wirksame Metaboliten entstehen (Jordan et al. 1977; Furr und Jordan 1984; Robinson und Jordan 1988; Wiebe et al. 1992; Desta 2004). (*Z*)-4-Hydroxytamoxifen (4-OH-Tamoxifen) und (*Z*)-*N*-Desmethyl-4-hydroxytamoxifen (Endoxifen) gehören zu den wichtigsten anti-östrogenen Metaboliten und sind für den antiproliferativen Effekt der Tamoxifentherapie im Brustgewebe maßgeblich mitverantwortlich. Zusätzlich dazu entstehen viele weitere Metaboliten, von denen einige auch östrogene Eigenschaften besitzen. Zu den letzteren gehören Tamoxifen Bisphenol (Bisphenol) und beide Isomere von Metabolit E, welche *in vitro* als Agonisten am Östrogenrezeptor wirken und somit zur Zellproliferation in Östrogen-abhängigen Brustkrebszelllinien führen (Johnson et al. 1989; Murphy et al. 1990). Des Weiteren wurden diese Metaboliten in tamoxifenresistenten Xenograft-Modellen, die auf der Zelllinie MCF7 basieren sowie in humanen Mammakarzinomen von Brustkrebspatientinnen mit Tamoxifenresistenz identifiziert (Wiebe et al. 1992). Demzufolge könnten Bisphenol und Metabolit E den Therapieerfolg von Tamoxifen in der Klinik beeinträchtigen. Jedoch ist der Einfluss von Bisphenol und Metabolit E auf den Therapieverlauf von Tamoxifen in der Klinik weitestgehend unerforscht. Zusätzlich sind die Stoffwechselwege, die zu den östrogenen Tamoxifenmetaboliten führen und deren pharmakodynamische Auswirkungen auf das Fremdstoff-metabolisierende System bisher nicht bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war es, die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften dieser Metaboliten zu charakterisieren und den Einfluss auf den Therapieverlauf zu analysieren. Um dies zu erreichen wurde im Laufe dieser Dissertation eine hochsensitive HPLC-MS/MS-Analytik aufgebaut, mit der es gelang Bisphenol und Metabolit E in humanen Plasmaproben und *in vitro* Experimenten zu quantifizieren. Es konnte ein Leberzellmodell etabliert werden, das sowohl zu pharmakokinetischen als auch pharmakodynamischen Untersuchungen herangezogen wurde. Damit und mit etablierten zell- und mikrosomenbasierenden Systemen wurden die metabolischen Ausgangsstoffe und die beteiligten Enzyme identifiziert, um die östrogenen Tamoxifenmetaboliten in den komplexen Stoffwechsel dieses Brustkrebsmedikaments integrieren zu können. Weitergehend wurden die Auswirkungen auf Enzymaktivitäten und Genexpressionen wichtiger Proteine des Fremdstoff-metabolisierenden Systems untersucht. Für die Untersuchungen des Einflusses auf den Therapieverlauf in der Klinik wurden die Plasmakonzentrationen von Bisphenol und Metabolit E in Kohorten prä- und postmenopausaler Frauen mit Hilfe der etablierten HPLC-MS/MS-Analytik quantifiziert und mit dem Therapieverlauf korreliert. Darüber hinaus wurden die Erkenntnisse der *in vitro* Experimente genutzt, um CYP-Enzyme

als mögliche Biomarker zu identifizieren, welche die Plasmakonzentrationen der östrogenen Tamoxifenmetaboliten prognostizieren können.

4.1 Analytik von Sexualhormonen und östrogenen Tamoxifenmetaboliten

Die während dieser Arbeit neu entwickelte und validierte HPLC-MS/MS-Methode erlaubt es zum ersten Mal die östrogenen Tamoxifenmetaboliten Bisphenol und Metabolit E im niedrigen picomolaren Bereich in humanen Plasmaproben sowie in *in vitro* Experimenten zu quantifizieren. Durch die Kombination aus Proteinpräzipitation und Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) konnte eine hohe Genauigkeit, Präzision, Stabilität und Reproduzierbarkeit der Methode erreicht werden. Zur Steigerung der Sensitivität im positiven MRM Modus wurden die Analyten mit 3-[(N-Succinimid-1-yl)oxycarbonyl]-1-methylpyridiniumiodid derivatisiert, so dass die gebildeten N-Methylnicotinsäure-phenylester permanent positiv geladen sind. Dadurch konnte ein niedriges Detektionslimit, welches um zwei Größenordnungen kleiner ist als bei herkömmlichen Derivatisierungen mit Picolinoylchlorid oder Dansylchlorid, erreicht werden. Zusätzlich erforderte die Derivatisierung phenolischer Hydroxylgruppen mit 3-[(N-Succinimid-1-yl)oxycarbonyl]-1-methylpyridiniumiodid weniger Arbeitsschritte als bei beiden Alternativsubstanzen und es konnte bei der Aufarbeitung auf das hochtoxische Iodmethan verzichtet werden. Aufgrund dieser Vorteile gegenüber Picolinoyl- und Dansylchlorid wurde der Nikotinsäureester als Derivatisierungsreagenz ausgewählt, so dass die in 3.1.1 beschriebene Sensitivität erreicht werden konnte.

Im Vergleich zu früheren Methoden ist die Aufbereitung der Analyten über Proteinpräzipitation und SPE schneller und einfacher, da langwierige und mehrstufige Flüssigphasenextraktionen verschiedener Fraktionen vermieden werden können (Mauvais-Jarvis et al. 1986; Murphy et al. 1987; Wiebe et al. 1992). Mit der vorliegenden Methode ließ sich trotz des geringen Probenvolumens von max. 200 µl gegenüber den bisherigen Verfahren mittels GC und HPLC-MS eine um den Faktor 14 für (Z)-Metabolit E und um den Faktor 42 für das (E)-Isomer höhere Sensitivität erreichen (Murphy et al. 1987; Wiebe et al. 1992). Im Plasma von sechs postmenopausalen Frauen, welche 40 bzw. 80 mg Tamoxifen pro Tag einnahmen, konnten Murphy und Kollegen 1987 (Z)-Metabolit E mit Konzentrationen von 0,9 ng/ml bis 2,0 ng/ml (3 – 6,7 nM) quantifizieren (Murphy et al. 1987). In den während dieser Arbeit analysierten Plasmaproben postmenopausaler Brustkrebspatientinnen, welche eine Tagesdosis von 20 mg Tamoxifen einnahmen, betrug die Mediankonzentration von (Z)-Metabolit E 1,4 nM. Da die von Murphy *et al.* gefundenen Konzentrationen analog zur Tagesdosis zwei- bis viermal höher waren, deutet dies auf eine lineare Kinetik des Tamoxifenmetabolismus zu (Z)-Metabolit E hin. Wiebe und Kollegen konnten Konzentrationen von Bisphenol und Metabolit E von 50 ng/g Gewebe feststellen. Allerdings wurde die Präsenz von Metabolit E aufgrund von unzureichendem Material nur in einer der

Gewebeprobe mit Hilfe von MS validiert, während das Signal von Bisphenol in keiner Probe bestätigt werden konnte (Wiebe et al. 1992).

Mit der neu etablierten HPLC-MS/MS Methode wurden erstmals die Plasmakonzentrationen von Bisphenol und Metabolit E in großen Kohorten von Tamoxifen behandelten prä- und postmenopausalen Brustkrebspatientinnen quantifiziert. Überraschend ist, dass bei den postmenopausalen Brustkrebspatientinnen (*Z*)-Metabolit E im Median 1,6 fach höher konzentriert war sowie die gefundenen Maximalkonzentrationen bis zu 4,6 fach höher waren als in der Kohorte prämenopausaler Frauen. Das (*E*)-Isomer wies ebenfalls 4,5 fach höhere Maximalkonzentrationen in postmenopausalen Patientinnen auf, der Median betrug allerdings fast die Hälfte. Dies wurde auch bei den Konzentrationen von Tamoxifen und den nicht-östrogenen Metaboliten, mit Ausnahme von DM-Tamoxifen und Norendoxifen, beobachtet. Hier korrelierten die Plasmakonzentrationen mit zunehmendem Alter. Mögliche Ursachen für die höheren Plasmakonzentrationen, trotz gleicher Dosierung von Tamoxifen, könnten eine durch das Alter veränderte Pharmakokinetik oder ein durch die Menopause erhöhter Anteil an adipösem Gewebe sein. So ist die Verweildauer von Medikamenten im Darm bei älteren Patienten erhöht sowie das Verteilungsvolumen erniedrigt, wodurch höhere *in vivo* Konzentrationen von Arzneistoffen trotz gleicher Dosis erreicht werden (Bressler und Bahl 2003). Da zusätzlich der Phase I Stoffwechsel der CYP-Enzyme nicht durch das Alter beeinflusst zu sein scheint (Gorski et al. 2003; Kinirons und O'mahony 2004; Parkinson et al. 2004), ist es möglich, dass auch die Metaboliten der Arzneistoffe höhere Konzentrationen im Patientenplasma aufweisen können, da die hepatische und renale Ausscheidung von glucuronidierten Substanzen aufgrund einer geringeren Blutflussrate und einer verringerten Lebergröße in älteren Patienten eingeschränkt ist (Bressler und Bahl 2003; Butler und Begg 2008). Ferner könnten die Plasmakonzentrationen in Folge einer Reservoirbildung und einhergehenden Veränderung der metabolischen *Clearance* durch veränderte Anteile an adipösem Gewebe in postmenopausalen Frauen erhöht sein (Ley et al. 1992; Ferrara et al. 2002).

Des Weiteren wurde die Analytik von Tamoxifenmetaboliten zum ersten Mal mit der Quantifizierung der wichtigsten Sexualhormone (Östradiol, Östron, Testosteron, Androstendion und Progesteron) verknüpft, so dass die Konzentrationen von Bisphenol und Metabolit E und der oben genannten Hormone gleichzeitig aus einer Probe bestimmt werden können. Dadurch können mögliche Effekte der Tamoxifentherapie auf die endogenen Konzentrationen dieser Hormone in Abhängigkeit der Tamoxifenmetaboliten untersucht werden, wie bei prämenopausalen Frauen publiziert wurde (Groom und Griffiths 1976; Ravdin et al. 1988; Jordan et al. 1991; Sunderland und Osborne 1991).

Östradiol und Östron wurden, wie in den oben aufgeführten Studien, häufig mit Hilfe der Antikörperbasierten Methoden des Radioimmunoassays und dem *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

bestimmt, welche eine Nachweisgrenze bis zu 7 pM (2 pg/ml) aufweisen (Stanczyk et al. 2010). Allerdings können mögliche Kreuzreaktionen der verwendeten Antikörper zu einer falschen Einschätzung der tatsächlichen Plasmakonzentrationen führen (Blair 2010; Fanelli et al. 2011). Eine höhere Selektivität und Sensitivität bieten massenspektrometrische Methoden in Kombination mit Gas- oder Flüssigchromatographien, GC-MS/MS und HPLC-MS/MS, welche Nachweisgrenzen bis zu 1 - 2 pM erreichen können (Kushnir et al. 2008; Stanczyk et al. 2010; Fiers et al. 2012; Pauwels et al. 2013). Da die Hormonkonzentrationen speziell der Östrogene bei postmenopausalen Frauen im picomolaren Bereich sind, sind sensitive und spezifische Nachweismethoden für die Bestimmung der *in vivo* Plasmakonzentrationen nötig. Aufgrund der oben bereits erwähnten Derivatisierung mit 3-[(N-Succinimid-1-yl)oxycarbonyl]-1-methylpyridiniumiodid konnte auch für Östradiol und Östron ein niedriger LLOQ erreicht werden, der für die Quantifizierung dieser Hormone in postmenopausalen Frauen geeignet ist. Da der Nikotinsäureester spezifisch phenolische Hydroxylgruppen derivatisiert, werden Testosteron, Androstendion und Progesteron unverändert quantifiziert. Trotzdem reicht die Sensitivität der Methode aus, um die Hormonkonzentrationen in postmenopausalen Frauen zu messen.

Die gemessenen Plasmakonzentrationen der Östrogene Östradiol und Östron entsprachen den in der Literatur publizierten Referenzwerten anderer postmenopausaler Frauen. Die 95 % Konfidenzintervalle der gemessenen Konzentrationen der Androgene Testosteron und Androstendion sowie von Progesteron der Frauen der IKP211-Studie entsprachen ebenfalls den Referenzwerten (Laughlin et al. 2000; Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group 2003; Rexrode et al. 2003; Missmer et al. 2004; Hankinson und Eliassen 2007).

4.2 Auswahl und Validierung einer geeigneten Leberzelllinie

Für die *in vitro* Charakterisierung der Pharmakokinetik und -dynamik eines Arzneistoffes ist das gewählte Lebermodell von entscheidender Bedeutung. Bisher werden primäre humane Hepatozyten (PHH) als Standardmodell für diese Untersuchungen verwendet, da sie über das gesamte Spektrum Fremdstoff-metabolisierender Enzyme sowie über Ko-Faktoren in physiologischen Konzentrationen verfügen und die Genexpression ADME-assoziiierter Faktoren sensibel auf das Einwirken exogener Substanzen reagiert. Allerdings ist aufgrund der Spenderabhängigkeit (Leberresektionen) die Verfügbarkeit limitiert und die genetische und damit metabolische Ausstattung sehr heterogen. Zusätzlich ist der hepatische Phänotyp der primären Zellen in Kultur instabil und wird innerhalb von 48-72 Std. vollständig verloren (Castell et al. 2006). Um diese Nachteile zu überwinden, werden zunehmend immortalisierte Leberzelllinien genutzt. Im Laufe dieser Arbeit wurden die immortalisierten Hepatozyten-Zelllinien HC-AFW1, HepaRG® und upcyte® 653-03 und 653-03 2D6 im

Hinblick auf die metabolische Kapazität und deren Anwendbarkeit auf den Tamoxifenmetabolismus charakterisiert. Die Validierung der ausgewählten Zelllinie im Hinblick auf pharmakodynamische Untersuchungen erfolgte anhand der Modulation der Genexpression nach Behandlung mit den prototypischen Induktoren Rifampicin und Phenobarbital.

HC-AFW1-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Armeanu-Ebinger aus einem hepatozellulärem Karzinom eines 4-jährigen Jungen isoliert und exprimieren die nukleären Rezeptoren AhR (Arylhydrocarbonrezeptor), CAR (*constitutive androstane receptor*), PXR (Pregnan-X-Rezeptor), NRF2 (*nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) und PPAR α (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor α), welche den hepatozellulären Metabolismus auf Transkriptionsebene regulieren (Armeanu-Ebinger et al. 2012; Braeuning et al. 2015). Bei der Umsetzung von isoenzymspezifischen CYP-Substraten konnte allerdings nur eine geringe Aktivität von CYP1A2, 2C8 und 3A4 festgestellt werden, wohingegen CYP2B6, 2C9, 2C19 und 2D6 keine Aktivität zeigten (3.2.1.1). Dies spiegelte sich in der Umsetzung von Tamoxifen wider. Hier konnte nur der Hauptmetabolit DM-Tamoxifen im Überstand der Zellen quantifiziert werden, während die aktiven anti-östrogenen Metaboliten Endoxifen und 4-OH-Tamoxifen sowie dessen Glucuronide fehlten (3.2.1.2). Aufgrund der niedrigen Aktivität der CYP-Enzyme sowie des stark eingeschränkten Tamoxifenmetabolismus wurde diese Zelllinie für die Untersuchung der Pharmakokinetik von Tamoxifen ausgeschlossen.

Die kommerziell erhältliche Leberzelllinie HepaRG[®] wurde aus einem Leberkarzinom einer Patientin mit Hepatitis C-Infektion isoliert und weist nach Konditionierung mit DMSO reproduzierbare Expression und Aktivität vieler Fremdstoff-metabolisierender Enzyme sowie anderer ADME-assoziierten Faktoren wie Transporter und spezifische Transkriptionsfaktoren auf (Gripon et al. 2002; Aninat et al. 2005; Guillouzo et al. 2007; Klein et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte dies anhand der Umsetzung CYP-isoenzym-spezifischer Modellsubstrate bestätigt werden: für alle getesteten CYP-Enzyme konnte mit Ausnahme von CYP2D6 eine hohe Aktivität nachgewiesen werden. Das Fehlen von CYP2D6-Aktivität zeigte sich ebenfalls im Metabolismus von Tamoxifen. Hier erfolgte keine Bildung von Endoxifen oder dessen Glucuronid, obwohl andere Hauptmetaboliten wie DM-Tamoxifen und 4-OH-Tamoxifen gebildet wurden (3.2.1.2). Interessanterweise wird der HepaRG CYP2D6-Genotyp **2/*9* als *Extensive Metabolizer* (schneller Metabolisierer, EM) klassifiziert, jedoch liegt auf Basis des Tamoxifen-Metabolismus phänotypisch ein nicht-funktioneller *Poor Metabolizer* (geringer Metabolisierer, PM) Typ vor. Aufgrund dieser Diskrepanz und dem Fehlen der CYP2D6-Aktivität konnte trotz hoher Aktivität anderer CYP-Enzyme der Tamoxifenmetabolismus nur unzureichend dargestellt werden. Somit wurde diese Zelllinie nicht weiter eingesetzt.

Bei den Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6 der Firma upcyte[®] technologies handelt es sich um immortalisierte Zellen eines gesunden Donors, die, ähnlich wie PHHs, einen adulten hepatischen

Phänotyp aufweisen sowie ein weites Spektrum an Enzymen, Transportern und Transkriptionsfaktoren des ADME-Systems exprimieren (Burkard et al. 2012; Nörenberg et al. 2013; Schaefer et al. 2016; Tolosa et al. 2016). Im Gegensatz zu PHHs proliferieren die verwendeten upcyte® Hepatozyten aufgrund von genetischen Modifikationen in Kultur unter Beibehaltung der hepatischen Eigenschaften. Da allerdings selbst unter optimierten Kulturbedingungen nur geringe CYP2D6-Aktivität in den 653-03 Zellen festgestellt werden konnte, wurde in Kollaboration mit upcyte® technologies eine vom Zellklon 653-03 abgeleitete, mit funktionalem CYP2D6 lentiviral transduzierte Zelllinie (653-03 2D6) produziert und von der Firma bereitgestellt. Beide Zelllinien zeigten hohe Aktivitäten bei allen untersuchten CYP-Enzymen, die entweder vergleichbar mit denen in HepaRG®-Zellen (1A2, 2C8, 2C9, 2C19) oder sogar höher waren (2B6, 2D6, 3A4). Dies zeigte sich auch in der Umsetzung von Tamoxifen zu den Hauptmetaboliten. Die beobachtete Konzentration von DM-Tamoxifen war zwar in beiden upcyte® Zelllinien niedriger als im Überstand der HepaRG®-Zellen, die der anderen Metaboliten war allerdings deutlich höher, so dass die geringere DM-Tamoxifenkonzentration durch einen stärkeren Metabolismus zu weiterführenden Metaboliten begründet sein muss (3.2.1.2). Des Weiteren konnte in den 653-03 Hepatozyten Endoxifen-Glucuronid quantifiziert werden, obwohl die Konzentration des Aglykons unter der Nachweisgrenze lag. Dies bestätigt frühere Studien von Mürdter *et al.*, Dickschen *et al.* und Heine *et al.*, nach denen Endoxifen ebenfalls über einen CYP2D6-unabhängigen Weg aus 4-OH-Tamoxifen gebildet werden kann (Mürdter et al. 2011; Dickschen et al. 2012; Heine et al. 2014). Somit konnte gezeigt werden, dass beide upcyte® Hepatozytenlinien für pharmakokinetische Untersuchungen des Tamoxifenstoffwechsels geeignet sind und zusätzlich als Modell für die beiden klinisch wichtigen CYP2D6-Phänotypen des PM und EM dienen können.

Für die Validierung der Zellen hinsichtlich der pharmakodynamischen Auswirkungen exogener Substanzen wurden die prototypischen Induktoren Rifampicin und Phenobarbital genutzt und die Modulation von CYP-Enzymen und anderer ADME-assoziierten Faktoren auf Ebene der Aktivität und Genexpression charakterisiert. Beide Modellsubstrate induzierten dabei die getesteten CYP-Enzyme auf Aktivitäts- und Genexpressionsebene wie erwartet (Zhou et al. 1990; Schuetz et al. 1993; Chan et al. 1994; Honkakoski et al. 1998; Goodwin et al. 1999; Rae et al. 2001; Raucy et al. 2002; Chen und Raymond 2006). Des Weiteren wurden Genexpressionsmuster von Phase II Enzymen und Transportern ähnlich moduliert wie Arbeiten anderer Forschungsgruppen bestätigen (Maglich et al. 2002; Olinga et al. 2008; Sousa et al. 2008). Darüber hinaus konnten keine starken phänotypischen Abweichungen zwischen den beiden Zelllinien beobachtet werden. Diese Voruntersuchungen ließen somit die Interpretation zu, dass beide Zelllinien für die Untersuchung pharmakodynamischer Auswirkungen exogener Substanzen auf die Aktivität und Expression ADME-assoziiierter Enzyme geeignet sind. Aufgrund dessen wurden die upcyte® Hepatozyten 653-03 und 653-03 2D6 sowohl für die

Untersuchung des Metabolismus als auch für die Charakterisierung pharmakodynamischer Effekte von Tamoxifen und dessen anti-östrogenen und östrogenen Metaboliten genutzt.

4.3 Metabolismus zu Bisphenol und Metabolit E

Die Charakterisierung der Pharmakokinetik von Arzneistoffen, die, wie Tamoxifen, einem ausgeprägten Metabolismus unterliegen, gibt Einsicht in dessen Aufnahme (Absorption), Verteilung (Distribution), den Stoffwechsel (Metabolismus) und die Ausscheidung (Exkretion; ADME) und kann so zu einem besseren Verständnis über das Therapieansprechen und die (Neben-)Wirkungen in der Klinik führen. Darüber hinaus können Informationen über die Mechanismen von möglichen Arzneimittelwechselwirkungen erfasst werden. Im Falle von Tamoxifen konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass der Polymorphismus des Enzyms CYP2D6 einen erheblichen Einfluss auf den Stoffwechsel von Tamoxifen zu dem aktiv anti-östrogenen Metaboliten Endoxifen hat und somit den Therapieerfolg entscheidend mitbestimmt (Schroth et al. 2010; Madlensky et al. 2011; Goetz et al. 2013; Province et al. 2014; Saladores et al. 2015). Dies weist auf die Indikatoreigenschaft von Enzymen als Biomarker hin, um Plasmakonzentrationen vorhersagen zu können.

Die Metabolismuswege zu den Hauptmetaboliten von Tamoxifen DM-Tamoxifen, Endoxifen und 4-OH-Tamoxifen sowie die verantwortlichen Enzyme für deren Bildung sind weitgehend identifiziert. So ist bekannt, dass die Bildung dieser Metaboliten hauptsächlich von der Aktivität der CYP-Enzyme 2D6, 2B6, 3A4 und 2C9 abhängig ist (Crewe et al. 2002; Collier 2003; Mürdter et al. 2011; Goetz et al. 2013). Dagegen wurde der Stoffwechsel zu den östrogen-wirksamen Tamoxifenmetaboliten Bisphenol und Metabolit E sowie die daran beteiligten Enzyme bisher nicht charakterisiert. Da, wie oben beschrieben, Enzyme als Biomarker dienen können, ist die Identifizierung der an der Bildung von Metabolit E und Bisphenol beteiligten CYP-Enzyme für eine Vorhersage der Plasmakonzentrationen ausschlaggebend und kann zu einer detaillierten Prognose des Therapieverlaufs von Tamoxifen führen. Infolgedessen wurden in dieser Arbeit erstmalig die Art der Reaktion, die zu den östrogenen Tamoxifenmetaboliten führt sowie die daran beteiligten Enzyme der Phase I *in vitro* identifiziert. Da neben der Bildung auch die metabolische *Clearance* Einfluss auf die Plasmakonzentrationen hat, wurden darüber hinaus die Phase II-Reaktionen der östrogenen Tamoxifenmetaboliten untersucht. Dadurch können Bisphenol und Metabolit E zum ersten Mal in das komplexe metabolische Netzwerk von Tamoxifen integriert werden. Darüber hinaus wurden die Erkenntnisse aus den *in vitro* Experimenten *in vivo* mit Hilfe von Patientendaten weitergehend überprüft, um Enzyme und deren kodierende, polymorphen Gene als potentielle Biomarker für interindividuelle Unterschiede in den Plasmakonzentrationen dieser Substanzen identifizieren zu können.

4.3.1 Charakterisierung der Metabolismuswege zu Bisphenol und Metabolit E *in vitro*

Durch die Umsetzung metabolischer Vorläufer zu Metabolit E und Bisphenol in humanen Lebermikrosomen (HLM) konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Abspaltung der Seitenkette von Tamoxifen und seinen Metaboliten eine aktive, enzymatische Reaktion ist, welche in der mikrosomalen Zellfraktion stattfindet. Darüber hinaus weisen die Daten darauf hin, dass Tamoxifen direkt als metabolischer Vorläufer von Metabolit E fungiert, da dessen intrinsische *Clearance* (Cl_{int}) um den Faktor 2 höher war als die der anderen Vorläufer DM-Tamoxifen und DDM-Tamoxifen. Allerdings ist, aufgrund der hohen *in vivo* Plasmakonzentrationen von DM-Tamoxifen, die Bildung von Metabolit E aus Tamoxifen bzw. DM-Tamoxifen wahrscheinlich, während die Bildung aus DDM-Tamoxifen aufgrund seiner geringeren Plasmakonzentration vermutlich eine untergeordnete Rolle spielt. Im Falle von Bisphenol scheint die Hydroxylierung von Metabolit E begünstigt gegenüber der Seitenkettenabspaltung der anti-östrogenen Tamoxifenmetaboliten zu sein, da diese Reaktion in HLM eine bis zu 40-fach höhere Cl_{int} aufwies. Nichtsdestotrotz ist die Bildung von Bisphenol aus 4-OH-Tamoxifen und Endoxifen nicht zu vernachlässigen, da die Plasmakonzentrationen dieser beiden Metaboliten um mehr als eine Größenordnung höher im Vergleich zu den beiden Isomeren von Metabolit E sind.

Weiterführend wurden erstmals die CYP-Isoenzyme identifiziert, welche die Umsetzung der metabolischen Vorläufer zu Metabolit E und Bisphenol katalysieren. Dabei zeigten die Enzyme CYP3A4, 1A-Isoenzyme und CYP2D6 vergleichbare Bildungsraten von Tamoxifen und DM-Tamoxifen zu Metabolit E, wohingegen CYP2C19 und 2B6 hauptsächlich die Seitenkettenabspaltung von Tamoxifen katalysierten. Da all diese CYP-Enzyme Polymorphismen aufweisen, welche die katalytische Aktivität derselben beeinflussen (Zanger und Schwab 2013), ist es möglich, dass die Aktivität dieser Enzyme als Prädiktoren für die *in vivo* Konzentrationen von Metabolit E im Plasma von Brustkrebspatientinnen dienen kann. Dies wurde in der Analyse des Einflusses genetischer Varianten der CYP-Enzyme auf Plasmakonzentrationen der östrogenen Tamoxifenmetaboliten in prä- und postmenopausalen Frauen der POSH- und IKP211-Studie in 3.5.1.3 und 3.5.2.3 untersucht und wird in 4.3.3 diskutiert. Im Hinblick auf Bisphenol konnte keine Substratspezifität der CYP-Enzyme bezüglich der hydroxylierten Tamoxifenmetaboliten festgestellt werden. Da die anti-östrogenen Metaboliten aufgrund ihrer höheren Plasmakonzentrationen voraussichtlich einen starken Beitrag zu der Bildung von Bisphenol verglichen zu Metabolit E leisten, ist es durch das Mitwirken vieler verschiedener CYP-Enzyme unwahrscheinlich, dass ein pharmakogenetischer Einfluss eines einzelnen Enzyms auf die Plasmakonzentration von Bisphenol identifiziert werden kann. Den Phase II Metabolismus betreffend konnten ebenfalls die UGT-Isoenzyme identifiziert werden, welche Metabolit E und Bisphenol glucuronidieren. Dabei werden UGT1A3 und 2B7 hauptsächlich in der Leber und dem Kolon und UGT1A8 und 1A9 in der Niere und der Harnblase exprimiert (Nakamura et al. 2008) und weisen

genetische Polymorphismen auf, welche die Glucuronidierung der östrogenen Tamoxifenmetaboliten beeinflussen könnten. Darüber hinaus könnten Erkrankungen der Niere, wie z.B. eine Niereninsuffizienz, die Elimination glucuronidierter Substanzen, wie den Phase II Metaboliten von Bisphenol und Metabolit E, erschweren und somit den Therapieverlauf von Tamoxifen weiterführend beeinflussen. Zusammenfassend konnte aufgrund dieser Ergebnisse ein Modell über den Metabolismus von Tamoxifen zu Metabolit E und Bisphenol, welches in Abbildung 26 dargestellt ist, erarbeitet werden.

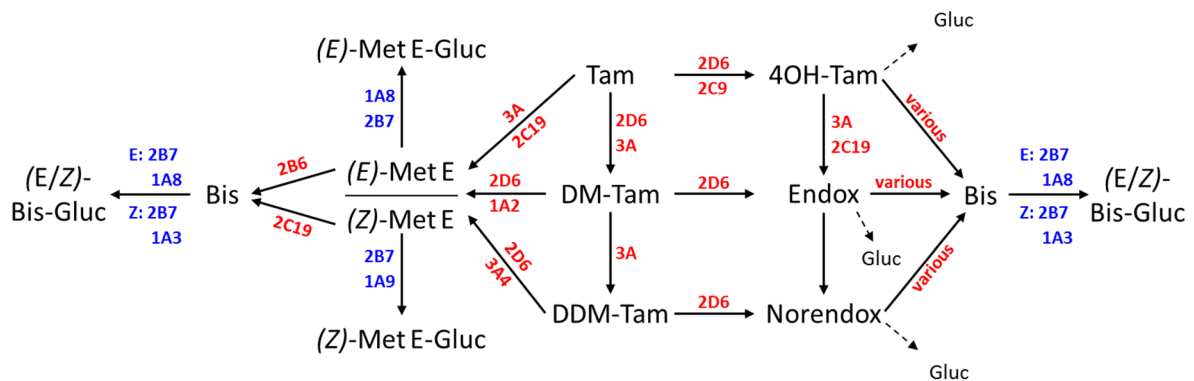


Abbildung 26 Vorgeschlagenes Modell des Tamoxifenmetabolismus zu Bisphenol und Metabolit E sowie dessen Glucuroniden.

Johanning et al. 2017

Die Erfassung der gesamten metabolischen Aktivität von Tamoxifen und der Bildung der östrogenen und anti-östrogenen Metaboliten sowie der entsprechenden Glucuronide wurde in dem während dieser Arbeit etablierten Leberzellmodell der upcyte® Hepatozyten untersucht. Da der Metabolismus zu wichtigen Tamoxifenmetaboliten, wie 4-OH-Tamoxifen und Endoxifen, abhängig von funktionalem CYP2D6 ist, wurden die Hepatozyten upcyte® 653-03 und 653-03 2D6, welche wie oben beschrieben repräsentativ für den PM und EM Phänotyp in der Bevölkerung sind, genutzt. Dabei wurde DM-Tamoxifen, wie erwartet, als Hauptmetabolit identifiziert, welcher nachfolgend weiter hydroxyliert wurde. Darüber hinaus wurde die starke CYP2D6-Abhängigkeit der Bildung von Endoxifen bestätigt, da dieser Metabolit nur im Überstand der 653-03 2D6 Zellen gefunden wurde. Beachtenswert dabei ist, dass das Endoxifen-Glucuronid auch in geringen Konzentrationen in Gegenwart der 653-03 Zellen quantifiziert werden konnte. Bezüglich der östrogenen Metaboliten konnten Bisphenol und beide Isomere von Metabolit E im Kulturmedium beider Zelllinien gefunden werden. Dabei wurde Bisphenol mit bis zu 4-fach höherer Konzentration im Medium der 653-03 2D6 Zellen quantifiziert. Dies weist darauf hin, dass neben der Hydroxylierung von Metabolit E die Seitenkettenabspaltung von Endoxifen

ein wichtiger metabolischer Weg zur Bildung von Bisphenol ist. Der Metabolismus zu beiden Isomeren von Metabolit E sowie das Isoemerenverhältnis war unabhängig vom Aktivitätsstatus des CYP2D6-Enzyms, wie auch schon in den vorangegangenen Experimenten beobachtet. Allerdings waren die Konzentrationen von (*Z*)- und (*E*)-Metabolit E in Gegenwart der 653-03 2D6 Zellen geringfügig niedriger als in der parentalen Zelllinie, was auf eine weiterführende CYP2D6-abhängige Hydroxylierung dieser Substanz deuten könnte. Die Glucuronide der östrogenen Tamoxifenmetaboliten Bisphenol und Metabolit E konnten mit bis zu 10-fach höherer Konzentration im Vergleich zu den unkonjugierten Substanzen im Zellmedium nachgewiesen werden. Dies weist darauf hin, dass die Glucuronidierung ein wichtiger Exkretionsweg für diese Metaboliten ist, wie schon von Lien *et al.* und Poon *et al.* beschrieben wurde (Lien *et al.* 1989; Poon *et al.* 1993). Interessanterweise war das metabolische Verhältnis von (*E*)-Metabolit E zu seinem Glucuronid kleiner als das des (*Z*)-Isomers. Dies weist auf eine schnellere Glucuronidierung des (*E*)-Isomers hin, wie dies schon für die (*E*)-Isomere von 4-OH-Tamoxifen und Endoxifen beobachtet wurde (Sun *et al.* 2006).

4.3.2 Identifikation metabolischer Vorläufer von Bisphenol und Metabolit E *in vivo*

Weiterführend wurde der *in vivo* Metabolismus von Tamoxifen zu Bisphenol und Metabolit E zum ersten Mal in großen Kohorten prä- und postmenopausaler Frauen untersucht. Bisherige Studien zeigten nur die Existenz dieser Metaboliten in Plasmaproben einer kleinen Anzahl von mit Tamoxifen behandelten Brustkrebspatientinnen (Murphy *et al.* 1987; Wiebe *et al.* 1992). Aufgrund der höheren Fallzahlen in den hier untersuchten Studien sowie einer sensitiveren Analytik-Methode konnten die Zusammenhänge von Bisphenol und beiden Isomeren von Metabolit E mit den möglichen metabolischen Vorläufern anhand von Korrelationen untersucht werden. Des Weiteren wurde der Einfluss genetischer Polymorphismen (4.3.3) auf die metabolischen Quotienten, die als Surrogat-Parameter für die Bildungsrate dieser Metaboliten *in vivo* dienen können, analysiert.

Durch die Korrelation der Plasmakonzentrationen zeigte sich in beiden Studien, dass die wichtigsten metabolischen Vorläufersubstanzen von (*Z*)-Metabolit E DM-Tamoxifen und Tamoxifen sind, da hier die höchsten Korrelationskoeffizienten berechnet wurden. In der POSH-Studie mit prämenopausalen Frauen wies die Korrelation zu DDM-Tamoxifen ein höheres R auf als mit Tamoxifen, allerdings wird aufgrund der bis 4-fach höheren Mediankonzentrationen von Tamoxifen *in vivo* diese Substanz vermutlich mehr zu der Bildung von (*Z*)-Metabolit E beitragen als DDM-Tamoxifen. Für das (*E*)-Isomer konnte eine deutlich schlechtere Korrelation zu diesen drei Substanzen beobachtet werden. Einzig die Korrelation zu (*Z*)-Metabolit E erreichte in beiden Studien $R > 0,5$, so dass die Isomerisierung von (*Z*)- zu (*E*)-Metabolit E als wahrscheinlichste Quelle für die Bildung dieses Isomers anzusehen ist. Dies

wird durch die Tatsache unterstützt, dass sowohl Tamoxifen als auch dessen demethylierte Metaboliten ausschließlich als (*Z*)-Isomere vorliegen. Die hohen Korrelationskoeffizienten in den Kohorten prä- und postmenopausaler Frauen weisen darauf hin, dass Bisphenol hauptsächlich aus (*Z*)-Metabolit E gebildet wird. Dies bestätigt die Ergebnisse der HLM- und Supersome™-Experimenten. Da die anti-östrogenen Metaboliten 4-OH-Tamoxifen und Endoxifen allerdings sehr viel höhere Plasmakonzentrationen aufweisen als der östrogene Metabolit E, muss von einem wesentlichen Beitrag dieser Substanzen zur Bildung von Bisphenol ausgegangen werden.

4.3.3 Einfluss genetischer Polymorphismen auf Plasmakonzentrationen von Bisphenol und Metabolit E

Anhand der Einflüsse genetischer Polymorphismen ausgewählter CYP-Enzyme auf die metabolischen Verhältnisse (*metabolic ratio*, MR) von Bisphenol und Metabolit E zu metabolischen Vorläufern können einerseits essentielle Enzyme für die Bildung der östrogenen Metaboliten sowie andererseits mögliche genetische Marker für die Prädiktion der Plasmakonzentrationen dieser Substanzen identifiziert werden.

So wurde in beiden Studien weniger Bisphenol aus Metabolit E gebildet, wenn die Patientinnen mindestens Träger eines nicht-funktionellen *CYP2C19**2-Alleles waren. Dies wird durch die Aktivitätsdaten in Supersomes™ unterstützt, in denen *CYP2C19* die höchste Umsetzung von (*Z*)-Metabolit E zu Bisphenol aufwies. Jedoch konnte kein direkter Einfluss dieses Polymorphismus auf die Plasmakonzentrationen von Bisphenol oder der beiden Isomeren von Metabolit E aufgezeigt werden. Ein Einfluss von *CYP2C19**2 auf die MR von (*E*)-Metabolit E zu DDM-Tamoxifen und auf das Isomerieverhältnis von Metabolit E in der IKP211-Studie konnte nicht in der Kohorte prämenopausaler Frauen oder durch die entsprechende Umsetzung in Supersomes™ bestätigt werden. Der Einfluss von *CYP2C19* auf den Metabolismus und Therapieverlauf von Tamoxifen ist in der Literatur kontrovers diskutiert. So wurde in einigen Studien gezeigt, dass Träger der Polymorphismen *2/*3 und *17 während der Tamoxifentherapie ein verlängertes Überlebensintervall haben (Schroth et al. 2007; Ruiters et al. 2010; Van Schaik et al. 2011; Beelen et al. 2013). Dies könnte mit einer geringeren Bildungsrate von Bisphenol, welcher einen potenteren Agonisten am ER darstellt, aus dem weniger aktiven (*Z*)-Metabolit E erklärt werden. Andere Studien wiederum konnten keinen Effekt der verschiedenen genetischen Varianten von *CYP2C19* auf die Pharmakokinetik oder den Therapieverlauf von Tamoxifen feststellen (Okishiro et al. 2009; Lim et al. 2011; Moyer et al. 2011; Serrano et al. 2011; Chamnanphon et al. 2013). Somit ist unklar ob sich der genetische Polymorphismus von *CYP2C19* für

die Vorhersage des Therapieverlaufs von Tamoxifen oder der Plasmakonzentrationen von Bisphenol und (Z)-Metabolit E eignet.

Des Weiteren wurde in beiden Kohorten mit steigender CYP2D6-Aktivität eine steigende MR von Bisphenol zu (Z)-Metabolit E beobachtet. CYP2D6 ist ein Schlüsselenzym im Tamoxifenstoffwechsel, da durch die Aktivität dieses Enzyms die Plasmakonzentration einer der wichtigsten anti-östrogenen Metaboliten Endoxifen aus DM-Tamoxifen und somit das Therapieansprechen bestimmt wird (Schroth et al. 2010; Madlensky et al. 2011; Goetz et al. 2013; Province et al. 2014; Saladores et al. 2015). Aufgrund der Abhängigkeit dieser beiden Metaboliten von der CYP2D6-Aktivität und der gleichzeitigen Bildung von (Z)-Metabolit E und Bisphenol aus DM-Tamoxifen bzw. Endoxifen, kann der Einfluss der CYP2D6-Aktivität auf die MR Bisphenol/(Z)-Metabolit E ein Epiphänomen sein. Allerdings konnte in der Umsetzung beider Isomere von Metabolit E mit Hilfe von CYP2D6-haltigen Supersomes™ gezeigt werden, dass die Hydroxylierung von Metabolit E zu Bisphenol durch CYP2D6 möglich ist, wobei die Umsatzraten denen der anti-östrogenen Metaboliten zu Bisphenol entsprechen. Somit könnte die CYP2D6-Aktivität einen Einfluss auf die Hydroxylierung von (Z)-Metabolit E zu Bisphenol haben. Diese Beobachtung wird weiterhin durch die Daten des zeitabhängigen Metabolismus in Hepatozyten unterstützt, in denen bei funktionalem CYP2D6 weniger Metabolit E im Kulturmedium der Zellen gefunden wurde, was auf eine CYP2D6-abhängige Umsetzung von Metabolit E zu hydroxylierten Stoffwechselprodukten, wie Bisphenol, deuten kann. Ob die erhöhte Menge an Bisphenol in Anwesenheit der 653-03 2D6 Zellen allerdings auf eine erhöhte Bildung aus (Z)-Metabolit E oder aufgrund der erhöhten Konzentrationen von Endoxifen und 4-OH-Tamoxifen zurückzuführen ist, bleibt unbekannt.

Der Polymorphismus *22 des Enzyms CYP3A4, welcher mit verringerter Enzymaktivität assoziiert ist (Elens et al. 2013; Okubo et al. 2013), zeigte in der prämenopausalen Kohorte einen starken Einfluss auf die MR von (Z)-Metabolit E zu den metabolischen Vorläufersubstanzen Tamoxifen und DM-Tamoxifen. Hier zeigte sich eine deutliche Verminderung der jeweiligen MRs in heterozygoten Trägern im Vergleich zum genetischen Wildtyp. Dieser Einfluss wird durch die hohe CYP3A4-abhängige Umsetzung von Tamoxifen und DM-Tamoxifen zu Metabolit E in den Supersomes™ unterstützt. Da unter den prämenopausalen Studienteilnehmerinnen keine homozygoten Träger des Polymorphismus waren, ist eine weitergehende Untersuchung der MR von (Z)-Metabolit E zu Tamoxifen und DM-Tamoxifen bezüglich CYP3A4*22 bei homozygotem Auftreten des Polymorphismus nötig. Aufgrund fehlender Datenlage konnte der Einfluss nicht in der IKP211-Studie untersucht werden. Kürzlich veröffentlichten Baxter *et al.* die inverse Korrelation von Hitzewallungen unter Tamoxifentherapie mit dem Auftreten des Polymorphismus *22 von CYP3A4 sowie den gefundenen Endoxifenkonzentrationen (Baxter et al. 2014). Somit konnte eine weitere Konsequenz dieses Polymorphismus bezüglich Tamoxifen aufgezeigt werden, so dass die CYP3A4-Aktivität ein direkter

Marker für Variabilität im Tamoxifenmetabolismus zu sein scheint. Wie auch in vorangegangenen Studien, welche keinen Einfluss auf die Pharmakokinetik anderer Tamoxifenmetaboliten oder den Therapieverlauf von Tamoxifen finden konnten, wurde kein Effekt des Polymorphismus *3 von *CYP3A5* auf MRs von Metabolit E beobachtet (Goetz et al. 2005; Tucker et al. 2005; Gjerde et al. 2010; Lim et al. 2011; Sensorn et al. 2013). Dies verdeutlicht, dass obwohl die CYP-Isoenzyme 3A4 und 3A5 zusammen für bis zu 50 % des Fremdstoffwechsels verantwortlich sind (Williams et al. 2002; Zanger und Schwab 2013), alleinig die Aktivität von CYP3A4 in Bezug auf Tamoxifen klinisch relevant ist.

4.4 Pharmakodynamik von Tamoxifenmetaboliten

Fremdstoffe sowie dessen Metaboliten, welche die Aktivität von Fremdstoff-metabolisierenden Enzymen und Transporten beeinflussen, können Änderungen in der Absorption, der Verteilung, dem Metabolismus und der Exkretion (ADME) der Ausgangssubstanz oder weiteren eingenommenen Arzneistoffen und somit Arzneimittelwechselwirkungen hervorrufen sowie zusätzlich den Stoffwechsel endogener Substanzen beeinflussen. Folglich ist es von großer Bedeutung die Auswirkungen der Arzneimittel und dessen Metaboliten auf die Zielgewebe und das fremdstoffwechselnde System zu charakterisieren, um mögliche Wechselwirkungen durch die Therapie vermeiden zu können. In der hier vorgelegten Arbeit wurden erstmalig die Effekte auf das ADME-System, insbesondere auf die Aktivität von CYP-Enzymen und die Genexpression wichtiger Schlüsselproteine, untersucht. Weiterhin wurden die östrogenen Eigenschaften von Bisphenol und Metabolit E als Reinsubstanzen sowie in Konkurrenz zu Östradiol und Endoxifen mit Hilfe eines Luciferase-Reporter-Gen-Assays und in Transkriptomanalysen charakterisiert.

4.4.1 Östrogene Eigenschaften von Bisphenol und Metabolit E

Die östrogenen Eigenschaften von Metabolit E wurden ursprünglich von Johnson *et al.* auf Basis der Expression Östradiol-regulierter mRNA (pNR-1, -2, -25 und Cathepsin D) in MCF7-Zellen sowie deren Östrogen-abhängigen Wachstums nachgewiesen (Johnson et al. 1989). Weiterhin ermittelten Murphy und Kollegen die EC₅₀-Konzentrationen von Metabolit E und Bisphenol im Vergleich zu Östradiol in T47D-Zellen anhand des DNA-Gehalts. Neben den reinen Isomeren von (*Z*)- und (*E*)-Metabolit E wurden hier zusätzlich chemische Varianten verwendet, die aufgrund eines fixierenden Rings (*fixed-ring*) keine Isomerisierung der Substanzen im Zellmedium ermöglichten. In den damaligen Experimenten betragen die EC₅₀-Konzentrationen für Östradiol ca. 5 pM sowie 10 nM für (*Z*)-Metabolit E (*fixed-ring*), 100 pM für (*E*)-Metabolit E und ca. 150 pM für Bisphenol (Murphy et al. 1990). In der vorliegenden Arbeit

wurde die ausschließlich östrogene Wirkung beider Isomere von Metabolit E und Bisphenol mit Hilfe eines Östrogen-abhängigen Luciferasereportergens bestätigt. Die dabei ermittelten EC50-Konzentrationen der Reinsubstanzen sind mit denen der Literatur vergleichbar. Demnach hat das (*E*)-Isomer des Metabolits E die höchste östrogene Aktivität, gefolgt von Bisphenol und (*Z*)-Metabolit E. Lediglich die Werte für (*Z*)-Metabolit E waren im Luciferasereportergenassay um den Faktor 10 niedriger sowie die für Bisphenol ca. 3-fach höher als die von Murphy *et al.* ermittelten Werte. Diese Diskrepanz kann in den unterschiedlichen Endpunktmessungen sowie den längeren Inkubationszeiträumen bei Murphy *et al.* begründet sein. Des Weiteren wurden von Murphy und Kollegen neben den reinen Isomeren *fixed-ring* Varianten benutzt, welche durch die starre Struktur nicht isomerisieren können. Der für (*Z*)-Metabolit E ermittelte EC50-Wert entspricht dabei der *fixed-ring* Variante, da für die nicht-fixierte Form die Datenlage unzureichend war. Zusätzlich kann ein Einfluss der verschiedenen Zellsysteme auf die ermittelten EC50-Konzentrationen nicht ausgeschlossen werden.

Da die untersuchten Metaboliten nach den früheren Arbeiten wie auch im hier eingesetzten Reporter-Gen-Assay eine rein östrogene Wirkung haben, hinsichtlich ihres Gen-induzierenden Potentials jedoch Unterschiede zwischen Bisphenol und Metabolit E existieren (4.4.1), wurde eine systematische Transkriptomanalyse in MCF-7 Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die östrogenen Tamoxifenmetaboliten gleiche Genexpressionsmuster wie die Positivkontrolle Östradiol hervorrufen und sich gleichzeitig stark von dem ER-Antagonisten Endoxifen unterscheiden. Damit wird die rein östrogene Wirkung auf den ER bestätigt. Interessanterweise zeigte Bisphenol auch in der Genanreicherung Östrogen-abhängiger Gene leichte Unterschiede zu Östradiol und Metabolit E, die allerdings nicht eindeutig einem Signal- oder Metabolismusweg zugeordnet werden konnten.

Zusätzlich zu den Reinsubstanzen wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal die östrogene Aktivität von Metabolit E und Bisphenol in Gegenwart physiologischer Konzentrationen von Östradiol und dem anti-östrogen wirksamen Endoxifen ermittelt. Das Östradiol-ähnliche Aktivierungsprofil der drei Metaboliten, mit (*E*)-Metabolit E als stärkstem östrogenen Ligand, wurde weiterhin beobachtet, allerdings verschob sich der EC50 um den Faktor 1000. In der Simulation einer postmenopausalen Situation mit inaktivem CYP2D6 und dadurch erniedrigter Endoxifen-Konzentration (25 pM Östradiol, 9,8 nM Endoxifen) konnte gezeigt werden, dass die östrogenen Tamoxifenmetaboliten den Östrogenrezeptor um den Faktor 1,5 zusätzlich stimulieren können. Dies deutet auf einen möglichen Mechanismus hin, der zu einem Therapieversagen von Tamoxifen beitragen könnte. Dieser Effekt konnte in der prämenopausalen Situation mit hohen Östradiol Konzentrationen (1000 pM) sowie in der Gegenwart hoher Endoxifenkonzentrationen (36,3 nM; CYP2D6 EM) nicht beobachtet werden. Da eine Assoziation von (*E*)-Metabolit E mit dem klinischen Verlauf bei prämenopausalen Frauen in dieser Arbeit jedoch gezeigt wurde (4.5), ist die Simulation der prämenopausalen Situation im gewählten

Zellmodell vermutlich nicht aussagekräftig, so dass weitere Faktoren postuliert werden müssen. Insbesondere sind die Konzentrationen der Metaboliten im Tumor nicht bekannt. In diesem Kontext gibt es Hinweise auf höhere Tumorkonzentrationen von Tamoxifenmetaboliten im Vergleich zu zirkulierenden Plasmawerten (Lien et al. 1989; Lien et al. 1991; Kisanga et al. 2004) sowie einem veränderten Verhältnis der Isomere in Tumorproben von Patientinnen mit Tamoxifen-resistenten Mammakarzinomen (Osborne et al. 1991; Osborne und Fuqua 1994). Daher ist es möglich, dass im Tumorgewebe Konzentrationen von Bisphenol und Metabolit E erreicht werden, welche eine Aktivierung des Östrogenrezeptors verursachen könnten. Die Hypothese einer Akkumulation kritischer Metaboliten im Tumorgewebe konnte in dieser Arbeit nicht untersucht werden: Frischgewebe aus resektiertem Brusttumorgewebe von Tamoxifen behandelten Patientinnen mit lokalem Rezidiv konnte trotz eigens dafür beantragter Studienprotokolle in Kollaboration mit der *American University of Beirut* (Libanon) sowie am Robert-Bosch-Krankenhaus nicht gewonnen werden, um einen gepaarten Vergleich zwischen Plasma- und Gewebekonzentrationen durchzuführen. Ein mögliches Versuchsdesign um diese Limitation zukünftig zu überwinden ist die Analyse von Biopsiematerial aus Brusttumorgewebe unter neoadjuvanter Tamoxifenbehandlung mit zeitgleicher Quantifizierung der Plasmakonzentrationen.

4.4.1 Einfluss auf die CYP-Aktivität und die Expression ADME-assoziiierter Gene

Wie oben beschrieben, ist die Charakterisierung der erwünschten und unerwünschten pharmakodynamischen Wirkungen von Fremdstoffen essentiell, um mögliche Arzneimittelwechselwirkungen zu vermeiden. Liu und Kollegen wiesen eine Hemmung von CYP2C19 und der Aromatase CYP19A1 durch Norendoxifen nach (Liu et al. 2013). Zusätzlich wurde die Hemmung der Aromatase durch Endoxifen gezeigt (Lu et al. 2012), was auf einen dualen therapeutischen Effekt durch Tamoxifen in der postmenopausalen Situation hinweist (Blockade des ER plus Hemmung der peripheren Östrogensynthese aus Androgenen). Neben diesen therapeutisch erwünschten pharmakodynamischen Effekten verweisen frühere Arbeiten auf die Induktion von CYP3A4 durch Tamoxifen und 4-OH-Tamoxifen (Sane et al. 2008), die eine mögliche Ursache von Arzneimittelwechselwirkungen darstellen kann. In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die östrogenen Tamoxifenmetaboliten Bisphenol und Metabolit E in die Untersuchung der Modulation der Aktivität von CYP-Enzymen und der Expression ADME-assoziiierter Gene miteingeschlossen. Dabei konnte die Induktion der CYP3A4-Aktivität durch Tamoxifen und 4-OH-Tamoxifen bestätigt werden, während Bisphenol die Aktivität aller getesteten CYP-Enzyme ähnlich zu Rifampicin und Phenobarbital stark induzierte. Metabolit E hingegen zeigte nur geringe Induktionen von CYP3A4 und 2C9. Da die ermittelten EC50-Konzentrationen höher waren als die beobachteten Plasmakonzentrationen in

Tamoxifen behandelten Patientinnen, ist eine Anreicherung der östrogenen Metaboliten im Gewebe, wie für andere Tamoxifenmetaboliten beobachtet (Lien et al. 1989; Lien et al. 1991; Kisanga et al. 2004), nötig, um die CYP-Enzyme *in vivo* zu induzieren. Bemerkenswert ist, dass Östradiol im Lebermodell keinen Einfluss auf die Aktivität der CYP-Enzyme aufwies, so dass die Induktion der Enzymaktivität durch östrogene Tamoxifenmetaboliten in der Leber vermutlich unabhängig der östrogenen Eigenschaften ist. Da die Genexpression von CYP3A4 nach Behandlung mit Tamoxifen, 4-OH-Tamoxifen, Bisphenol und (*E*)-Metabolit E erhöht war, ist eine PXR-abhängige Regulation der Genexpression dieses Enzyms sehr wahrscheinlich (Sane et al. 2008). Die Induktion von CYP-Enzymen, insbesondere CYP3A4, kann die Plasmakonzentrationen bzw. die therapeutische Wirkkonzentration von Komedikationen beeinflussen. Diese Interaktion wurde für die gleichzeitige Gabe des Aromatasehemmers Letrozol und Tamoxifen beobachtet, welche die Konzentrationen aktiver Letrozolmetaboliten im Plasma reduzierte (Dowsett 1999). Daraus muss geschlossen werden, dass die gleichzeitige Behandlung von Zweiterkrankungen während der endokrinen Langzeittherapie mit Tamoxifen hinsichtlich der Verstoffwechslung der eingesetzten Medikamente durch CYP3A4 berücksichtigt werden muss, um reduzierte Wirkspiegelkonzentrationen und damit ein vermindertes Ansprechen auf die Zweitbehandlung zu vermeiden.

Neben der Induktion von ADME-Genen wurde in dieser Arbeit eine Inhibition der Enzymaktivität der CYP2C-Familie durch 4-OH-Tamoxifen, Endoxifen und Norendoxifen beobachtet. Da die ermittelten IC50-Konzentrationen im Lebermodell höher waren als die im Plasma quantifizierten Konzentrationen, ist analog des Mechanismus der Induktion eine Gewebeanreicherung für die Inhibition der Enzyme *in vivo* notwendig (Lien et al. 1989; Lien et al. 1991; Kisanga et al. 2004). Da die mRNA-Expression der entsprechenden Gene nicht erniedrigt war, ist ein Mechanismus auf Enzymebene wahrscheinlich. Hier ist ein kompetitiver Inhibitionsmechanismus, wie schon für die Interaktion von Norendoxifen und CYP2C19 beschrieben (Liu et al. 2013), oder eine allosterische Interaktion, wie für Endoxifen und Norendoxifen bei der Hemmung der Aromatase postuliert (Lu et al. 2012), durch die hydroxylierten Tamoxifenmetaboliten denkbar. Interessanterweise zeigen die östrogenen Metaboliten Bisphenol und Metabolit E keine Hemmung auf die Aktivität der CYP-Enzyme. Es liegt daher nahe, dass die Seitenkette von Tamoxifen und seinen Metaboliten eine strukturelle Bedingung für die Inhibition darstellt. Insbesondere könnte der Methylierungsstatus der Seitenkette funktionell relevant sein, da Norendoxifen (demethyliert) alle CYP2C-Enzyme inhibierte, während 4-OH-Tamoxifen (methyliert) einzig die Aktivität von CYP2C8 hemmte.

Da 10 % aller Arzneimittel, inklusive Zytostatika, Antikoagulanzen und Protonenpumpeninhibitoren, durch Enzyme der CYP2C-Familie metabolisiert werden, muss während der langfristigen Tamoxifentherapie auf die Arzneimittelwechselwirkung von CYP2C-Substraten geachtet werden, wenn solche zur Behandlung von Komorbiditäten eingesetzt werden, um Toxizitäten zu vermeiden. Ob die

Inhibition anti-östrogener Tamoxifenmetaboliten und Bisphenol auf die Genexpression der SLC-Transporter den Metabolismus und die Distribution anderer Xenobiotika beeinflusst, bleibt zu erörtern. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die anti-östrogenen und östrogenen Tamoxifenmetaboliten nicht nur unterschiedlich am ER agieren (Jordan und Gosden 1982), sondern auch unterschiedliche Wirkungen auf das ADME-System haben. Durch diese Eigenschaften könnten bislang übersehene Begleiteffekte der Tamoxifentherapie auf die Modulation anderer Proteine und Rezeptoren erklärt werden.

4.4.2 Einfluss der Tamoxifentherapie auf die Plasmakonzentrationen von Sexualhormonen in postmenopausalen Frauen

Für die weitergehende Charakterisierung der Pharmakodynamik von Tamoxifen und dessen Metaboliten wurde der Einfluss der Therapie auf die Konzentration der Sexualhormone in postmenopausalen Frauen untersucht, welcher z.B. Nebenwirkungen hervorrufen könnte. Diese postulierte Rückkopplung geht auf frühere Studien bei prämenopausalen Frauen zurück, bei denen eine 2-3-fache Erhöhung von Östradiol und Progesteron während der Tamoxifentherapie nachgewiesen wurden (Groom und Griffiths 1976; Sherman et al. 1979; Ravdin et al. 1988; Jordan et al. 1991). Für postmenopausale Brustkrebspatientinnen ist die Datenlage allerdings widersprüchlich (Willis et al. 1977; Boccardo et al. 1984; Számel et al. 1986; Lonning et al. 1995; Kostoglou-Athanassiou et al. 1997; Lum et al. 1997; Rossi et al. 2009). Dies könnte durch die niedrigen Konzentrationen der Östrogene und Progesteron in dieser Patientengruppe begründet sein, welche nahe der Detektionsgrenzen vieler Quantifizierungsmethoden liegen. Darüber hinaus umfassen die wenigen verfügbaren Studien jeweils nur eine geringe Anzahl an Patientinnen, so dass die Aussagekraft eingeschränkt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Tamoxifentherapie auf die *in vivo* Konzentrationen der Sexualhormone in einer größeren Kohorte postmenopausaler Frauen mit Hilfe aktueller Quantifizierungsmethoden (HPLC-MS/MS) analysiert. Dabei wurde bei zwei Dritteln der Patientinnen ein Anstieg von Östron und Testosteron um jeweils 13 % bzw. 11 % und eine Erniedrigung der MR von Androstendion zu Testosteron um 27 % beobachtet. Ein Einfluss der Tamoxifentherapie auf die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, welche die Reaktion von Androstendion zu Testosteron katalysiert, kann nicht ausgeschlossen werden. Da keine Veränderung auf das Verhältnis von Östron zu Östradiol, dessen Reaktion ebenfalls von der Dehydrogenase abhängig ist, beobachtet wurde, ist eine veränderte Enzymaktivität durch Tamoxifen und dessen Metaboliten trotzdem unwahrscheinlich. Da neben Androstendion auch die Plasmakonzentrationen der biologisch aktiveren Steroidhormone Östradiol und Progesteron im Median nicht signifikant verändert waren, ist eine Einschätzung der klinischen Relevanz eines Anstiegs der Östron- und Testosteronkonzentrationen unter

Tamoxifentherapie nicht möglich. Allerdings scheinen, im Gegensatz zur prämenopausalen Situation, die Steroidkonzentrationen in postmenopausalen Frauen durch die Tamoxifentherapie kaum beeinflusst zu werden.

4.5 Einfluss von Bisphenol und Metabolit E auf den Therapieverlauf

Aufgrund der rein östrogenen Eigenschaften der Tamoxifenmetaboliten Bisphenol und beider Isomere von Metabolit E in Brustgewebe, wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein geänderter Metabolismus im Zielgewebe zu diesen Metaboliten ein möglicher Grund für die Tamoxifenresistenz mancher Mammakarzinome ist (Wiebe et al. 1992). Diese Überlegung wurde später von Osborne und Fuqua allerdings verworfen, da Tamoxifenanaloga, welche durch eine geschützte Seitenkette nicht zu Metabolit E metabolisiert werden konnten, trotzdem zum Tumorwachstum gegenüber Tamoxifenresistenter Xenotransplantate in Mäusen führten (Osborne und Fuqua 1994). Allerdings konnte in vielen Studien gezeigt werden, dass Tamoxifenmetaboliten wie Endoxifen das Therapieansprechen beeinflussen und somit Faktoren bilden, um den Erfolg oder das Versagen der Tamoxifentherapie zu prognostizieren (Madlensky et al. 2011; Saladores et al. 2015; Helland et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Nachweis über einen Zusammenhang zwischen dem klinischen Verlauf von Brustkrebspatientinnen unter Tamoxifentherapie und den Plasmakonzentrationen der östrogenen Tamoxifenmetaboliten gezeigt. Dabei konnte in einer Kohorte prämenopausaler Frauen gezeigt werden, dass ein hohes (*E*)-Metabolit E zu Tamoxifen Konzentrationsverhältnis das Risiko erhöht an einem Brustkrebsrezidiv zu erkranken sowie das rezidivfreie Überleben zu verkürzen. Diese Assoziation wurde weder mit dem (*Z*)-Isomer von Metabolit E noch mit Bisphenol beobachtet, ein Befund, der sich mit den *in vitro* Daten deckt, nachdem (*E*)-Metabolit E das stärkste östrogene Potential hat. Demnach können sowohl konstitutionelle wie auch Tumorfaktoren, die zu einer Anreicherung beispielsweise über einen aktivierten Stoffwechsel oder Transport des (*E*)-Isomer des Metaboliten E im Tumor führen als Faktor postuliert werden, die den Therapieerfolg von Tamoxifen beeinflussen. Zukünftige Arbeiten sollten daher zum Ziel haben, molekulare oder pharmakogenetische Biomarker zur Vorhersage der (*E*)-Metabolit E Plasmakonzentration unter Tamoxifen zu identifizieren, um damit einen Beitrag zur personalisierten Tamoxifentherapie bei Brustkrebs zu leisten.

Literaturverzeichnis

- Abdi H (2007): Bonferroni and Šidák corrections for multiple comparisons. *Encycl Meas Stat* 3, 103–107
- AGO Breast Committee Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer. Recommendations 2017. www.ago-online.de.
- Althuis MD, Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Brinton LA, Madigan MP, Sherman ME (2004): Etiology of hormone receptor–defined breast cancer: a systematic review of the literature. *Cancer Epidemiol Prev Biomark* 13, 1558–1568
- Aninat C, Piton A, Glaise D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A (2005): Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos*
- Antunes MV, De Oliveira V, Raymundo S, Staudt DE, Gössling G, Biazús JV, Cavalheiro JA, Rosa DD, Mathy G, Wallemacq P, others (2015): CYP3A4* 22 is related to increased plasma levels of 4-hydroxytamoxifen and partially compensates for reduced CYP2D6 activation of tamoxifen. *Pharmacogenomics* 16, 601–617
- Armeanu-Ebinger S, Wenz J, Seitz G, Leuschner I, Handgretinger R, Mau-Holzmann UA, Bonin M, Sipos B, Fuchs J, Warmann SW (2012): Characterisation of the Cell Line HC-AFW1 Derived from a Pediatric Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE* 7, e38223
- Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L (2012): Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol* 9, 16–32
- Ayrton A, Morgan P (2001): Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica* 31, 469–497
- Barnes B, Kraywinkel K (2017): Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.
- Baxter SD, Teft WA, Choi Y-H, Winqvist E, Kim RB (2014): Tamoxifen-associated hot flash severity is inversely correlated with endoxifen concentration and CYP3A4* 22. *Breast Cancer Res Treat* 145, 419–428
- Beelen K, Opdam M, Severson T, Koornstra R, Vincent A, Hauptmann M, van Schaik R, Berns E, Vermorken J, Van Diest P, others (2013): CYP2C19* 2 predicts substantial tamoxifen benefit in postmenopausal breast cancer patients randomized between adjuvant tamoxifen and no systemic treatment. *Breast Cancer Res Treat* 139, 649–655
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995): Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol* 289–300
- Bertilsson L (1995): Geographical/Interracial Differences in Polymorphic Drug Oxidation. *Clin Pharmacokinet* 29, 192–209
- Binkhorst L, Mathijssen RH, Jager A, van Gelder T (2015): Individualization of tamoxifen therapy: much more than just CYP2D6 genotyping. *Cancer Treat Rev* 41, 289–299

- Blair IA (2010): Analysis of estrogens in serum and plasma from postmenopausal women: Past present, and future. *Steroids* 75, 297–306
- Boccardo F, Guarneri D, Rubagotti A, Casertelli GL, Bentivoglio G, Conte N, Campanella G, Gaggero G, Comelli G, Zanardi S (1984): Endocrine effects of tamoxifen in postmenopausal breast cancer patients. *Tumori* 70, 61–68
- Braeuning A, Thomas M, Hofmann U, Vetter S, Zeller E, Petzuch B, Johanning J, Schroth W, Weiss TS, Zanger UM, others (2015): Comparative analysis and functional characterization of HC-AFW1 hepatocarcinoma cells: CYP expression and induction by nuclear receptor agonists. *Drug Metab Dispos* dmd-115
- Brauch H, Mürdter TE, Eichelbaum M, Schwab M (2009): Pharmacogenomics of Tamoxifen Therapy. *Clin Chem* 55, 1770–1782
- Brauch H, Schroth W, Goetz MP, Mürdter TE, Winter S, Ingle JN, Schwab M, Eichelbaum M (2013): Tamoxifen use in postmenopausal breast cancer: CYP2D6 matters. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 31, 176–180
- Bressler R, Bahl JJ: Principles of drug therapy for the elderly patient; in: Mayo clinic proceedings, Band 78; Elsevier 2003, 1564–1577
- Brinton LA, Schairer C, Hoover RN, Fraumeni JF (1988): Menstrual factors and risk of breast cancer. *Cancer Invest* 6, 245–254
- Burkard A, Dähn C, Heinz S, Zutavern A, Sonntag-Buck V, Maltman D, Przyborski S, Hewitt NJ, Braspenning J (2012): Generation of proliferating human hepatocytes using upcyte[®] technology: characterisation and applications in induction and cytotoxicity assays. *Xenobiotica* 42, 939–956
- Butler JM, Begg EJ (2008): Free Drug Metabolic Clearance in Elderly People. *Clin Pharmacokinet* 47, 297–321
- Butt AJ, McNeil CM, Musgrove EA, Sutherland RL (2005): Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. *Endocr Relat Cancer* 12, S47–S59
- Caraci F, Crupi R, Drago F, Spina E (2011): Metabolic drug interactions between antidepressants and anticancer drugs: focus on selective serotonin reuptake inhibitors and hypericum extract. *Curr Drug Metab* 12, 570–577
- Cariou S, Donovan JC, Flanagan W, Milic A, Bhattacharya N, Slingerland JM (2000): Down-regulation of p21WAF1/CIP1 or p27Kip1 abrogates antiestrogen-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 97, 9042–9046
- Castell JV, Jover R, Martínez-Jiménez CP, Gómez-Lechón MJ (2006): Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2, 183–212
- Chamnanphon M, Pechatanan K, Sirachainan E, Trachu N, Chantratita W, Pasomsub E, Noonpakdee W, Sensorn I, Sukasem C (2013): Association of CYP2D6 and CYP2C19 polymorphisms and disease-free survival of Thai post-menopausal breast cancer patients who received adjuvant tamoxifen. *Pharmacogenomics Pers Med* 6, 37

- Chan E, McLachlan A, O'reilly R, Rowland M (1994): Stereochemical aspects of warfarin drug interactions: Use of a combined pharmacokinetic-pharmacodynamic model. *Clin Pharmacol Ther* 56, 286–294
- Chen J, Raymond K (2006): Roles of rifampicin in drug-drug interactions: underlying molecular mechanisms involving the nuclear pregnane X receptor. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5, 3
- Choi HK, Yang JW, Roh SH, Han CY, Kang KW (2007): Induction of multidrug resistance associated protein 2 in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 14, 293–303
- Coezy E, Borgna J-L, Rochefort H (1982): Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. *Cancer Res* 42, 317–323
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2001): Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *The Lancet* 358, 1389–1399
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2012): Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol* 13, 1141–1151
- Coller J (2003): Oxidative metabolism of tamoxifen to Z-4-hydroxy-tamoxifen by cytochrome P450 isoforms: An appraisal of in vitro studies. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30, 845–848
- Coller JK, Krebsfaenger N, Klein K, Endrizzi K, Wolbold R, Lang T, Nüssler A, Neuhaus P, Zanger UM, Eichelbaum M, others (2002): The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the potent antioestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver. *Br J Clin Pharmacol* 54, 157–167
- Coombes R, Powles T, Rees L, Ratcliffe W, Nash A, Henk M, Ford H, Gazet J, Neville A (1982): Tamoxifen, aminoglutethimide and danazol: effect of therapy on hormones in post-menopausal patients with breast cancer. *Br J Cancer* 46, 30
- Copson E, Eccles B, Maishman T, Gerty S, Stanton L, Cutress RI, Altman DG, Durcan L, Simmonds P, Lawrence G, others (2013): Prospective observational study of breast cancer treatment outcomes for UK women aged 18–40 years at diagnosis: the POSH study. *J Natl Cancer Inst* 105, 978–988
- Crewe HK, Notley LM, Wunsch RM, Lennard MS, Gillam EM (2002): Metabolism of Tamoxifen by Recombinant Human Cytochrome P450 Enzymes: Formation of the 4-Hydroxy, 4'-Hydroxy and N-Desmethyl Metabolites and Isomerization of trans-4-Hydroxytamoxifen. *Drug Metab Dispos* 30, 869–874
- Davies C, Pan H, Godwin J, Gray R, Arriagada R, Raina V, Abraham M, Medeiros Alencar VH, Badran A, Bonfill X, et al. (2013): Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet* 381, 805–816
- Daxenbichler G, Margreiter R, Dapunt O: Changes in serum hormone levels after tamoxifen treatment; in: *Cancer treatment reports*, Band 63; PUBLIC HEALTH SERVICE, US DEPTHEALTH & HUMAN SERVICES RA BLOCH INT CANCER INF CENTER ROOM 213 9030 OLD GEORGETOWN RD, BETHESDA, MD 20814 USA 1979, 1213–1213

- De Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart M, Paesmans M (2007): Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *Br J Cancer* 96, 1504–1513
- Desta Z (2004): Comprehensive Evaluation of Tamoxifen Sequential Biotransformation by the Human Cytochrome P450 System in Vitro: Prominent Roles for CYP3A and CYP2D6. *J Pharmacol Exp Ther* 310, 1062–1075
- Desta Z, Zhao X, Shin J-G, Flockhart DA (2002): Clinical Significance of the Cytochrome P450 2C19 Genetic Polymorphism. *Clin Pharmacokinet* 41, 913–958
- Dickschen K, Willmann S, Thelen K, Lippert J, Hempel G, Eissing T (2012): Physiologically based pharmacokinetic modeling of tamoxifen and its metabolites in women of different CYP2D6 phenotypes provides new insight into the tamoxifen mass balance. *Front Pharmacol* 3
- Dickschen KJ, Willmann S, Hempel G, Block M (2017): Addressing Adherence Using Genotype-Specific PBPK Modeling—Impact of Drug Holidays on Tamoxifen and Endoxifen Plasma Levels. *Front Pharmacol* 8, 67
- Dite GS, Jenkins MA, Southey MC, Hocking JS, Giles GG, McCredie MR, Venter DJ, Hopper JL (2003): Familial risks, early-onset breast cancer, and BRCA1 and BRCA2 germline mutations. *J Natl Cancer Inst* 95, 448–457
- Dowsett M (1999): Drug and hormone interactions of aromatase inhibitors. *Endocr Relat Cancer* 6, 181–185
- Dowsett M, Stein R, Coombes R (1992): Aromatization inhibition alone or in combination with GnRH agonists for the treatment of premenopausal breast cancer patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43, 155–159
- Doyle A, Griffiths J, Newell D (1993): Trypan blue exclusion method for cell viability estimation. *Cell Tissue Cult Lab Proced Lond Wiley* 4, 5–2
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2005): Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 365, 1687–1717
- Eccles D, Gerty S, Simmonds P, Hammond V, Ennis S, Altman DG (2007): Prospective study of Outcomes in Sporadic versus Hereditary breast cancer (POSH): study protocol. *BMC Cancer* 7, 160
- Elens L, Van Gelder T, Hesselink DA, Haufroid V, Van Schaik RH (2013): CYP3A4* 22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy. *Pharmacogenomics* 14, 47–62
- Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group (2003): Free estradiol and breast cancer risk in postmenopausal women: comparison of measured and calculated values. *Cancer Epidemiol Prev Biomark* 12, 1457–1461
- Fanelli F, Belluomo I, Di Lallo VD, Cuomo G, De Iasio R, Baccini M, Casadio E, Casetta B, Vicennati V, Gambineri A, others (2011): Serum steroid profiling by isotopic dilution-liquid chromatography–mass spectrometry: comparison with current immunoassays and reference intervals in healthy adults. *Steroids* 76, 244–253

- Feidt DM, Klein K, Hofmann U, Riedmaier S, Knobloch D, Thasler WE, Weiss TS, Schwab M, Zanger UM (2010): Profiling Induction of Cytochrome P450 Enzyme Activity by Statins Using a New Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Cocktail Assay in Human Hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 38, 1589–1597
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015): Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136
- Fernández-Santander A, Gaibar M, Novillo A, Romero-Lorca A, Rubio M, Chicharro LM, Tejerina A, Bandrés F (2013): Relationship between Genotypes Sult1a2 and Cyp2d6 and Tamoxifen Metabolism in Breast Cancer Patients. *PLOS ONE* 8, e70183
- Ferrara CM, Lynch NA, Nicklas BJ, Ryan AS, Berman DM (2002): Differences in adipose tissue metabolism between postmenopausal and perimenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 4166–4170
- Fiers T, Casetta B, Bernaert B, Vandersypt E, Debock M, Kaufman J-M (2012): Development of a highly sensitive method for the quantification of estrone and estradiol in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivatization. *J Chromatogr B* 893–894, 57–62
- Food US, Administration D, others (2015): Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics. *Guid Ind* 1–15
- Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (2012): *Pharmakologie und Toxikologie. Von Den Mol Grundlagen Zur Pharmakother Mit* 129
- Fromson JM, Pearson S, Bramah S (1973): The metabolism of tamoxifen (ICI 46,474) Part I: in laboratory animals. *Xenobiotica* 3, 693–709
- Furr B, Jordan V (1984): The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. *Pharmacol Ther* 25, 127–205
- Gjerde J, Hauglid M, Breilid H, Lundgren S, Varhaug JE, Kisanga ER, Mellgren G, Steen VM, Lien EA (2007): Effects of CYP2D6 and SULT1A1 genotypes including SULT1A1 gene copy number on tamoxifen metabolism. *Ann Oncol* 19, 56–61
- Gjerde J, Geisler J, Lundgren S, Ekse D, Varhaug JE, Mellgren G, Steen VM, Lien EA (2010): Associations between tamoxifen, estrogens, and FSH serum levels during steady state tamoxifen treatment of postmenopausal women with breast cancer. *BMC Cancer* 10, 313
- Goetz MP, Rae JM, Suman VJ, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, Reynolds C, Couch FJ, Lingle WL, Flockhart DA, others (2005): Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol* 23, 9312–9318
- Goetz MP, Suman VJ, Hoskin TL, Gnant M, Filipits M, Safgren SL, Kuffel M, Jakesz R, Rudas M, Greil R, et al. (2013): CYP2D6 metabolism and patient outcome in the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group trial (ABCSCG) 8. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 19, 500–507
- Goetz MP, Suman VJ, Reid JM, Northfelt DW, Mahr MA, Ralya AT, Kuffel M, Buhrow SA, Safgren SL, McGovern RM, others (2017): First-in-human phase I study of the tamoxifen metabolite Z-endoxifen in women with endocrine-refractory metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 35, 3391–3400

- Golder MP, Elizabeth M, Phillips A, Fahmy DR, Preece PE, Jones V, Henk JM, Griffiths K (1976): Plasma hormones in patients with advanced breast cancer treated with tamoxifen. *Eur J Cancer* **1965** 12, 719–723
- Goodwin B, Hodgson E, Liddle C (1999): The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Mol Pharmacol* **56**, 1329–1339
- Gorski JC, Vannaprasaht S, Hamman MA, Ambrosius WT, Bruce MA, Haehner-Daniels B, Hall SD (2003): The effect of age, sex, and rifampin administration on intestinal and hepatic cytochrome P450 3A activity. *Clin Pharmacol Ther* **74**, 275–287
- Goss PE, Strasser K (2001): Aromatase inhibitors in the treatment and prevention of breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* **19**, 881–894
- Gottardis MM, Robinson SP, Satyaswaroop PG, Jordan VC (1988): Contrasting actions of tamoxifen on endometrial and breast tumor growth in the athymic mouse. *Cancer Res* **48**, 812–815
- Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, Cannie I, Guyomard C, Lucas J, Trepo C, Guguen-Guillouzo C (2002): Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci* **99**, 15655–15660
- Groom G, Griffiths K (1976): Effect of the anti-oestrogen tamoxifen on plasma levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, oestradiol and progesterone in normal premenopausal women. *J Endocrinol* **70**, 421–428
- Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C (2007): The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact* **168**, 66–73
- Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, Schiff R, Osborne CK, Dowsett M (2005): Molecular Changes in Tamoxifen-Resistant Breast Cancer: Relationship Between Estrogen Receptor, HER-2, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *J Clin Oncol* **23**, 2469–2476
- Hankinson SE, Eliassen AH (2007): Endogenous estrogen, testosterone and progesterone levels in relation to breast cancer risk. *J Steroid Biochem Mol Biol* **106**, 24–30
- Harper M, Walpole A (1967): A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats. *J Reprod Fertil* **13**, 101–119
- Heine R, Binkhorst L, Graan AJM, Bruijn P, Beijnen JH, Mathijssen RH, Huitema AD (2014): Population pharmacokinetic modelling to assess the impact of CYP2D6 and CYP3A metabolic phenotypes on the pharmacokinetics of tamoxifen and endoxifen. *Br J Clin Pharmacol* **78**, 572–586
- Helland T, Henne N, Bifulco E, Naume B, Borgen E, Kristensen VN, Kvaløy JT, Lash TL, Alnæs GI, van Schaik RH, others (2017): Serum concentrations of active tamoxifen metabolites predict long-term survival in adjuvantly treated breast cancer patients. *Breast Cancer Res* **19**, 125
- Honkakoski P, Zelko I, Sueyoshi T, Negishi M (1998): The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol* **18**, 5652–5658

- Honma N, Horii R, Iwase T, Saji S, Younes M, Takubo K, Matsuura M, Ito Y, Akiyama F, Sakamoto G (2008): Clinical importance of estrogen receptor- β evaluation in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen therapy. *J Clin Oncol* 26, 3727–3734
- Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, Hochtin-Boes G, Houghton J, Locker G, Tobias J, others (2005): Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 365, 60–62
- Inic Z, Zegarac M, Inic M, Markovic I, Kozomara Z, Djuricic I, Inic I, Pupic G, Jancic S (2014): Difference between Luminal A and Luminal B Subtypes According to Ki-67, Tumor Size, and Progesterone Receptor Negativity Providing Prognostic Information. *Clin Med Insights Oncol* 8, 107–111
- Jin Y, Desta Z, Stearns V, Ward B, Ho H, Lee K-H, Skaar T, Storniolo AM, Li L, Araba A, et al. (2005): CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 97, 30–39
- Johänning J, Heinkele G, Precht JC, Brauch H, Eichelbaum M, Schwab M, Schroth W, Mürdter TE (2015): Highly sensitive simultaneous quantification of estrogenic tamoxifen metabolites and steroid hormones by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*
- Johänning J, Kröner P, Thomas M, Zanger UM, Nörenberg A, Eichelbaum M, Schwab M, Brauch H, Schroth W, Mürdter TE (2017): The formation of estrogen-like tamoxifen metabolites and their influence on enzyme activity and gene expression of ADME genes. *Arch Toxicol* 1–14
- Johnson M, Westley B, May F (1989): Oestrogenic activity of tamoxifen and its metabolites on gene regulation and cell proliferation in MCF-7 breast cancer cells. *Br J Cancer* 59, 727
- Johnston SRD, Dowsett M (2003): Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. *Nat Rev Cancer* 3, 821
- Jordan V, COLLINS MM, ROWSBY L, Prestwich G (1977): A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity. *J Endocrinol* 75, 305–316
- Jordan VC (1982): Metabolites of tamoxifen in animals and man: identification, pharmacology, and significance. *Breast Cancer Res Treat* 2, 123–138
- Jordan VC, Gosden B (1982): Importance of the alkylaminoethoxy side-chain for the estrogenic and antiestrogenic actions of tamoxifen and trioxifene in the immature rat uterus. *Mol Cell Endocrinol* 27
- Jordan VC, Fritz NF, Langan-Fahey S, Thompson M, Tormey DC (1991): Alteration of endocrine parameters in premenopausal women with breast cancer during long-term adjuvant therapy with tamoxifen as the single agent. *JNCI J Natl Cancer Inst* 83, 1488–1491
- Katzenellenbogen BS, Norman MJ, Eckert RL, Peltz SW, Mangel WF (1984): Bioactivities, estrogen receptor interactions, and plasminogen activator-inducing activities of tamoxifen and hydroxytamoxifen isomers in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 44, 112–119
- Kelsey JL, Gammon MD, John EM (1993): Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 15, 36–47
- Kinirons M, O'mahony M (2004): Drug metabolism and ageing. *Br J Clin Pharmacol* 57, 540–544

- Kisanga ER, Gjerde J, Guerrieri-Gonzaga A, Pigatto F, Pesci-Feltri A, Robertson C, Serrano D, Pelosi G, Decensi A, Lien EA (2004): Tamoxifen and metabolite concentrations in serum and breast cancer tissue during three dose regimens in a randomized preoperative trial. *Clin Cancer Res* 10, 2336–2343
- Kiyotani K, Mushiroda T, Imamura CK, Hosono N, Tsunoda T, Kubo M, Tanigawara Y, Flockhart DA, Desta Z, Skaar TC, et al. (2010): Significant effect of polymorphisms in CYP2D6 and ABCC2 on clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 28, 1287–1293
- Kiyotani K, Mushiroda T, Imamura CK, Tanigawara Y, Hosono N, Kubo M, Sasa M, Nakamura Y, Zembutsu H (2012): Dose-adjustment study of tamoxifen based on CYP2D6 genotypes in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 131, 137–145
- Klein DJ, Thorn CF, Desta Z, Flockhart DA, Altman RB, Klein TE (2013): PharmGKB summary: tamoxifen pathway, pharmacokinetics. *Pharmacogenet Genomics* 23, 643–647
- Klein M, Thomas M, Hofmann U, Seehofer D, Damm G, Zanger UM (2014): A Systematic Comparison of the Impact of Inflammatory Signaling on Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Gene Expression and Activity in Primary Human Hepatocytes and HepaRG Cells. *Drug Metab Dispos* 43, 273–283
- Kostoglou-Athanassiou I, Ntalles K, Gogas J, Markopoulos C, Alevizou-Terzaki V, Athanassiou P, Georgiou E, Proukakis C (1997): Sex hormones in postmenopausal women with breast cancer on tamoxifen. *Hormones* 47, 116–120
- Krishna DR, Klotz U (1994): Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet* 26, 144–160
- Krisnamurti DGB, Louisa M, Anggraeni E, Wanandi SI (2016): Drug efflux transporters are overexpressed in short-term tamoxifen-induced MCF7 breast cancer cells. *Adv Pharmacol Sci* 2016
- Kruskal WH, Wallis WA (1952): Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J Am Stat Assoc* 47, 583–621
- Kushnir MM, Rockwood AL, Bergquist J, Varshavsky M, Roberts WL, Yue B, Bunker AM, Meikle AW (2008): High-sensitivity tandem mass spectrometry assay for serum estrone and estradiol. *Am J Clin Pathol* 129, 530–539
- Lang T, Klein K, Fischer J, Nüssler AK, Neuhaus P, Hofmann U, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM (2001): Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics* 11, 399–415
- Lang T, Schroth W, Brauch H, Schwab M (2010): ABCC2 and clinical outcome of tamoxifen therapy. *J Clin Oncol* 28, e448–e448
- Langerød A, Zhao H, Borgan Ø, Nesland JM, Bukholm IR, Ikdahl T, Kåresen R, Børresen-Dale A-L, Jeffrey SS (2007): TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. *Breast Cancer Res* 9, R30
- Laughlin GA, Barrett-Connor E, Kritz-Silverstein D, von Mühlen D (2000): Hysterectomy, Oophorectomy, and Endogenous Sex Hormone Levels in Older Women: The Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 645–651

- Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzl T, Torchia J, Mullen T-M, Schiff R, Del-Rio AL, Ricote M, Ngo S, Gemsch J, others (1998): Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci* 95, 2920–2925
- Layde PM, Webster LA, Baughman AL, Wingo PA, Rubin GL, Ory HW, Cancer, Group SHS, others (1989): The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breastfeeding with the risk of breast cancer. *J Clin Epidemiol* 42, 963–973
- Ley CJ, Lees B, Stevenson JC (1992): Sex-and menopause-associated changes in body-fat distribution. *Am J Clin Nutr* 55, 950–954
- Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, others (1997): Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 16, 64–67
- Lien EA, Solheim E, Lea OA, Lundgren S, Kvinnsland S, Ueland PM (1989): Distribution of 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen and other tamoxifen metabolites in human biological fluids during tamoxifen treatment. *Cancer Res* 49, 2175–2183
- Lien EA, Solheim E, Ueland PM (1991): Distribution of tamoxifen and its metabolites in rat and human tissues during steady-state treatment. *Cancer Res* 51, 4837–4844
- Lim JSL, Chen XA, Singh O, Yap YS, Ng RCH, Wong NS, Wong M, Lee EJD, Chowbay B (2011): Impact of CYP2D6, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tamoxifen pharmacokinetics in Asian breast cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* 71, 737–750
- Lim YC, Desta Z, Flockhart DA, Skaar TC (2005): Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast cancer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. *Cancer Chemother Pharmacol* 55, 471–478
- Lim YC, Li L, Desta Z, Zhao Q, Rae JM, Flockhart DA, Skaar TC (2006): Endoxifen, a secondary metabolite of tamoxifen, and 4-OH-tamoxifen induce similar changes in global gene expression patterns in MCF-7 breast cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* 318, 503–512
- Liu J, Flockhart PJ, Lu D, Lv W, Lu WJ, Han X, Cushman M, Flockhart DA (2013): Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes by the E- and Z-Isomers of Norendoxifen. *Drug Metab Dispos* 41, 1715–1720
- Lombardi P (2002): Exemestane, a new steroidal aromatase inhibitor of clinical relevance. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* 1587, 326–337
- Lonning PE, Johannessen DC, Lien EA, Ekse D, Fotsis T, Adlercreutz H (1995): Influence of Tamoxifen on Sex Hormones, Gonadotrophins and Sex Hormone Binding Globulin in Postmenopausal Breast Cancer Patients. *J Steroid Biochem Molcellular Biol* 52, 491–496
- Love RR, Mazess RB, Barden HS, Epstein S, Newcomb PA, Jordan VC, Carbone PP, DeMets DL (1992): Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *N Engl J Med* 326, 852–856
- Lu WJ, Xu C, Pei Z, Mayhoub AS, Cushman M, Flockhart DA (2012): The tamoxifen metabolite norendoxifen is a potent and selective inhibitor of aromatase (CYP19) and a potential lead compound for novel therapeutic agents. *Breast Cancer Res Treat* 133, 99–109
- Lum SS, Woltering EA, Fletcher WS, Pommier RF (1997): Changes in serum estrogen levels in women during tamoxifen therapy. *Am J Surg* 173, 399–402

- Lund MJ, Butler EN, Hair BY, Ward KC, Andrews JH, Oprea-Ilie G, Bayakly AR, O’regan RM, Vertino PM, Eley JW (2010): Age/race differences in HER2 testing and in incidence rates for breast cancer triple subtypes. *Cancer* 116, 2549–2559
- Ma J, Chu Z, Lu JBL, Liu J, Zhang Q, Liu Z, Tang D (2017): The Cytochrome P450 Enzyme Responsible for the Production of (Z)-Norendoxifen in vitro. *Chem Biodivers*
- Maciejczyk A, Jagoda E, Wysocka T, Matkowski R, Györfy B, Lage H, Surowiak P (2012): ABCC2 (MRP2, cMOAT) localized in the nuclear envelope of breast carcinoma cells correlates with poor clinical outcome. *Pathol Oncol Res* 18, 331–342
- Madlensky L, Natarajan L, Tchu S, Pu M, Mortimer J, Flatt SW, Nikoloff DM, Hillman G, Fontecha MR, Lawrence HJ, others (2011): Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clin Pharmacol Ther* 89, 718–725
- Maglich JM, Stoltz CM, Goodwin B, Hawkins-Brown D, Moore JT, Kliewer SA (2002): Nuclear Pregnane X Receptor and Constitutive Androstane Receptor Regulate Overlapping but Distinct Sets of Genes Involved in Xenobiotic Detoxification. *Mol Pharmacol* 62, 638–646
- Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, Bernstein L, Malone KE, Ursin G, Strom BL, others (2002): Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 346, 2025–2032
- Massarweh S, Osborne CK, Creighton CJ, Qin L, Tsimelzon A, Huang S, Weiss H, Rimawi M, Schiff R (2008): Tamoxifen Resistance in Breast Tumors Is Driven by Growth Factor Receptor Signaling with Repression of Classic Estrogen Receptor Genomic Function. *Cancer Res* 68, 826–833
- Mauvais-Jarvis P, Baudot N, Castaigne D, Banzet P, Kuttenn F (1986): trans-4-Hydroxytamoxifen concentration and metabolism after local percutaneous administration to human breast. *Cancer Res* 46, 1521–1525
- McPherson K, Steel C, Dixon JM (2000): ABC of breast diseases: breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 321, 624
- Millikan RC, Newman B, Tse C-K, Moorman PG, Conway K, Smith LV, Labbok MH, Geradts J, Bensen JT, Jackson S, others (2008): Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 109, 123–139
- Missmer SA, Eliassen AH, Barbieri RL, Hankinson SE (2004): Endogenous Estrogen, Androgen, and Progesterone Concentrations and Breast Cancer Risk Among Postmenopausal Women. *JNCI J Natl Cancer Inst* 96, 1856–1865
- Monninkhof EM, Elias SG, Vlems FA, van der Tweel I, Schuit AJ, Voskuil DW, van Leeuwen FE, others (2007): Physical activity and breast cancer: a systematic review. *Epidemiology* 18, 137–157
- Morimoto LM, White E, Chen Z, Chlebowski RT, Hays J, Kuller L, Lopez AM, Manson J, Margolis KL, Muti PC, others (2002): Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women’s Health Initiative (United States). *Cancer Causes Control* 13, 741–751
- Mourits MJ, De Vries EG, Willemse PH, Ten Hoor KA, Hollema H, Van der Zee AG (2001): Tamoxifen treatment and gynecologic side effects: a review. *Obstet Gynecol* 97, 855–866

- Moyer AM, Suman VJ, Weinshilboum RM, Avula R, Black JL, Safgren SL, Kuffel MJ, Ames MM, Ingle JN, Goetz MP (2011): SUL1A1, CYP2C19 and disease-free survival in early breast cancer patients receiving tamoxifen. *Pharmacogenomics* 12, 1535–1543
- Mürdter TE, Schroth W, Bacchus-Gerybadze L, Winter S, Heinkele G, Simon W, Fasching PA, Fehm T, Eichelbaum M, Schwab M, Brauch H (2011): Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. *Clin Pharmacol Ther* 89, 708–717
- Murphy C, Fotsis T, Pantzar P, Adlercreut H, Martin F (1987): Analysis of tamoxifen and its metabolites in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using selected ion monitoring (SIM). *J Steroid Biochem* 26, 547–555
- Murphy CS, Langan-Fahey SM, McCAGUE R, Jordan VC (1990): Structure-function relationships of hydroxylated metabolites of tamoxifen that control the proliferation of estrogen-responsive T47D breast cancer cells in vitro. *Mol Pharmacol* 38, 737–743
- Murphy LC, Watson PH (2006): Is oestrogen receptor- β a predictor of endocrine therapy responsiveness in human breast cancer? *Endocr Relat Cancer* 13, 327–334
- Musgrove EA, Sutherland RL (2009): Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 631–643
- Nabholtz J-MA (2008): Long-term safety of aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Ther Clin Risk Manag* 4, 189–204
- Nakamura A, Nakajima M, Yamanaka H, Fujiwara R, Yokoi T (2008): Expression of UGT1A and UGT2B mRNA in human normal tissues and various cell lines. *Drug Metab Dispos* 36, 1461–1464
- Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM, Allan JD (2002): Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. *Jama* 288, 872–881
- Nörenberg A, Heinz S, Scheller K, Hewitt NJ, Braspenning J, Ott M (2013): Optimization of upcyte[®] human hepatocytes for the in vitro micronucleus assay. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 758, 69–79
- Novillo A, Romero-Lorca A, Gaibar M, Rubio M, Fernández-Santander A: Tamoxifen metabolism in breast cancer treatment: Taking the focus off the CYP2D6 gene. Nature Publishing Group 2016
- Nowell S, Sweeney C, Winters M, Stone A, Lang NP, Hutchins LF, Kadlubar FF, Ambrosone CB (2002): Association Between Sulfotransferase 1A1 Genotype and Survival of Breast Cancer Patients Receiving Tamoxifen Therapy. *JNCI J Natl Cancer Inst* 94, 1635–1640
- Ohno M, Motojima K, Okano T, Taniguchi A (2009): Induction of drug-metabolizing enzymes by phenobarbital in layered co-culture of a human liver cell line and endothelial cells. *Biol Pharm Bull* 32, 813–817
- Okishiro M, Taguchi T, Jin Kim S, Shimazu K, Tamaki Y, Noguchi S (2009): Genetic polymorphisms of CYP2D6* 10 and CYP2C19* 2,* 3 are not associated with prognosis, endometrial thickness, or bone mineral density in Japanese breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen. *Cancer* 115, 952–961

- Okubo M, Murayama N, Shimizu M, Shimada T, Guengerich FP, Yamazaki H (2013): The CYP3A4 intron 6 C> T polymorphism (CYP3A4* 22) is associated with reduced CYP3A4 protein level and function in human liver microsomes. *J Toxicol Sci* 38, 349–354
- Olinga P, Elferink M, Draaisma A, Merema M, Castell J, Perez G, Groothuis G (2008): Coordinated induction of drug transporters and phase I and II metabolism in human liver slices. *Eur J Pharm Sci* 33, 380–389
- Osborne CK (1993): Mechanisms for tamoxifen resistance in breast cancer: possible role of tamoxifen metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol* 47, 83–89
- Osborne CK, Fuqua SA (1994): Mechanisms of tamoxifen resistance. *Breast Cancer Res Treat* 32, 49–55
- Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WA, McGuire WL (1980): The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer* 46, 2884–2888
- Osborne CK, Coronado E, Allred DC, Wiebe V, DeGregorio M (1991): Acquired tamoxifen resistance: correlation with reduced breast tumor levels of tamoxifen and isomerization of trans-4-hydroxytamoxifen. *JNCI J Natl Cancer Inst* 83, 1477–1482
- Osborne CK, Jarman M, McCague R, Coronado EB, Hilsenbeck SG, Wakeling AE (1994): The importance of tamoxifen metabolism in tamoxifen-stimulated breast tumor growth. *Cancer Chemother Pharmacol* 34, 89–95
- Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SAW, Wong J, Allred DC, Clark GM, Schiff R (2003): Role of the Estrogen Receptor Coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 95, 353–361
- Parent R, Marion M-J, Furio L, Trépo C, Petit M-A (2004): Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology* 126, 1147–1156
- Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, others (2009): Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 27, 1160–1167
- Parkinson A, Mudra DR, Johnson C, Dwyer A, Carroll KM (2004): The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 199, 193–209
- Pauwels S, Antonio L, Jans I, Lintermans A, Neven P, Claessens F, Decallonne B, Billen J, Vanderschueren D, Vermeersch P (2013): Sensitive routine liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for serum estradiol and estrone without derivatization. *Anal Bioanal Chem* 405, 8569–8577
- Penault-Llorca F, Viale G (2012): Pathological and molecular diagnosis of triple-negative breast cancer: a clinical perspective. *Ann Oncol* 23, vi19-vi22
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, others (2000): Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747
- Pfaffl MW (2004): Real-time RT-PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 1, 92–95

- Poon G, Chui Y, McCague R, L'Inning P, Feng R, Rowlands M, Jarman M (1993): Analysis of phase I and phase II metabolites of tamoxifen in breast cancer patients. *Drug Metab Dispos* 21, 1119–1124
- Province MA, Goetz MP, Brauch H, Flockhart DA, Hebert JM, Whaley R, Suman VJ, Schroth W, Winter S, Zembutsu H, others (2014): CYP2D6 genotype and adjuvant tamoxifen: meta-analysis of heterogeneous study populations. *Clin Pharmacol Ther* 95, 216–227
- Rae JM, Johnson MD, Lippman ME, Flockhart DA (2001): Rifampin is a selective, pleiotropic inducer of drug metabolism genes in human hepatocytes: studies with cDNA and oligonucleotide expression arrays. *J Pharmacol Exp Ther* 299, 849–857
- Raucy JL, Mueller L, Duan K, Allen SW, Strom S, Lasker JM (2002): Expression and induction of CYP2C P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 475–482
- Ravdin PM, Fritz NF, Tormey DC, Jordan VC (1988): Endocrine status of premenopausal node-positive breast cancer patients following adjuvant chemotherapy and long-term tamoxifen. *Cancer Res* 48, 1026–1029
- Reese DM, Slamon DJ (1997): HER-2/neu Signal Transduction in Human Breast and Ovarian Cancer. *STEM CELLS* 15, 1–8
- Renwick A, Thompson D, Seal S, Kelly P, Chagtai T, Ahmed M, North B, Jayatilake H, Barfoot R, Spanova K, others (2006): ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* 38, 873–875
- Rexrode KM, Manson JE, Lee I-M, Ridker PM, Sluss PM, Cook NR, Buring JE (2003): Sex Hormone Levels and Risk of Cardiovascular Events in Postmenopausal Women. *Circulation* 108, 1688–1693
- Richter T, Mürdter TE, Heinkele G, Pleiss J, Tatzel S, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM (2004): Potent mechanism-based inhibition of human CYP2B6 by clopidogrel and ticlopidine. *J Pharmacol Exp Ther* 308, 189–197
- Riggins RB, Bouton AH, Liu MC, Clarke R (2005): Antiestrogens, aromatase inhibitors, and apoptosis in breast cancer. *Vitam Horm* 71, 201–237
- Ring A, Dowsett M (2004): Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat Cancer* 11, 643–658
- Robinson S, Jordan V (1988): Metabolism of steroid-modifying anticancer agents. *Pharmacol Ther* 36, 41–103
- Romero-Lorca A, Novillo A, Gaibar M, Bandrés F, Fernández-Santander A (2015): Impacts of the Glucuronidase Genotypes UGT1A4, UGT2B7, UGT2B15 and UGT2B17 on Tamoxifen Metabolism in Breast Cancer Patients. *PLOS ONE* 10, e0132269
- Rossi E, Morabito A, Di Rella F, Esposito G, Gravina A, Labonia V, Landi G, Nuzzo F, Pacilio C, De Maio E, et al. (2009): Endocrine effects of adjuvant letrozole compared with tamoxifen in hormone-responsive postmenopausal patients with early breast cancer: the HOBOE trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 27, 3192–3197
- Ruiter R, Bijl MJ, Van Schaik RH, Berns EM, Hofman A, Coebergh J-WW, Van Noord C, Visser LE, Stricker BHc (2010): CYP2C19* 2 polymorphism is associated with increased survival in breast cancer patients using tamoxifen. *Pharmacogenomics* 11, 1367–1375

- Ruxton GD (2006): The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann–Whitney U test. *Behav Ecol* 17, 688–690
- Saladores P, Mürdter T, Eccles D, Chowbay B, Zgheib NK, Winter S, Ganchev B, Eccles B, Gerty S, Tfayli A, others (2015): Tamoxifen metabolism predicts drug concentrations and outcome in premenopausal patients with early breast cancer. *Pharmacogenomics J* 15, 84–94
- Saladores PH, Precht JC, Schroth W, Brauch H, Schwab M (2013): Impact of metabolizing enzymes on drug response of endocrine therapy in breast cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 13, 349–365
- Sane RS, Buckley DJ, Buckley AR, Nallani SC, Desai PB (2008): Role of human pregnane X receptor in tamoxifen-and 4-hydroxytamoxifen-mediated CYP3A4 induction in primary human hepatocytes and LS174T cells. *Drug Metab Dispos* 36, 946–954
- Schaefer M, Schanzle G, Bischoff D, Sussmuth RD (2016): Upcyte Human Hepatocytes: a Potent In Vitro Tool for the Prediction of Hepatic Clearance of Metabolically Stable Compounds. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* 44, 435–444
- Schiff R, Massarweh S, Shou J, Osborne CK (2003): Breast cancer endocrine resistance. *Clin Cancer Res* 9, 447s–454s
- Schroth W, Antoniadou L, Fritz P, Schwab M, Mürdter T, Zanger UM, Simon W, Eichelbaum M, Brauch H (2007): Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J Clin Oncol* 25, 5187–5193
- Schroth W, Goetz MP, Hamann U, Fasching PA, Schmidt M, Winter S, Fritz P, Simon W, Suman VJ, Ames MM, et al. (2009): Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA J Am Med Assoc* 302, 1429–1436
- Schroth W, Hamann U, Fasching PA, Dauser S, Winter S, Eichelbaum M, Schwab M, Brauch H (2010): CYP2D6 polymorphisms as predictors of outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen: expanded polymorphism coverage improves risk stratification. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 16, 4468–4477
- Schroth W, Winter S, Mürdter T, Schaeffeler E, Eccles D, Eccles B, Chowbay B, Khor CC, Tfayli A, Zgheib NK, others (2017): Improved prediction of endoxifen metabolism by CYP2D6 genotype in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Front Pharmacol* 8, 582
- Schuetz EG, Schuetz JD, Strom SC, Thompson MT, Fisher RA, Molowa DT, Li D, Guzelian PS (1993): Regulation of human liver cytochromes P-450 in family 3A in primary and continuous culture of human hepatocytes. *Hepatology* 18, 1254–1262
- Sensorn I, Sirachainan E, Chamnanphon M, Pasomsub E, Trachu N, Supavilai P, Sukasem C, Pinthong D (2013): Association of CYP3A4/5, ABCB1 and ABCC2 polymorphisms and clinical outcomes of Thai breast cancer patients treated with tamoxifen. *Pharmacogenomics Pers Med* 6, 93
- Serrano D, Lazzeroni M, Zambon C, Macis D, Maisonneuve P, Johansson H, Guerrieri-Gonzaga A, Plebani M, Basso D, Gjerde J, others (2011): Efficacy of tamoxifen based on cytochrome P450 2D6, CYP2C19 and SULT1A1 genotype in the Italian Tamoxifen Prevention Trial. *Pharmacogenomics J* 11, 100–107
- Shang Y, Brown M (2002): Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 295, 2465–2468

- Sherman BM, Chapler FK, Crickard K, Wycoff D (1979): Endocrine consequences of continuous antiestrogen therapy with tamoxifen in premenopausal women. *J Clin Invest* 64, 398
- Shi L, Dong B, Li Z, Lu Y, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, Fan T, Lin B, others (2009): Expression of ER- α 36, a novel variant of estrogen receptor α , and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. *J Clin Oncol* 27, 3423–3429
- Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, Schiff R (2004): Mechanisms of Tamoxifen Resistance: Increased Estrogen Receptor-HER2/neu Cross-Talk in ER/HER2-Positive Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 96, 926–935
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD (1994): Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15, 342–355
- Simpson ER, Zhao Y, Agarwal VR, Michael MD, Bulun SE, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Sun T, Fisher CR, Qin K, others (1997): Aromatase expression in health and disease. *Recent Prog Horm Res* 52, 185–213
- Singh MS, Francis PA, Michael M (2011): Tamoxifen, cytochrome P450 genes and breast cancer clinical outcomes. *The Breast* 20, 111–118
- Singletary SE (2003): Rating the risk factors for breast cancer. *Ann Surg* 237, 474
- Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun S-S, Van Den Brandt PA, Folsom AR, Goldbohm RA, Graham S, Holmberg L, Howe GR, Marshall JR, others (1998): Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *Jama* 279, 535–540
- Sonnenschein C, Papendorp JT, Soto AM (1985): Estrogenic effect of tamoxifen and its derivatives on the proliferation of MCF7 human breast tumor cells. *Life Sci* 37, 387–394
- Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, others (2001): Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci* 98, 10869–10874
- Sousa M, Pozniak A, Boffito M (2008): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of drug interactions involving rifampicin, rifabutin and antimalarial drugs. *J Antimicrob Chemother* 62, 872–878
- Span PN, Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, Sweep CF (2003): Cyclin-E is a strong predictor of endocrine therapy failure in human breast cancer. *Oncogene* 22, 4898–4904
- Spearman C (1904): The proof and measurement of association between two things. *Am J Psychol* 15, 72–101
- Stanczyk FZ, Jurow J, Hsing AW (2010): Limitations of direct immunoassays for measuring circulating estradiol levels in postmenopausal women and men in epidemiologic studies. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol* 19, 903–906
- Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P, Hayes DF, Desta Z, Flockhart DA (2003): Active Tamoxifen Metabolite Plasma Concentrations After Coadministration of Tamoxifen and the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Paroxetine. *J Natl Cancer Inst* 95, 1758–1764

- Sun D, Chen G, Dellinger RW, Duncan K, Fang J-L, Lazarus P (2006): Characterization of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen glucuronidation by human UGT1A4 variants. *Breast Cancer Res* 8, R50
- Sunderland MC, Osborne CK (1991): Tamoxifen in premenopausal patients with metastatic breast cancer: a review. *J Clin Oncol* 9, 1283–1297
- Sutherland RL, Green MD, Hall RE, Reddel RR, Taylor IW (1983): Tamoxifen induces accumulation of MCF 7 human mammary carcinoma cells in the G0/G1 phase of the cell cycle. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19, 615–621
- Számel I, Vincze B, Hindy I, Hermann I, Borvendég J, Eckhardt S (1986): Hormonal changes during a prolonged tamoxifen treatment in patients with advanced breast cancer. *Oncology* 43, 7–11
- Teft WA, Mansell SE, Kim RB (2011): Endoxifen, the active metabolite of tamoxifen, is a substrate of the efflux transporter P-glycoprotein (multidrug resistance 1). *Drug Metab Dispos* 39, 558–562
- Teft WA, Gong IY, Dingle B, Potvin K, Younus J, Vandenberg TA, Brackstone M, Perera FE, Choi Y-H, Zou G, et al. (2013): CYP3A4 and seasonal variation in vitamin D status in addition to CYP2D6 contribute to therapeutic endoxifen level during tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res Treat* 139, 95–105
- Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, López S, Guzmán C, Castell JV, Donato MT, Jover R (2016): Human Upcyte Hepatocytes: Characterization of the Hepatic Phenotype and Evaluation for Acute and Long-Term Hepatotoxicity Routine Testing. *Toxicol Sci* 152, 214–229
- Tucker AN, Tkaczuk KA, Lewis LM, Tomic D, Lim CK, Flaws JA (2005): Polymorphisms in cytochrome P4503A5 (CYP3A5) may be associated with race and tumor characteristics, but not metabolism and side effects of tamoxifen in breast cancer patients. *Cancer Lett* 217, 61–72
- Van Schaik RH, Kok M, Sweep FC, Van Vliet M, Van Fessem M, Meijer-van Gelder ME, Seynaeve C, Lindemans J, Wesseling J, Van 't Veer LJ, others (2011): The CYP2C19* 2 genotype predicts tamoxifen treatment outcome in advanced breast cancer patients. *Pharmacogenomics* 12, 1137–1146
- Ward H (1973): Anti-oestrogen therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at two dose levels. *Br Med J* 1, 13–14
- Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG (2008): CHEK2* 1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. *J Clin Oncol* 26, 542–548
- Welch BL (1938): The significance of the difference between two means when the population variances are unequal. *Biometrika* 29, 350–362
- Wiebe VJ, Osborne CK, McGuire WL, DeGregorio MW (1992): Identification of estrogenic tamoxifen metabolite (s) in tamoxifen-resistant human breast tumors. *J Clin Oncol* 10, 990–994
- Wiebe VJ, Osborne CK, Fuqua SA, DeGregorio MW (1993): Tamoxifen resistance in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 14, 173–188
- Wilcoxon F (1945): Individual comparisons by ranking methods. *Biom Bull* 1, 80–83

- Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, Hamman MA, Hall SD, Wrighton SA (2002): Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos* 30, 883–891
- Willis K, London D, Ward H, Butt W, Lynch S, Rudd B (1977): Recurrent breast cancer treated with the antioestrogen tamoxifen: correlation between hormonal changes and clinical course. *Br Med J* 1, 425–428
- Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, Wolff AC, Pritchard KI, Ingle JN, Chlebowski RT, Gelber R, Edge SB, Gralow J, et al. (2005): American Society of Clinical Oncology Technology Assessment on the Use of Aromatase Inhibitors As Adjuvant Therapy for Postmenopausal Women With Hormone Receptor–Positive Breast Cancer: Status Report 2004. *J Clin Oncol* 23, 619–629
- Wolbold R, Klein K, Burk O, Nüssler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM (2003): Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology* 38, 978–988
- Wolf DM, Langan-Fahey SM, Parker CJ, McCague R, Jordan VC (1993): Investigation of the mechanism of tamoxifen-stimulated breast tumor growth with nonisomerizable analogues of tamoxifen and metabolites. *JNCI J Natl Cancer Inst* 85, 806–812
- Yersal O, Barutca S (2014): Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol* 5, 412–424
- Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA (2010): Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol* 11, 174–183
- Zanger UM, Schwab M (2013): Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 138, 103–141
- Zheng Y, Sun D, Sharma AK, Chen G, Amin S, Lazarus P (2007): Elimination of Antiestrogenic Effects of Active Tamoxifen Metabolites by Glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 35, 1942–1948
- Zhou H, Anthony L, Wood A, Wilkinson G (1990): Induction of polymorphic 4'-hydroxylation of S-mephenytoin by rifampicin. *Br J Clin Pharmacol* 30, 471–475
- Zhou Y, Yau C, Gray JW, Chew K, Dairkee SH, Moore DH, Eppenberger U, Eppenberger-Castori S, Benz CC (2007): Enhanced NFκB and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer. *BMC Cancer* 7, 59

Erklärung zu Publikationen

Teile dieser Arbeit (Daten, Abbildungen, Diskussion) wurden 2015 in der Zeitschrift *Analytical and Bioanalytical Chemistry* unter dem Titel *Highly sensitive simultaneous quantification of estrogenic tamoxifen metabolites and steroid hormones by LC-MS/MS* und 2018 in der Zeitschrift *Archives of Toxicology* unter dem Titel *The formation of estrogen-like tamoxifen metabolites and their influence on enzyme activity and gene expression of ADME genes* veröffentlicht.

Dabei waren die Beiträge der Autoren wie folgt:

Analytical and Bioanalytical Chemistry: Highly sensitive simultaneous quantification of estrogenic tamoxifen metabolites and steroid hormones by LC-MS/MS

Autorenliste: Janina Johänning, Georg Heinkele, Jana C. Precht, Hiltrud Brauch, Michel Eichelbaum, Matthias Schwab, Werner Schroth und Thomas E. Mürdter

Planung der Experimente: JJ, JP, WS, TEM

Bereitstellung von Materialien: GH

Ausführung der Experimente: JJ, JP, TEM

Auswertung der Daten: JJ, WS, TEM

Verfassen des Manuskripts: JJ, WS, TEM

Genehmigung und kritische Korrektur des Manuskripts: GH, JP, ME, MS, HB

Gleichwertiges Mitwirken als Senior-Autoren: WS, TEM

Archives of Toxicology: The formation of estrogen-like tamoxifen metabolites and their influence on enzyme activity and gene expression of ADME genes

Autorenliste: Janina Johänning, Patrick Kröner, Maria Thomas, Ulrich M. Zanger, Astrid Nörenberg, Michel Eichelbaum, Matthias Schwab, Hiltrud Brauch, Werner Schroth und Thomas E. Mürdter

Planung der Experimente: JJ, PK, WS, TEM

Bereitstellung von Materialien: MT, AN, UMZ

Ausführung der Experimente: JJ, PK, WS, TEM

Auswertung der Daten: JJ, MT, PK, WS, TEM

Verfassen des Manuskripts: JJ, WS, TEM

Genehmigung und kritische Korrektur des Manuskripts: MT, UMZ, AN, ME, MS, HB

Gleichwertiges Mitwirken als Senior-Autoren: WS, TEM

Publikationsliste

Schriftstücke

Erstautorenschaft

Johänning J, Kröner P, Thomas M, Zanger UM, Nörenberg A, Eichelbaum M, Schwab M, Brauch H, Schroth W and Mürdter TE. *The formation of estrogen-like tamoxifen metabolites and their influence on enzyme activity and gene expression of ADME genes*. Archives of Toxicology (2018): Vol. 92 (3): 1099-1112.

Johänning J, Heinkele G, Precht JC, Brauch H, Eichelbaum M, Schwab M, Schroth W and Mürdter TE. *Highly sensitive simultaneous quantification of estrogenic tamoxifen metabolites and steroid hormones by LC-MS/MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry (2015): 407(24): 7497-7502.

Mitautorenschaft

Rennert C, Eplinius F, Hofmann U, **Johänning J**, Rolfs F, Schmidt-Heck W, Guthke R, Gebhardt R, Ricken AM, Matz-Soja M. *Conditional loss of hepatocellular Hedgehog signaling in female mice leads to the persistence of hepatic steroidogenesis, androgenization and infertility*. Archives of Toxicology (2017): 1-11

Einsele-Scholz S, Malmshaimer S, Bertram K, Stehle D, **Johänning J**, Manz M, Daniel PT, Gillissen BF, Schulze-Osthoff K, Essmann F. *Bok is a genuine multi-BH-domain protein that triggers apoptosis in the absence of Bax and Bak*. Journal of Cell Science (2016): 129: 2213-2223.

Braeuning A, Thomas M, Hofmann U, Vetter S, Zeller E, Petzuch B, **Johänning J**, Schroth W, Weiss TS, Zanger UM and Schwarz M. *Comparative Analysis and Functional Characterization of HC-AFW1 Hepatocarcinoma Cells: Cytochrome P450 Expression and Induction by Nuclear Receptor Agonists*. Drug Metabolism and Disposition (2015): 43(11): 1781-1787.

Kongressbeiträge

Erstautorenschaft

Johänning J, Schwab M, Brauch H, Schroth W and Mürdter TE. *Identification of CYP enzymes responsible for the formation of estrogenic Tamoxifen metabolites bisphenol and metabolite E*. European ISSX Conference, Cologne, Germany (2017).

Johänning J, Thomas M, Zanger UM, Nörenberg A, Eichelbaum M, Schwab M, Brauch H, Mürdter TE and Schroth W. *Tamoxifen and metabolites influence CYP enzymes on activity and expression levels*. 2nd German Pharm-Tox Summit, German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT), Heidelberg, Germany (2017).

Johänning J, Eccles DM, Eccles B, Eichelbaum M, Schwab M, Brauch H, Mürdter T and Schroth W. *A high ratio of tamoxifen metabolite E to tamoxifen is associated with an increased risk of breast cancer recurrences in premenopausal women*. American Association for Cancer Research AACR, Pittsburgh, USA (2016).

Johänning J, Chowbay B, Khor CC, Eccles D, Eccles B, Eichelbaum M, Schwab M, Brauch H, Mürdter T and Schroth W. *Genome-wide association identifies variants controlling estrogenic tamoxifen metabolites*. German Pharm-Tox Summit, German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT), Berlin, Deutschland (2016).

Johänning J, Precht JC, Heinkele G, Eichelbaum M, Brauch H, Schwab M, Schroth W and Mürdter TE. *Simultaneous quantification of estrogenic Tamoxifen metabolites and sex steroid hormones in human plasma via UHPLC-ESI-MS/MS*. European ISSX Conference, Glasgow, Schottland (2015). **Finalist Posteraward**.

Mitautorenschaft

Nörenberg A, Runge N, Johannssen T, Mürdter T, **Johänning J**, Thomas M, Schroth W. *Metabolic competent expandable human upcyte hepatocytes enable metabolism studies including CYP2D6 dependent pathways*. Toxicology Letters (2016): 258: 142.

Nörenberg A, Schroth W, Mürdter T, **Johänning J**, Thomas M, Heinz S. *Generation of CYP2D6 competent upcyte[®] hepatocytes*. Toxicology Letters (2015): 238(2): 184-185.

Nörenberg A, Schroth W, Mürdter T, **Johänning J**, Thomas M, Heinz S. *Toxicology testing using upcyte[®] hepatocytes*. North American ISSX Conference, Orlando, Florida, USA (2015)

Nörenberg A, Schroth W, Mürdter T, **Johänning J**, Thomas M, Heinz S. *Generation of proliferating human hepatocytes with enhanced CYP enzyme activities*. North American ISSX Conference, Orlando, Florida, USA (2015)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Dr. Werner Schroth und Dr. Thomas Mürdter bedanken. Ihre ausgezeichnete Betreuung und die konstruktiven Diskussionen haben maßgeblich zum Erfolg meiner Dissertation beigetragen und ich habe viel auf professioneller und persönlicher Ebene gelernt. Ein besonderer Dank gilt auch Markus König und Margit Geisler, die mich tatkräftig im Labor unterstützt haben.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Matthias Schwab für die Möglichkeit, meine Dissertation am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie anzufertigen, danken.

Prof. Dr. Peter Ruth danke ich für seine Zeit und Mühe im Anfertigen des zweiten Gutachtens.

Mein Dank gilt auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und der Robert Bosch Stiftung für die finanzielle Unterstützung meines Projekts sowie meinen internen und externen Kooperationspartnern Herrn Prof. Dr. Uli Zanger, Herrn Prof. Dr. Matthias Schwab, Frau Dr. Elke Schöffeler, Frau Dr. Maria Thomas, Herrn Igor Liebermann, Frau Andrea Jarmuth am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie und Dr. Astrid Nörenberger von upcyte technologies GmbH.

Weiterhin möchte ich der Arbeitsgruppe Analytik für die gute Atmosphäre danken, insbesondere Dr. Ute Hofmann und Monika Seiler, die mir in technischen und analytischen Fragestellungen immer beiseite standen.

Bei Dr. Stefan Winter möchte ich mich für die Unterstützung und Beratung in statistischen Fragen und die bioinformatische Auswertung der Transkriptomanalysen bedanken.

Mein Dank gilt auch meinen Arbeitskollegen und Mit-Doktoranden, insbesondere Dr. Judith Jeske, Dr. Claudia Neul, Dr. Uli Griese, Patrick Kröner und Dr. Patrick Leuthold, für die schöne Atmosphäre im Labor und im Büro, anregenden Gesprächen sowie erinnerungswürdigen Unternehmungen nach der Arbeit.

Ich möchte mich auch herzlich bei meinen Freunden Frank Essmann, Katharina List, Carla Steffens, Marion Lindner, Frederic Brosseron, Meryem Ebeling, Marvin Schmidt, Frederik Milkau, und Dagli Erbas bedanken, die mir immer mit Rat und Tat beiseite standen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und speziell meinen Eltern, die mich jederzeit bedingungslos unterstützt und mir über schwere Zeiten hinweggeholfen haben. Ganz besonders bedanke ich mich auch bei meiner Tochter Nele, die mir immer wieder geholfen hat die richtige Perspektive zu bewahren.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Metabolismus, Pharmakodynamik und klinische Relevanz der estrogenen Tamoxifenmetaboliten in der endokrinen Therapie des Mammakarzinoms“ selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen (alternativ: Zitate) als solche gekennzeichnet habe.

Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden.

Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiege habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.