

# **Untersuchungen zur Genotoxizität von Acrylamid und Glycidamid an Säugerzellen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der  
Universität Karlsruhe (TH)  
genehmigte

**DISSERTATION**

von

Dipl. Lebensmittelchemikerin Nicole Puppel

aus Frankfurt/Main

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse  
Referent: Prof. Dr. Doris Marko  
Korreferent: Prof. Dr. Dr. Manfred Metzler  
Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2007

---

Für Martin  
und meine Familie

Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an  
interessant zu werden, wo sie aufhört.  
[Justus von Liebig]

---

## Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und nur unter Verwendung der von mir angegebenen Hilfsmittel erstellt wurde.

Die Arbeit wurde mit einem Wechsel 2005 von der TU Kaiserslautern an die TH Karlsruhe im Zeitraum 2003-2007 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Frau Prof. Dr. Doris Marko angefertigt.

Die Dissertationsschrift wurde an keiner anderen Institution bzw. an keiner anderen Fakultät eingereicht.

Karlsruhe, den 27.08.2007

(Nicole Puppel)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Theorie.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Physikalisch-Chemische Eigenschaften von Acrylamid .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Entstehung in Lebensmitteln.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Exposition und Grenzwerte.....</b>	<b>8</b>
<b>2.4 Toxizität.....</b>	<b>12</b>
2.4.1 Neurotoxizität .....	12
2.4.2 Mutagenität und Genotoxizität.....	13
2.4.2.1 Datenlage .....	13
2.4.2.2 Mechanismen der Genotoxizität.....	15
2.4.2.2.1 DNA-Addukte .....	15
2.4.2.2.2 Mikrokerne .....	21
2.4.3 Kanzerogenität.....	26
2.4.4 Reproduktionstoxizität .....	27
<b>2.5 Fremdstoffmetabolismus .....</b>	<b>27</b>
2.5.1 Cytochrome P450 .....	31
2.5.2 Biomarker.....	34
<b>2.6 Oxidativer Stress .....</b>	<b>36</b>
2.6.1 Glutathion.....	37
2.6.2 Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase.....	40
<b>2.7 Apoptose .....</b>	<b>44</b>
2.7.1 Apoptose-Signalweg .....	44
2.7.2 Caspasen.....	45
<b>3. Problemstellung .....</b>	<b>48</b>
<b>4. Synthesen .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1 Synthese von Glycidamid.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2 Synthese von N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin .....</b>	<b>51</b>
<b>5. Etablierung geeigneter Testsysteme .....</b>	<b>54</b>
<b>5.1 Nachweis der GSH-Depletion durch BSO an V79-Zellen und primären</b>	
<b>Rattenhepatozyten.....</b>	<b>54</b>
5.1.1 Zytotoxischer Effekt von BSO.....	56
5.1.2 Reduktion des Glutathions durch Acrylamid/Glycidamid in V79-Zellen .....	57

<b>5.2 Nachweis von CYP 2E1 an verschiedenen Zellsystemen .....</b>	<b>58</b>
5.2.1 Nachweis der CYP 2E1-Expression in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer an primären Rattenhepatozyten .....	60
5.2.2 Nachweis der CYP 2E1-Aktivität .....	62
<b>6. Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>66</b>
<b>6.1 Untersuchungen zur Genotoxizität.....</b>	<b>66</b>
6.1.1 Induktion von Mikrokernen an V79-Zellen .....	66
6.1.1.1 Indirekte Immunofluoreszenzfärbung .....	69
6.1.1.2 Doppelkernmethode .....	71
6.1.2 Induktion von DNA-Strangbrüchen an Säugerzellen.....	74
6.1.3 DNA-Addukte .....	83
6.1.4 Diskussion und Zusammenfassung der Befunde zur Genotoxizität.....	85
<b>6.2 Beeinflussung der Zellviabilität .....</b>	<b>90</b>
6.2.1 Zytotoxizität und Proliferation .....	90
6.2.2 Apoptoseinduktion .....	96
<b>7. Zusammenfassung.....</b>	<b>106</b>
<b>8. Methoden.....</b>	<b>107</b>
<b>8.1 Zellkultur .....</b>	<b>107</b>
8.1.1 Zelllinien.....	107
8.1.2 Auftauen von Zellen.....	110
8.1.3 Mediumwechsel .....	110
8.1.4 Passagieren.....	111
8.1.5 Einfrieren und Lagern von Zellen .....	112
8.1.6 Mykoplasmentest.....	112
8.1.7 Zellzahlbestimmung.....	115
<b>8.2 Proteinbestimmung nach Bradford .....</b>	<b>116</b>
<b>8.3 Glycidamid .....</b>	<b>117</b>
8.3.1 Synthese von Glycidamid .....	117
8.3.2 Einwaage des Glycidamid unter Argon .....	117
<b>8.4 Glutathion.....</b>	<b>118</b>
8.4.1 Glutathion-Depletion in Zellen .....	118
8.4.2 Bestimmung des Glutathiongehaltes .....	119
<b>8.5 Nachweis von CYP-450 2E1 .....</b>	<b>122</b>
8.5.1 Nachweis des CYP-450-2E1-Gehaltes mittels SDS-PAGE und Western-Blot .....	122
8.5.2 Zeitabhängige CYP450 2E1-Aktivitätsuntersuchung an primären Rattenhepatozyten mittels HPLC .....	127

<b>8.6 Mikrokerninduktion .....</b>	<b>133</b>
8.6.1 Mikrokerntest .....	133
8.6.2 Doppelkernmethode .....	135
8.6.3 Indirekte Immunofluoreszenzfärbung (CREST-Färbung) .....	135
<b>8.7 DNA-Strangbrüche .....</b>	<b>137</b>
8.7.1 Comet-Assay .....	137
8.7.2 Comet-Assay mit FPG-Behandlung .....	142
<b>8.8 Synthese des N7-Gua-Adduktes.....</b>	<b>144</b>
8.8.1 Synthese von N-7-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)Guanin .....	144
8.8.2 Synthese mit stabilem Isotop-markiertem Guanosin .....	145
<b>8.9 Nachweis von N7-Gua-Addukten in vitro.....</b>	<b>146</b>
<b>8.10 Viabilität .....</b>	<b>152</b>
8.10.1 Morphologie: Mikroskopische Aufnahmen.....	152
8.10.2 Membranintegrität: Trypan Blau-Ausschlusstest.....	154
8.10.3 Mitochondriale Aktivität: WST-1-Assay .....	155
8.10.4 Caspase-3-Aktivitäts-Untersuchung .....	158
<b>9. Materialien &amp; Geräte.....</b>	<b>163</b>
<b>10. Referenzen .....</b>	<b>169</b>
10.1 Literatur.....	169
10.2 Internet .....	182
<b>11. Anhang .....</b>	<b>I</b>
Veröffentlichungen.....	I
Posterbeiträge .....	II
Dank .....	IV
Lebenslauf .....	VI

## Abkürzungsverzeichnis

3-APA	3- <u>A</u> minopropion <u>a</u> mid
A <sub>x</sub>	<u>A</u> bsorption bei x nm
AA	<u>A</u> cryl <u>a</u> mid
AAMA	<u>A</u> cryl <u>a</u> mid <u>e</u> <u>m</u> ercapturic <u>a</u> cid (Mercaptursäure von AA)
AFB <sub>1</sub>	<u>A</u> flatoxin <u>B</u> <sub>1</sub>
AFC	7- <u>A</u> mino-4-trifluormethyl- <u>c</u> umarin
AP-Stellen	<u>A</u> purine Stellen
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
Bcl 2	<u>B</u> - <u>c</u> ell CLL/lymphoma 2
BER	<u>B</u> asen <u>e</u> xzisions <u>r</u> eparaturenzyme
BfR	<u>B</u> undesinstitut für <u>R</u> isikobewertung
Bidest.	<u>B</u> idestilliert
BIS-TRIS	<u>B</u> is-(2-hydroxyethyl)imino- <u>t</u> ris(hydroxymethyl)methan
BLU	<u>B</u> oehringer <u>L</u> ight <u>U</u> nits
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin (Rinderserumalbumin)
BSO	L- <u>B</u> uthionin <u>s</u> ulfoximin
CaCo-2-Zellen	<u>C</u> olon <u>c</u> arzinomzelllinie
CAS	<u>C</u> hemical <u>A</u> bstract <u>S</u> ervice
CERHR	<u>C</u> enter for the <u>E</u> valuation of <u>R</u> isks to <u>H</u> uman <u>R</u> eproduction
CHAPS	3-[(3- <u>c</u> hol <u>a</u> midopropyl)-dimethylalmino] - <u>p</u> ropansulfate
CHO	<u>C</u> hinesische <u>H</u> amster <u>O</u> varzellen
CLZ	<u>C</u> hlor <u>z</u> oxazon
COX	<u>C</u> ycloo <u>x</u> igenase
CREST	<u>C</u> alcinosis cutis, <u>R</u> aynaud-Symptomatik, <u>E</u> sophagus, <u>S</u> klerodaktylie und <u>T</u> eleangiectasie
CYP 2E1	<u>C</u> ytochrom <u>P</u> 450 abhängige Monoxigenasen <u>2E1</u>
DEVD	Asp-Glu-Val-Asp (Einbuchstabencode für Aminosäuren)
Disk-SDS-PAGE	<u>D</u> iskontinuierliche <u>S</u> odium <u>d</u> odecylsulfat – <u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>g</u> ele <u>l</u> ektrophorese
DAPI	4',6'- <u>D</u> ia <u>m</u> idino- <u>p</u> heny <u>i</u> ndol-dihydrochlorid
DIABLO	<u>D</u> irect <u>I</u> AP- <u>b</u> inding protein with <u>l</u> ow pl
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>E</u> agles <u>m</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethylsulf <u>o</u> xid

DNA	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
DSMZ	<u>D</u> eutsche <u>S</u> ammlung von <u>M</u> ikroorganismen und <u>Z</u> ellkulturen
DTNB	5,5'- <u>D</u> ithio <u>b</u> is(2- <u>n</u> itro <u>b</u> enzo <u>e</u> säure)
DTT	<u>D</u> ithio <u>t</u> hreitol
EC <sub>50</sub>	<u>E</u> ffect <u>c</u> oncentration ( <u>50</u> %)
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>a</u> ccetat/Ethylendiamintetraessigsäure
EH	<u>E</u> poxid <u>h</u> ydrolase
EINECS	Europäisches Altstoffverzeichnis <u>E</u> uropean <u>I</u> nventory of <u>E</u> xisting <u>C</u> ommercial <u>C</u> hemical <u>S</u> ubstances
eq	<u>E</u> quivalent/Äquivalent
ESI	<u>E</u> lectro <u>s</u> pray <u>I</u> onisation
EtOH	Ethanol
EU	<u>E</u> uropäische <u>U</u> nion
EWG	<u>E</u> uropäische <u>W</u> irtschaftsgemeinschaft
FAD	<u>F</u> lavin- <u>A</u> denin- <u>D</u> inukleotid
FADD	<u>F</u> as <u>A</u> ssociated protein with <u>D</u> eath <u>D</u> omain
Fapy	<u>F</u> ormamido <u>p</u> yrimidine
FITC	<u>F</u> luorescein- <u>I</u> sothiocyanat
F <sub>K</sub>	<u>K</u> orrekturfaktor
FKS	<u>F</u> ötale <u>K</u> älberserum
FPG	<u>F</u> ormamidopyrimidin-DNA- <u>G</u> lykosylase
GA	<u>G</u> lycidamid
GAMA	<u>M</u> ercaptursäure ( <u>a</u> cid) von <u>GA</u>
GSH	<u>G</u> luthation- <u>S</u> H (reduzierte Form)
GSR	<u>G</u> luthation- <u>S</u> - <u>R</u> eduktase
GS-SG	<u>D</u> isulfid des <u>G</u> luthations (oxidierte Form)
GST	<u>G</u> luthation- <u>S</u> - <u>T</u> ransferase
Hb	<u>H</u> ämoglobin
Hep	Primäre Ratten <u>h</u> epatozyten
HEPES	2-[4-(2- <u>H</u> ydroxyethyl)piperazino]ethansulfonsäure
hFPG	<u>H</u> umane <u>F</u> ormamidopyrimidin-DNA- <u>G</u> lykosylase
hOGG	8- <u>O</u> xoguanin DNA <u>G</u> lykosylase
HPBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (mit <u>H</u> EPES)
HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> ressure <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography



HPRT	<u>H</u> ypoxanthin <u>P</u> hosphoribosyl- <u>T</u> ransferase
HUMN	<u>H</u> uman <u>M</u> icronucleus
ICE	<u>I</u> nterleukin-1 $\beta$ - <u>c</u> onverting <u>e</u> nzyme
IfLU	<u>I</u> nstitut für <u>L</u> ebensmitteluntersuchungen und <u>U</u> mwelthygiene
Ig G	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
i.p.	<u>I</u> ntraperitoneal
ITS	<u>I</u> nsulin <u>T</u> ransferrin <u>S</u> elenium
JECFA	<u>J</u> oint <u>e</u> xpert <u>c</u> ommittee on <u>f</u> ood <u>a</u> dditives
kDa	<u>K</u> ilo <u>D</u> alton
KG	<u>K</u> örpergewicht
L5178Y/TK+/- -Zellen	Maus- <u>L</u> ymphoma-Zellen mit Mutation im <u>T</u> hymidin <u>k</u> inase-Locus
LGL	<u>L</u> andesamt für <u>G</u> esundheit und <u>L</u> ebensmittelsicherheit
LM8	3-Hydroxy-4-[(E)-(2-furyl)methyliden]methyl-3-cyclopenten-1,2-dion)
LMA	<u>L</u> ow <u>m</u> elting <u>a</u> garose
MAO	<u>M</u> onoaminoxidase
MG	<u>M</u> olekulargewicht
MeOH	Methanol
MNNG	<i>N</i> - <u>M</u> ethyl- <i>N'</i> - <u>N</u> itro- <i>N</i> - <u>N</u> itrosoguanidin
MPT	<u>m</u> itochondrial <u>p</u> ermeability <u>t</u> ransition
MRM	<u>M</u> ultiple <u>r</u> eaction <u>m</u> ode
MS	<u>M</u> assenspektrometer
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-tetrazolium-bromide
N7-Gua-Addukt	<u>N</u> -7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)g <u>u</u> anine-Addukt
NADP	<u>N</u> icotinamid <u>a</u> denin <u>d</u> inukleotid <u>p</u> hosphat
NDI	<u>N</u> uclear <u>D</u> ivision <u>I</u> ndex
NMA	<u>N</u> ormal <u>m</u> elting <u>a</u> garose
NMR	<u>N</u> uclear <u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance
NTP	<u>N</u> ational <u>T</u> oxicology <u>P</u> rogram
PBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (phosphatgepufferte Salzlösung)
pH	<u>P</u> ondus <u>H</u> ydrogenii/ <u>p</u> otentia <u>H</u> ydrogenii
PKWs	<u>P</u> olyzyklische <u>K</u> ohlen <u>w</u> asserstoffe

PMSF	<u>Phenyl</u> <u>methyl</u> <u>sulfonyl</u> <u>fluorid</u>
PS	<u>Petri</u> <u>schale</u>
Rec	<u>Recovery</u> /Wiederfindungsrate
RIPA	<u>Radio immuno-precipitation assay</u> (Puffer)
ROS	<u>Reactive oxygen species</u> /Reaktive Sauerstoffspezies
RT	<u>Raum</u> <u>temperatur</u>
S-9-Mix	<u>Supernatant</u> 9000g= der Überstand eines Leberzell-homogenats der Ratte nach Zentrifugation mit 9000g
SCE	<u>Sister chromatid exchange</u> (Schwesterchromatid Austausch)
SHE-Zellen	<u>Syrische Hamster Embryonalzellen</u>
SLRL	<u>Sex linked recessive lethal</u>
Smac	<u>Second mitochondria-derived activator of caspases</u>
SMART	<u>Somatic mutation and recombination</u>
S <sub>N</sub>	<u>Nukleophile Substitution</u>
SPE	<u>Solid phase extraction</u>
SRB	<u>Sulforhodamin B</u>
SSA	<u>Sulfo</u> <u>salicylsäure</u> ( <u>acid</u> )
SULT	<u>Sulfo</u> <u>transferase</u>
TBS-T	<u>TBS-Tween-20</u>
TD <sub>50</sub>	<u>Dosis</u> , bei der 50% der Tiere im Langzeitversuch <u>Tumore</u> bekommen
TEMED	<u>N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin</u>
TI	<u>Tail intensity</u> (Schweifintensität)
TNB	<u>5-Thio-2-nitrobenzoat</u>
Tris	<u>Tris</u> (hydroxymethyl)-aminomethan
UGT	<u>UDP-Glukuronosyltransferase</u>
UV	<u>Ultraviolett</u>
V79-Zellen	Chinesische Hamsterlungenfibroblasten
v/v	<u>Volume per volume</u>
WHO	<u>World health organisation</u>
WST-1	<u>Water soluble tetrazolium</u>
w/v	<u>Weight per volume</u>

# 1. Einleitung

Acrylamid (AA) wurde 1949 erstmals synthetisiert und findet seither als Polyacrylamid breite Anwendung in der Industrie: z.B. als Flockungsmittel in der Trinkwasser- und Abwasserbehandlung, zur Kunststoffherstellung, als Verpackungsmaterial, in kosmetischen Produkten, als Bindemittel in der Papierindustrie, als Bestandteil von Farben und Pigmenten oder in Dichtmassen, Dichtmörteln, Vergussmaterialien und Fugenkitten auf Acrylamidbasis. AA in Form von Polyacrylamid ist gesundheitlich unbedenklich.

Seit 1997 ist AA wegen drohenden gesundheitlichen Gefahren in die öffentliche Diskussion geraten: Zunächst wurde nach einem Vorfall 1997 bekannt, dass die Bevölkerung eine Hintergrundbelastung mit AA aufweist und im Jahr 2002 veröffentlichten Tareke und Mitarbeiter, dass AA in größeren Mengen in erhitzten Kartoffel- und Getreideprodukten vorkommt. Beim Bau des Hallandsas-Tunnels 1997 polymerisierte das AA des verwendeten Dichtungsmittels „Rhoca-Gil“ nur unvollständig aus. Monomeres AA wurde in größerem Umfang freigesetzt und geriet u.a. in nahe gelegene Gewässer. Man beobachtete im Umland ein erhöhtes Fischsterben und Neurotoxizität (z.B. Taubheit der Extremitäten) bei Weidetieren. Auch die Tunnelarbeiter waren hoch exponiert und zeigten neurotoxische Symptome. Es wurde zur Expositionsabschätzung ein Biomonitoring durchgeführt und die Menge gebildeter AA-Hämoglobin-Addukte der Erythrozyten im Blut bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass die Kontrollgruppe eine unerwartet hohe Hintergrundbelastung aufwies. Bei der Suche nach der Quelle dafür wurde eine schwedische Forschergruppe auf die Exposition von AA durch Lebensmittel aufmerksam.

Seither galt großes Forschungsinteresse dem Entstehen von AA in Lebensmitteln, den Einflussfaktoren und Möglichkeiten zur Minimierung. AA entsteht bereits unter haushaltsüblichen Bedingungen beim Erhitzen (>120°C) von vor allem stärkehaltigen Lebensmitteln. Die Bildung ist abhängig von Temperatur, Erhitzungsdauer und Wassergehalt sowie dem Gehalt an Ausgangsprodukten wie der Aminosäure Asparagin und reduzierenden Zuckern. Der Prozess verläuft überwiegend nach der sogenannten Maillardreaktion<sup>1</sup> besonders beim Backen, Braten, Rösten, Grillen und Frittieren, nicht aber beim Kochen. Höhere AA-Gehalte sind beispielsweise in

---

<sup>1</sup> Maillardreaktion: Reaktion zwischen reduzierenden Zuckern und Aminoverbindungen zu erstens N-Glykosylamin-Derivaten, die im 2.Schritt eine Amadori-Umlagerung eingehen. (+ Folgereaktionen)

Frühstückszerealien, Pommes Frites, Kartoffelchips, Keksen, Lebkuchen und Kaffee nachgewiesen worden. Ein Signalwertkonzept des BVL<sup>2</sup> hält die Lebensmittelindustrie dazu an, Signalwerte<sup>3</sup> einzuhalten, die sich dynamisch mit den technischen Möglichkeiten nach dem ALARA<sup>4</sup>-Prinzip verändern (jedoch  $\leq 1\text{mg/kg}$ , was als Aktionswert festgelegt ist).

Für die Konsumenten wie Toxikologen stellt sich eine weitere entscheidende Frage: „Welches gesundheitliche Risiko ist mit der Acrylamidaufnahme verbunden?“. Die durchschnittliche tägliche Aufnahme von AA über die Nahrung beträgt in Deutschland etwa  $0,6\mu\text{g/kg}$  Körpergewicht (KG) und Person (Madle *et al.*, 2003). Je nach Ernährungsgewohnheiten, Lebensmittelbelastung und Körpergewicht können aber um ein Vielfaches höhere interne Dosen erreicht werden. Zusätzlich werden geringe Mengen dermal über Kosmetika aufgenommen und inhalativ über Zigarettenrauch. Am Arbeitsplatz können zusätzliche Belastungen durch Gießen von Polyacrylamidgelen im Laborbereich und bei der Polyacrylamidproduktion auftreten. AA als sehr kleines Molekül kann schnell resorbiert und aufgrund seiner Wasserlöslichkeit gut verteilt werden sowie in die Muttermilch übergehen.

Für neurotoxische Effekte durch AA existiert ein NOAEL<sup>5</sup> von  $0,5\text{mg/kg}$  KG pro Tag. Im Tierversuch beeinflusst AA die Fruchtbarkeit. Der NOAEL für diesen Effekt liegt bei  $2\text{mg/kg}$  KG pro Tag. Diese Werte sind nach heutigen Annahmen durch AA aus der Nahrung nicht erreichbar. Im Tierversuch erhöht AA die Tumorraten bei Ratten in Dosen von  $1\text{-}2\text{mg/kg}$  KG pro Tag. Für genotoxische kanzerogene Substanzen gilt das ALARA-Prinzip. AA ist von der IARC<sup>6</sup> 1994 in die Gruppe 2A eingestuft worden, d.h. als beim Menschen wahrscheinlich kanzerogen. Bis heute gibt es jedoch keine epidemiologisch belegbare Korrelation zwischen ernährungsbedingter Acrylamidaufnahme und Krebs beim Menschen. Es bedarf weiterer Forschung, um das Krebsrisiko für den Menschen durch AA über Lebensmittel abschätzen zu können (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BfG), 2002).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Verbesserung der Datenbasis zur Risikoabschätzung von AA. Es wurden Untersuchungen zum genotoxischen Potential und dem Wirkmechanismus von AA und seinem Metaboliten Glycidamid (GA) an Säugerzellen *in vitro* durchgeführt.

---

<sup>2</sup> BVL: Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit

<sup>3</sup> Der Signalwert ist der unterste Wert der 10% am höchsten belasteten Lebensmittel

<sup>4</sup> ALARA: „as low as reasonably achievable“

<sup>5</sup> NOAEL: no observed adverse effect level

<sup>6</sup> IARC: „International Agency for Research on Cancer“

## 2. Theorie

### 2.1 Physikalisch-Chemische Eigenschaften von Acrylamid

AA mit den Synonymen 2-Propensäureamid und Acrylsäureamid hat ein Molekulargewicht von 71,08g/mol [CAS-Nr.<sup>7</sup> 79-06-1; EINECS-Nr.<sup>8</sup> 201-173-7]. Die Summenformel lautet C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NO, die Struktur ist in Abb. 01 dargestellt.

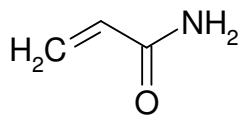


Abb. 01: Struktur von Acrylamid

In fester Form bildet AA farblose feine Kristalle. AA ist geruchlos, sehr gut löslich in Wasser, gut löslich in Ethanol und Ether (Aceton) und schmilzt zwischen 84-84,5°C. Der Siedepunkt liegt bei 125°C (25mmHg; 33,3hPa).

AA kann oberhalb des Schmelzpunktes exotherm polymerisieren.

#### Reaktivität

Wie bereits erwähnt, wird AA fast ausschließlich als Polymer verwendet. Die Polymerisation von AA verläuft über eine Radikalkettenreaktion. Als Beispiel aus dem Laboralltag wird Polyacrylamid standardmäßig als Trägermatrix von Trenn- und Sammelgelen zur Auftrennung von Proteinen verwendet (vgl. Kapitel 8). In Abb. 02 **A.** ist die radikalische Polymerisation mithilfe von Katalysatoren (Radikalbildnern) Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED) im wässrigen Milieu unter Luftausschluss (Sauerstoff würde zum Kettenabbruch führen) dargestellt. Die Vernetzung erfolgt durch Bisacrylamid (nicht im Bild dargestellt).

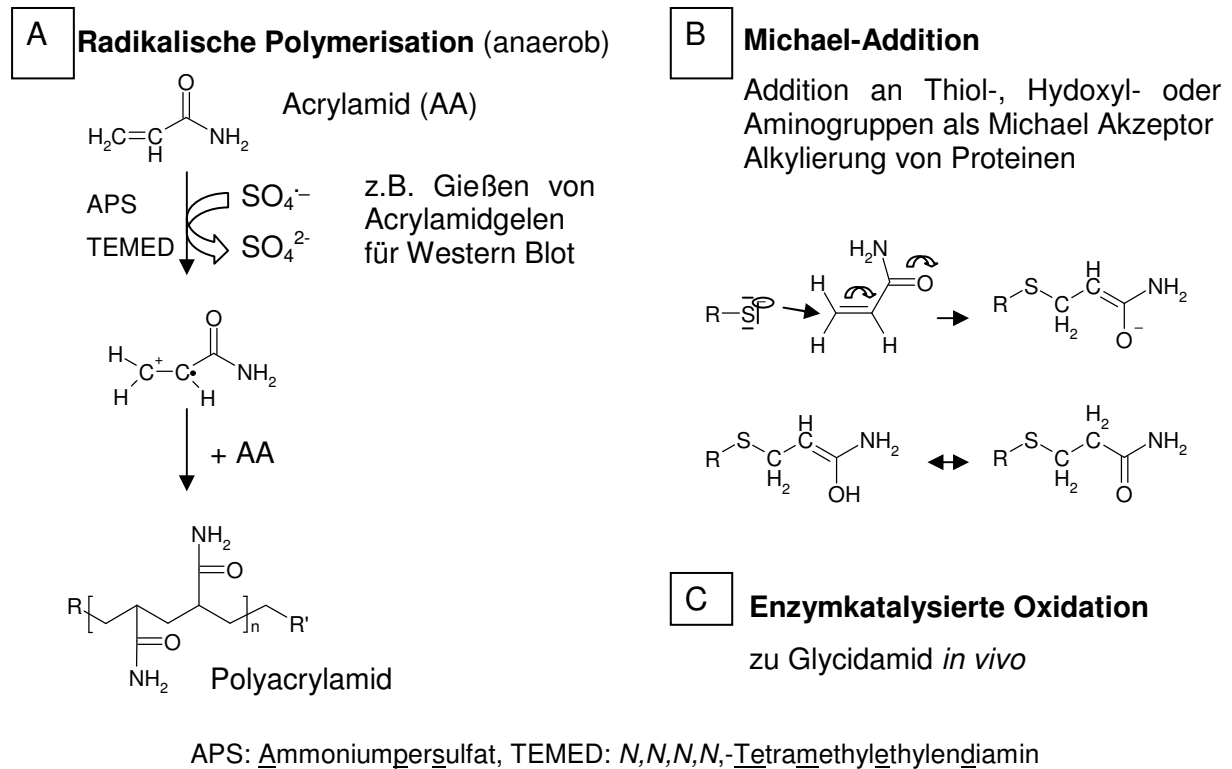
AA besitzt zwei reaktive Zentren. Die Amidstruktur kann mittels saurem oder basischem Katalysator leicht zum Acrylation oder zur Acrylsäure hydrolysieren. AA hat als  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindung eine elektronendefiziente Doppelbindung und reagiert mit nukleophilen Komponenten in einer Michael-Addition (s. Abb. 02 **B.**).

<sup>7</sup> CAS: Chemical Abstract Service

<sup>8</sup> EINECS: Europäisches Altstoffverzeichnis European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances

Den größten Teil der Reaktanten stellen Proteine und Aminosäuren mit Sulfhydrylgruppen (JIFSAN/NCFST, 2002).

Eine *in vivo* bedeutende Reaktion ist die enzymatisch katalysierte Oxidation von AA zum Metaboliten Glycidamid (GA), einem Epoxid (C). In Kapitel 2.6 wird auf diese enzymvermittelte Reaktion näher eingegangen.



**Abb. 02: Reaktionsmöglichkeiten von Acrylamid**

Je stärker der nukleophile Charakter der angreifenden Komponente, desto schneller läuft die Reaktion ab (Solomon *et al.*, 1985).

AA und GA werden jedoch den weichen Elektrophilen zugeordnet und reagieren nach dem Prinzip "Weiche Elektrophile reagieren mit weichen Nukleophilen und harte Elektrophile mit harten Nukleophilen". In der Abb. 03 sind von weich nach hart die weicheren Nukleophile und Reaktionspartner von AA und GA dargestellt.

## Kovalente Bindung an Makromoleküle



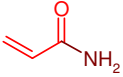
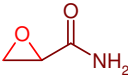
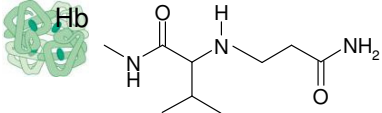
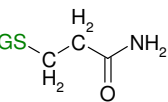
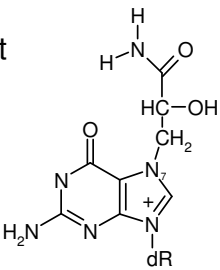
Elektrophile	Nukleophile	Addukte
<p>weich</p>  	<p>SH-Gruppe im Cys S im Met</p> <p>Prim./sek. NH<sub>2</sub>-Gruppe (Arg, Lys, His)</p> <p>Ring-N-Atome der Pu- rinbasen in DNA/RNA</p>	 <p>Hb-Addukt</p>  <p>GSH-Addukt</p>  <p>Intermediär- filamente</p> <p>DNA-Addukt</p>
<p>hart</p>	<p>hart</p>	

Abb. 03: Kovalente Bindungsmöglichkeiten von AA und GA an Makromoleküle

### 2.2 Entstehung in Lebensmitteln

AA entsteht beim Backen, Braten, Rösten und Frittieren vor allem kohlenhydratreicher Produkte. In Simulationsmodellen wurde Asparagin als effektivster Präkursor identifiziert (Levine und Smith, 2005). Asparagin reagiert zunächst in einer so genannten Maillardreaktion mit reduzierenden Zuckern. Die Reaktion ist pH-Wert-abhängig und wird begünstigt durch hohe Temperatur und niedrigen Wassergehalt. Maillardreaktionen sind komplex und führen meist zu aroma- und farbgebenden Produkten wie Melanoidinen und können *in vivo* zu durchaus problematischen „advanced glycosylation end products“ (z.B. durch Reaktion von Fruktose mit N-terminalen Valin des Hämoglobins) führen (Falbe und Regitz, 1999). AA entsteht bereits in einer frühen Stufe der Maillardreaktion. Zur Reduzierung des AA-Gehaltes wird empfohlen, die Erhitzungstemperatur und -dauer zu senken.

Stadler und Mitarbeiter (2004) sahen im *N*-Glykosid des Asparagins ein bedeutendes Intermediat in der AA-Bildung: 1 mol generiert 2,4 mmol AA in 5 min bei 180 °C (s. Abb. 04). Nach ihren Untersuchungen sind  $\alpha$ -Hydroxycarbonyle effizienter als  $\alpha$ -Dicarbonyle in der AA-Bildung. Durch Wasserabspaltung des *N*-Glykosids entsteht ein Zwitterion. Die so genannte Schiff'sche Base kann intramolekular zum Oxazolidin-5-on-Derivat zyklisieren, welches leicht decarboxyliert wird. Strecker-Abbau bzw. Decarboxylierung der Schiff'schen Base führt vorübergehend zum Azomethinylid. Durch Protonentransfer kommt es zur Bildung stabiler Tautomere, neutraler Imine, welche auch als decarboxylierte Amadori-Verbindungen bezeichnet werden. Letztlich führt die  $\beta$ -Elimination dieser decarboxylierten Amadori-Verbindungen zu AA oder je nach Ausgangsaminosäuren zu den entsprechenden Vinylverbindungen. Die  $\beta$ -Elimination ist auch die bevorzugte Reaktion gegenüber der von Mottram und Mitarbeitern (2002) postulierten Bildung von Streckeraldehyden. Weißhaar und Mitarbeiter (2002) postulierten den direkten Übergang der Schiff'schen Base ohne Strecker-Aldehyd-Bildung zu AA, was durch ein Experiment von Stadler und Mitarbeitern (2004) bestätigt wurde. Einen weiteren potentiellen Reaktionsweg ausgehend vom Asparagin oder Imin stellt das 3-Aminopropionamid (3-APA) dar. 3-APA bildet sich in Kartoffeln während der Lagerung. Dieser Vorläufer wird bei 170 °C im wässrigen Milieu zu 63 mol% in AA umgewandelt (Granvogel *et al.*, 2004). Für den in Abb. 04 eingezeichneten direkten Weg vom Imin zum AA gibt es keinen experimentellen Beweis.

Nach Yaylayan und Mitarbeitern (2005) gibt es neben dem beschriebenen Hauptbildungsweg auch Bildungsmöglichkeiten über Acrylsäure. Präkursoren für Acrylsäure sind z.B. Acrolein aus der Fettoxidation oder Aminosäuren wie  $\beta$ -Alanin, Asparaginsäure und Carnosin bzw. Cystein und Serin, die über Brenztraubensäure Acrylsäure bilden. Nach Stadler und Mitarbeitern (2005) kann Acrylsäure über eine Reaktion mit Ammoniak AA generieren. Weiterhin fehlen konkrete Beweise für die Bildung verschiedener Intermediate in der AA-Bildung (Yaylayan und Stadler, 2005).



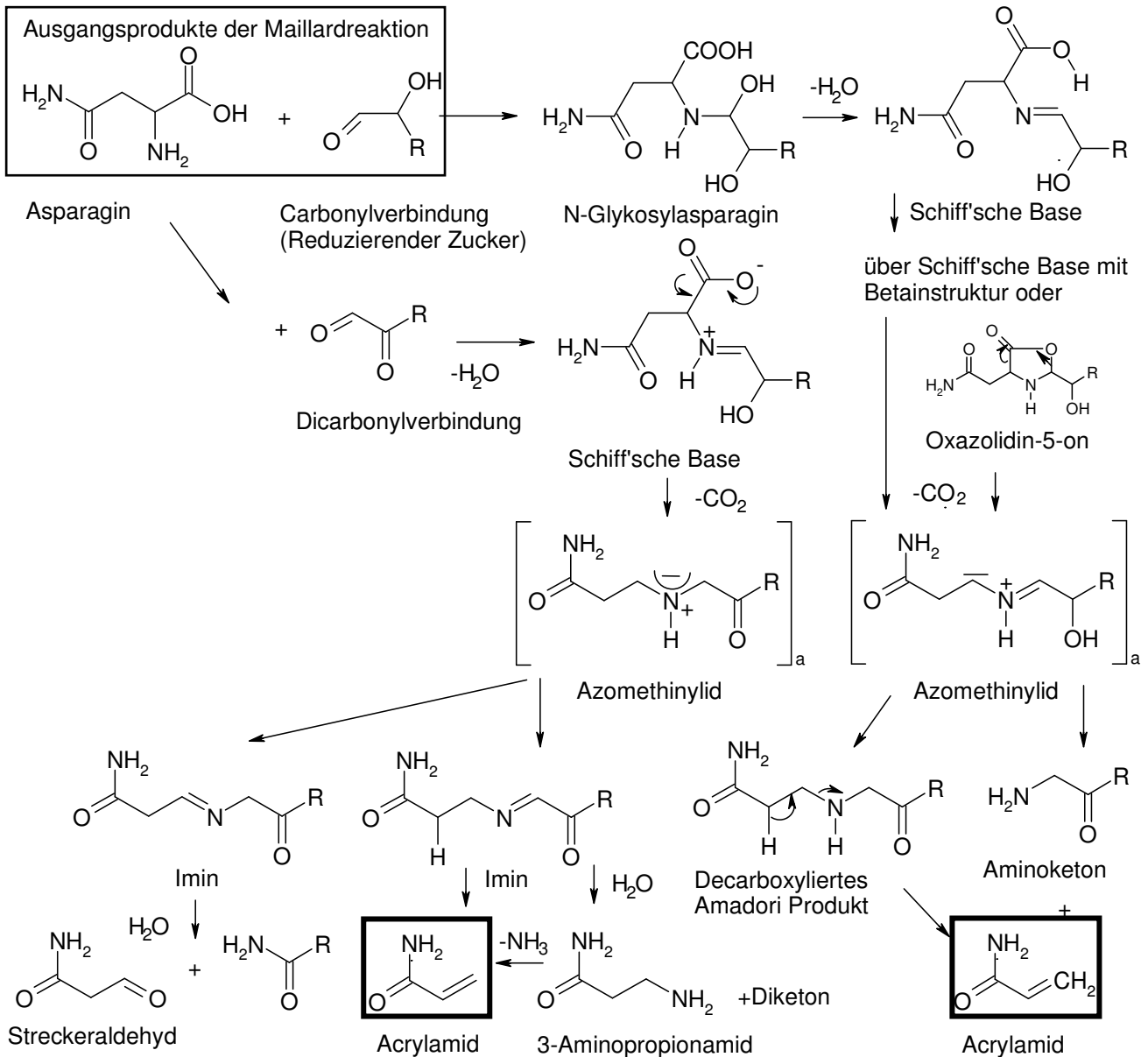


Abb. 04: Mechanismus der Acrylamid-Bildung nach Stadler *et al.*, 2004

Auch wenn AA hauptsächlich über die Reaktion von Asparagin mit einer Carbonylverbindung gebildet wird, beträgt die AA-Ausbeute weniger als 1 mol% (Stadler *et al.*, 2004).

## 2.3 Exposition und Grenzwerte

### Exposition in der Umwelt

AA wird anthropogen in die Umwelt eingetragen und entsteht nur in geringem Umfang bei natürlichen Prozessen. In der Europäischen Union (EU) werden schätzungsweise 80.000-100.000t AA jährlich produziert (European Commission, 2002).

Etwa 99,9% davon werden zur Herstellung von Polyacrylamid verwendet. Ca. 80-90% des Polyacrylamids werden in der Ab- und Trink-Wasseraufbereitung sowie Papierindustrie verwendet. 0,1% AA wird als Vernetzungsmittel in der Polyacrylamidgелеlektrophorese zur Proteinauftrennung (Forschung & Diagnose) eingesetzt. In Vergussmaterialien wird u.a. auch *N*-Methylolacrylamid verwendet, welches z.B. unter alkalischen Bedingungen zu AA abgebaut werden kann (Weideborg *et al.*, 2001). Mittlerweile wird in der EU auf AA in der Produktion von Verdichtungsmitteln verzichtet, außerhalb jedoch nicht (European Commission, 2002).

AA ist mikrobiell abbaubar und hat nur geringes Potential *in vivo* zu akkumulieren, d.h. es kommt weder zur Biokonzentration noch Biomagnifizierung (Anreicherung über die Nahrungsmittelkette). Die Halbwertszeit an der Atmosphäre beträgt 8,3h (European Commission, 2002).

### Humane Expositionspfade, Absorption & Verteilung

Nach Dearfield und Mitarbeitern (1995) kann der Mensch über Verschlucken, Inhalation und dermalen Kontakt mit AA exponiert sein. Während die alleinige AA-Aufnahme über Trinkwasser vernachlässigbar scheint (max. 0,25µg bei getrunkenen 2l täglich), addiert sich die Aufnahme von AA aus Trinkwasser, Kosmetik-Produkten, erhitzten Lebensmitteln, beruflicher Exposition und Zigarettenrauch.

Raucher weisen gegenüber Nichtrauchern z.B. erhöhte Mengen AA-Mercaptursäuren *N*-acetyl-S-(2-carbamoylethyl)-L-cystein (AAMA<sup>9</sup>) im Urin auf (Boettcher *et al.*, 2005), was u.a. auf eine gute Aufnahme nach inhalativer Exposition spricht. Dass AA nach oraler und dermalen Gabe über einen weiten Dosisbereich schnell und vollständig resorbiert und im ganzen Körper verteilt wird, ist aus Tierversuchen bekannt (Madle *et al.*, 2003). AA und/oder seine Metaboliten erreichen die Geschlechtsorgane und passieren die Plazenta. AA geht auch in die Muttermilch über.

---

<sup>9</sup> AAMA: acrylamide mercapturic acid

### **Eintrag in die Muttermilch/Carry-over**

Da AA in die Muttermilch übergeht, sind Säuglinge ebenfalls exponiert. Sörgel und Mitarbeiter (2002) haben den AA-Gehalt in der Muttermilch zweier stillender Frauen zeitabhängig nach Verzehr von 100g AA-haltigen Kartoffel-Chips (800µg und 1mg) gemessen. 4h nach AA-Aufnahme wurden die höchsten Konzentrationen an AA mit 4,86ng/ml und 18,8ng AA/ml in der Muttermilch gefunden. Für den Säugling der höher belasteten Mutter hätte das nach dieser Studie zu einer Aufnahme von bis zu 3,3µg AA/kg KG und Tag führen können. Kurz darauf wurde in einer breiter angelegten Studie des LGL<sup>10</sup> AA in der Muttermilch von 172 Müttern quantifiziert. Die AA-Gehalte lagen hierbei meist unter 0,3µg/kg Muttermilch. Damit lagen sie deutlich niedriger als die Maximalwerte von ~ 5µg/kg und 19µg/kg der Studie von Sörgel und Mitarbeitern (2002) nach bekannter (bezüglich Menge und Zeitpunkt) und extremer AA-Aufnahme der Mütter. Die teilnehmenden Mütter der LGL-Studie wurden zu ihren Ernährungsgewohnheiten befragt. Die Ergebnisse ließen aber keine Korrelation zu der geschätzten AA-Aufnahme über die Nahrung erkennen.

Zum Carry-over genannten Effekt kommt es auch bei Nutztieren: Das AA belasteter Futtermittel findet sich in Hühner-Eiern und Kuhmilch wieder (Pabst *et al.*, 2005).

### **Exposition über Lebensmittel**

Zu den in Deutschland am höchsten belasteten Produkten zählen Kartoffelprodukte (Pommes frites & Chips), wobei die AA-Gehalte verschiedener Chargen des gleichen Produktes schwanken können (bgvv, 2002). Abhängig vom Alter und den Verzehrsgewohnheiten ergeben sich deutlich unterschiedliche Expositionshöhen. Bei Expositionsabschätzungen von AA über Lebensmittel sind auch geringer belastete Lebensmittel zu berücksichtigen, die häufig verzehrt oder getrunken werden. Kaffeepulver beispielsweise enthält nach BVL-Angaben etwa 270µg AA/kg und zählt bei Erwachsenen zu den wichtigsten Belastungsquellen. Es gibt Schätzungen, dass der Kaffeekonsum einen Anteil von mehr als 30% Anteil an der AA-Aufnahme hat (Madle *et al.*, 2003). Bei 1- bis 6-jährigen Kindern spielt Kaffee keine Rolle, Kekse und Pommes frites hingegen vermehrt (Boon *et al.*, 2005). Während die durchschnittliche AA-Aufnahme auf 0,6µg/kg KG/Tag sich eher auf Erwachsene in Deutschland bezieht, haben Boon und Mitarbeiter (2005) für 1- bis 6-jährige in den Niederlanden eine durchschnittliche AA-Aufnahme von 1,1µg/kg KG/Tag berechnet. Als mögliche

---

<sup>10</sup> LGL: Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit

Risikogruppe gelten nach Madle junge Erwachsene. Bei Darstellung eines „realistischen worst-case-Szenarios“ ergibt sich eine AA-Aufnahme von  $3,38\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$  für 15- bis 18-jährige, ausgelöst durch Verzehr hoch belasteter Lebensmittel wie Müsli, Kekse, Knäckebrot, Kartoffel-Knabbererzeugnisse und Pommes frites (Madle *et al.*, 2003).

Da es in jedem Land andere Verzehrsgewohnheiten gibt, existieren verschiedene Expositionsabschätzungen. In Norwegen liegen die Schätzungen für die durchschnittliche tägliche Aufnahme bei  $0,41\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$  für Männer und  $0,42\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$  für Frauen (Dybing und Scanner, 2003). Die Abschätzung für die Exposition der Bevölkerung in den USA, die das neunzigste Perzentil berücksichtigt, wird für Erwachsene mit  $0,92\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$  und für zwei- bis fünfjährige Kinder mit  $2,31\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$  angegeben (O'Brien *et al.*, 2006). Die JECFA<sup>11</sup> hat für ihre Risikoabschätzungen tägliche Aufnahmemengen von  $1\text{-}4\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$  kalkuliert als repräsentative AA-Aufnahme der allgemeinen Bevölkerung einschließlich der, beispielsweise durch einseitige Ernährung, hoch exponierten Konsumenten (JECFA, 2005).

### **Grenz- und Signalwerte in Trinkwasser, Lebensmitteln und Bedarfsgegenständen**

Bei Verwendung von Polyacrylamid können immer auch Spuren monomeren AAs als Verunreinigung festgestellt werden. Die Verunreinigung darf jedoch maximal 0,1% betragen, ohne dass Polyacrylamid selbst in Klasse 2 als kanzerogen eingestuft wird. Die WHO<sup>12</sup> hat einen Grenzwert von  $0,1\mu\text{g}/\text{l}$  für AA in Trinkwasser festgelegt. Nach der deutschen BedarfsgegenständeVO darf die Migration von AA aus Verpackungsmaterialien in Lebensmitteln nicht nachweisbar sein (Nachweisgrenze  $0,01\text{mg}/\text{kg}$ ). Kosmetische Mittel dürfen bis zu 2% Polyacrylamid enthalten. Gemäß Anhang III, Nr. 66 der Kosmetikrichtlinie 76/768/EWG<sup>13</sup> darf der Restgehalt an AA durch Polyacrylamid in Körperpflegemitteln, die auf der Haut verbleiben,  $0,1\text{mg}/\text{kg}$  nicht überschreiten. Für so genannte „rinse-off“-Produkte liegt der Grenzwert bei  $0,5\text{mg}/\text{kg}$ . Für AA-Restgehalte aus anderen Rohstoffen (AA-Quellen in Kosmetika) wie Polyquaternium-7 in Haarstyling-Produkten existieren noch keine Höchstwerte (BfR, 2003). Wie in Kapitel 1 erwähnt, gibt es für Acrylamidgehalte zusätzlich zum generellen Aktionswert von  $1\text{mg}/\text{kg}$  Lebensmittel in Lebensmittel-Produktgruppen vom BVL Signalwer-

---

<sup>11</sup> JECFA: Joint Expert Committee on Food Additives

<sup>12</sup> WHO: world health organisation

<sup>13</sup> EWG: Europäische Wirtschaftsgemeinschaft

te. Als ein aktuelles Beispiel für Signalwerte verschiedener Produktgruppen und Acrylamidgehalte in deutschen Lebensmitteln sind in Tab. 01 die Stichprobenresultate vom Institut für Lebensmitteluntersuchungen und Umwelthygiene (IfLU) 2005 dargestellt.

**Tab. 01: Beispiel für AA-Gehalte und Signalwerte in Lebensmitteln (IfLU, 2005)**

Waren- gruppe	Lebensmittel (Probenzahl)	Median	Acrylamid- Gehalt		Signal- wert	Signalwert- überschrei- tung
			Min.	Max.		
181001-7	Mürbegebäck (23)	89	0	260	575/300*	-
18101	Spekulatius (10)	109	60	600	560	1
240306	Reibekuchen, gegart (23)	929	180	3080	1000	11
2403	Kartoffeln, gegart; z.B. Pommes frites, Kroketten (63)	236	70	660	530	1
2407	Kartoffelknabber- erzeugnisse (14)	688	130	1250	1000	4
4602	Kaffee, geröstet (1)			270	370	-

\*Absenkung des Signalwertes mit der 5. Berechnung vom 21.10.2005  
Dimension:  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 0; < Bestimmungsgrenze ( $21\mu\text{g}/\text{kg}$ )

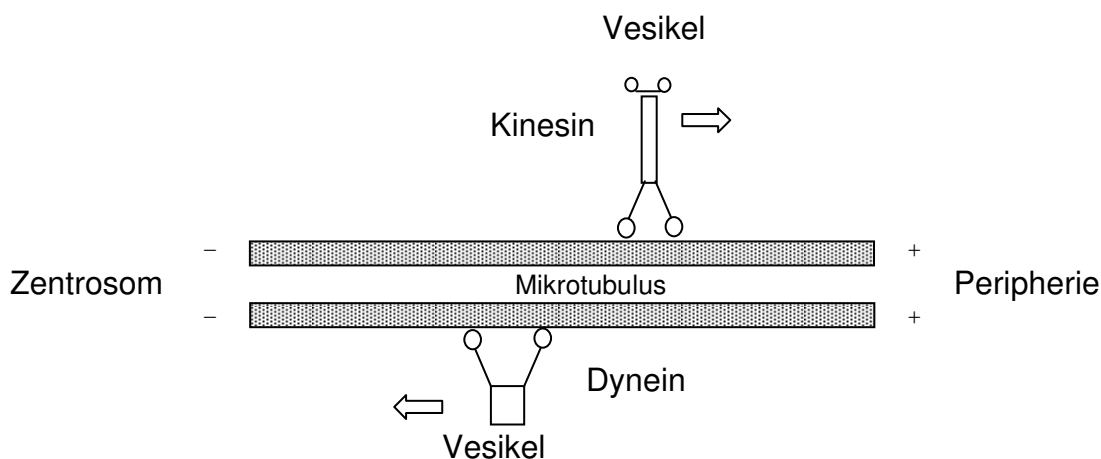
## 2.4 Toxizität

### 2.4.1 Neurotoxizität

Charakteristisch für die AA-induzierte Neurotoxizität ist die Degeneration der Neuronen vom distalen zum proximalen Ende hin. Die Haut der Hände schält sich, Kribbeln und Taubheit in den Gliedmaßen stellt sich ein gefolgt von einem stockenden Gang und weiteren Dysfunktionen des Nervensystems (Calleman *et al.*, 1994). AA scheint an labile filamentöse Strukturen (z.B. Motorproteine, s. Abb. 05) sowie an stabile Intermediärfilamente binden zu können, welche einerseits die strukturelle Integrität der Zellen und Gewebe sichern und andererseits Bewegung ermöglichen. Für die Ursache der Neurotoxizität wird diskutiert, dass AA Kinesin und Dynein inaktiviert, wodurch Transportprozesse gestört werden (Tyl und Friedman, 2003). Als Brückenmoleküle verbinden Kinesin und Dynein dabei den Mikrotubulus mit Ladungen wie Vesikeln oder Zellorganellen (s. Abb. 06). Betroffen ist dann auch der trans-axonale Transport z.B. des Nerven-Wachstumsfaktors (nerve growth factor) vom Zellkörper zum distalen Axon.



**Abb. 05:**  
Kinesin



**Abb. 06: Bewegung am Mikrotubulus: Kinesin wandert bevorzugt von Minus in Plus-Richtung vom Zentrosom weg und Dynein umgekehrt; Biologie für Mediziner, modifiziert (<http://de.wikibooks.org>).**

LoPachin (2002) bezweifelte allerdings, dass Axon- und trans-Axontransportprozesse die primäre Angriffsstelle für AA darstellen. Er hält die Neuropathie für ein Epiphänomen, dessen Ausmaß von der AA-Intoxikation abhängt (LoPachin, 2002). Eine hohe Dosis AA i.p. führte zur erhöhten Expression von Proteinen des Nervensystems in Ratten, die in Verbindung mit Apoptose stehen (Li *et al.*, 2006).

## 2.4.2 Mutagenität und Genotoxizität

### 2.4.2.1 Datenlage

Moore und Mitarbeiter (1987) haben eine erhöhte Mutantenfrequenz durch AA an L5178Y/TK+/- -Zellen<sup>14</sup> ohne exogene metabolische Aktivierung bei einer Dosis zwischen 600 und 850µg/ml nachgewiesen. AA erwies sich als klastogen, wie vorausgesagt als Induktor von Chromatid- und Chromosomenbrüchen und Umlagerungen, obwohl AA zuvor auch in einigen Genotoxizitätstest wie im *Salmonella* Test und CHO/HPRT<sup>15</sup> Test keine Wirkung zeigte (Moore *et al.*, 1987). Knaap und Mitarbeiter (1988) haben AA in einer Reihe von Genotoxizitätstests untersucht einschließlich einem *Salmonella*/Mikrosomen Test, Fluktuationstest an *Klebsiella pneumoniae*, Genmutationstests am TK- und HPRT- Locus in L5178Y-Zellen, Tests für chromosomale Aberrationen und SCEs<sup>16</sup> an V79-Zellen, SLRL<sup>17</sup> und SMART<sup>18</sup> Assay an *Drosophila melanogaster* und Maus-Knochenmark-Mikrokerntest. In den meisten dieser Systeme zeigte AA schwache genotoxische Aktivität in der höchsten Dosis. Die bakteriellen Tests waren negativ und beim SLRL Test an *Drosophila* wurde ein leichter nicht signifikanter Anstieg der Mutationsrate festgestellt (Knaap *et al.*, 1988). Die Ergebnisse zu AA an bakteriellen Tests (Stämme von *Salmonella typhimurium*) in der Literatur zeigen konsistent keine Mutagenität sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit exogen aktivierender Systeme (Besaratina und Pfeifer, 2005). Der Metabolit GA dagegen erwies sich als mutagen am bakteriellen Test auch ohne zusätzliche Aktivierung (Besaratina und Pfeifer, 2005). GA zeigte mutagene Aktivität signifikant ab 800µM (24h) im HPRT-Test an V79-Zellen, keine signifikante Mikrokerninduktion, aber DNA-Schäden ab 300µM im Comet-Assay an humanen Lymphozyten (Baum *et al.*, 2005). Unter Anwendung eines Comet-Assays mit einer DNA-Glykosylase wurden DNA-Strangbrüche durch GA ab 10µM (4h) an humanen Lymphozyten detektiert (Thielen *et al.*, 2006). In der Studie von Baum und Mitarbeitern (2005) erwies sich AA im HPRT-Test (bis 6mM), Mikrokerntest (bis 5mM) und Comet-Assay (bis 6mM) als inaktiv. Es gibt jedoch auch eine Studie, in der AA mutagen im HPRT-Test an CHO-Zellen mit und ohne exogen aktivierendem System war sowie mutagen im TK-Locus an Maus-Lymphoma-Zellen (Besaratina und Pfeifer, 2005). AA wurde in mehreren

<sup>14</sup> Maus-Lymphoma-Zellen mit Mutation im Thymidinkinase-Locus

<sup>15</sup> CHO: Chinesische Hamster Ovarzellen; HPRT: Hypoxanthin Phosphoribosyl-Transferase

<sup>16</sup> SCE: Sister chromatid exchange (Schwesterchromatid Austausch)

<sup>17</sup> SLRL: sex linked recessive lethal

<sup>18</sup> SMART: somatic mutation and recombination

Studien als klastogen nachgewiesen. Eine Studie detektierte allerdings konzentrationsabhängig steigende Störungen des Spindelapparates durch AA (0,01-1mg/ml; 6h) an V79-Zellen (Adler *et al.*, 1993). An der "Muta Mouse" erhöhte die subakute intraperitoneale Gabe von 5 täglichen Dosierungen an AA (50mg/kg KG) die Frequenz von lacZ Mutationen im Knochenmark etwa auf das 1,8fache der Hintergrundmutationen (Besaratina und Pfeifer, 2005).

Besaratina und Pfeifer (2003) haben die Mutagenität des *c//* transgen in Big Blue Mäuseembryonenfibroblasten durch AA untersucht. GA erwies sich im Vergleich zu AA als das stärkere Mutagen in diesem Testsystem. Die Analyse des Mutationspektrums mittels DNA-Sequenz-Analyse zeigte, dass als Kennzeichen für GA bedingte Mutationen typische G:C → T:A Transversionen auftraten, die weder nach AA-Behandlung noch in der Kontrolle vorkamen (Besaratina und Pfeifer, 2005), als Folge von GA-Addukten mit der DNA (vgl. Kapitel 2.6.2).

Paulsson und Mitarbeiter (2003) erhielten linear-quadratische Dosiswirkungsbeziehungen von GA-Gabe (injiziert) und Mikrokernfrequenzen. GA besaß die gleiche Potenz Mikrokerne zu induzieren, ob nach Epoxidation von AA oder direkt gegeben. Sie kamen daher zu dem Schluss, dass GA der ausschlaggebende genotoxische Faktor in der AA-Exposition ist.

Nach Doerge und Mitarbeitern (2005) führten 50mg AA/kg in Mäusen und Ratten zu GA-Derivaten von Addukten mit Adenin und Guanin der DNA in Ziel- und Nicht-Zielgeweben. Zielgewebe sind Gewebe, in denen es zu Tumoren durch AA im Nagetier kommt. Die Bildung der DNA-Addukte war dabei konsistent mit Mutagenitätsdaten zu AA und GA. Sie deuteten ihre Ergebnisse als bedeutende Anzeichen für einen *genotoxischen* Mechanismus der Kanzerogenität durch AA im Nagetier. (Doerge *et al.*, 2005).



## 2.4.2.2 Mechanismen der Genotoxizität

### 2.4.2.2.1 DNA-Addukte

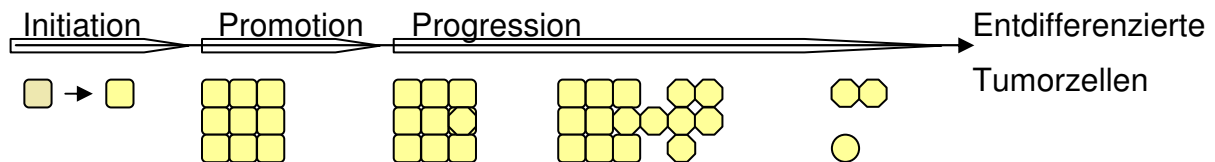
#### Bedeutung für Zelle und Organismus

DNA-Addukte entstehen, wenn Elektrophile mit der DNA kovalent binden (vgl. Kapitel 2.4). Sie stellen zunächst eine Form von DNA-Schaden dar, auf die die Zelle ähnlich wie auf oxidativen Stress mit Anhalten des Zellzyklus, DNA-Reparatur oder Apoptose antworten kann. DNA-Addukte können zu Störungen und Ablesefehlern bei der Expression und Replikation führen. Schafft es die Zelle nicht rechtzeitig, den Schaden zu erkennen und zu reparieren, die Zellteilung anzuhalten oder in Apoptose zu gehen bevor sich die Zelle mit DNA-Addukt teilt, kann das DNA-Addukt eine vererbare DNA-Veränderung erzeugen. Diese Mutation kann für die Zelle im besten Fall ohne Folgen, unbedeutend oder letal sein, im schlechtesten Fall von „egoistischem“ Vorteil für die mutierte Zelle, was für den Organismus Krebs bedeuten kann.

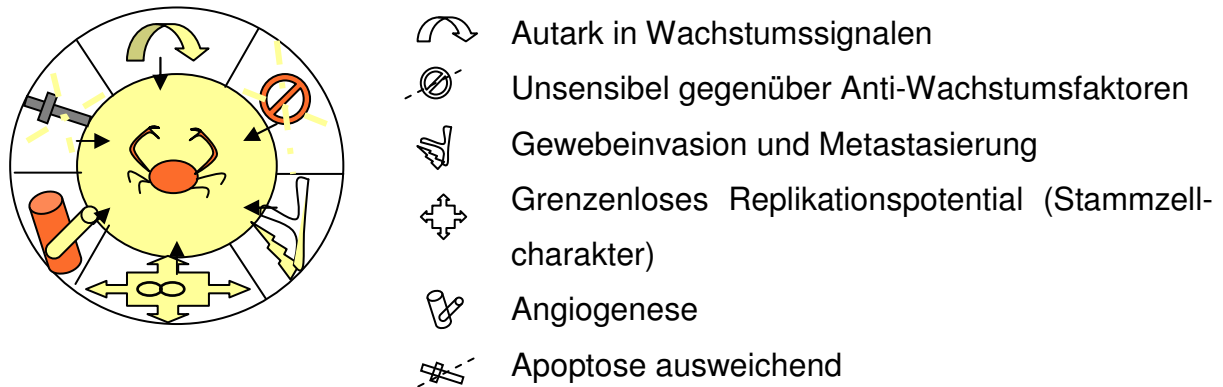
In der Krebsentstehung (s. Abb. 07) spricht man von Initiation. Die durch ein genotoxisches Mutagen initiierte Zelle verfügt über eine Mutation, die ihr meist einen Wachstumsvorteil oder durch Entzug der Kontrolle durch Nachbarzellen die Verselbständigung im Organismus ermöglicht. Durch Promotion wird der Klon zum Wachstum angeregt und entwickelt sich zum präneoplastischen Focus. Promovierend können sich z.B. endokrin wirksame Substanzen und Entzündungen auswirken. Je nach vom DNA-Addukt betroffenen Gen kann ein Wachstumsvorteil aus dem Defekt oder Verlust eines Tumorsuppressorgens resultieren. Tumorsuppressorgene sind meistens in die Zellzykluskontrolle hemmend involviert, während Protoonkogene aktivieren. Daher werden überexprimierte Protoonkogene zu Onkogenen. Aber nicht nur Wachstum alleine, sondern ungehemmtes invasives Wachstum durch Verlust von Kontaktinhibition und Mobilisierung sind Eigenschaften von Tumorzellen, die sie während der Progression erwerben. In der Progression überschneidet sich das lineare Mehrstufenmodell mit dem Kombinatorischen Mehrdefektmodell der Kanzerogenese (s. Abb. 07). Denkbar ist die Initiation nicht nur durch eine durch Mutation bevorteilte Zelle, sondern auch in ihrer DNA-Reparatur beeinträchtigte Zelle. Denn die genomische Instabilität begünstigt den Zufall mehrerer Gen- und Zellveränderungen, die bei einer malignen Tumorzelle vorliegen. Im linearen Modell erfolgt die zunehmende Ma-

lignität bei der Progression, beim Mehrdefektmodell gibt es keine festgelegte Reihenfolge, in der die „krebs-kritischen“ Gene verändert werden. In Abb. 07 sind lineares Modell und Mehrdefektmodell nach Hanahan und Weinberg (2000) nebeneinander gestellt.

A)



B)

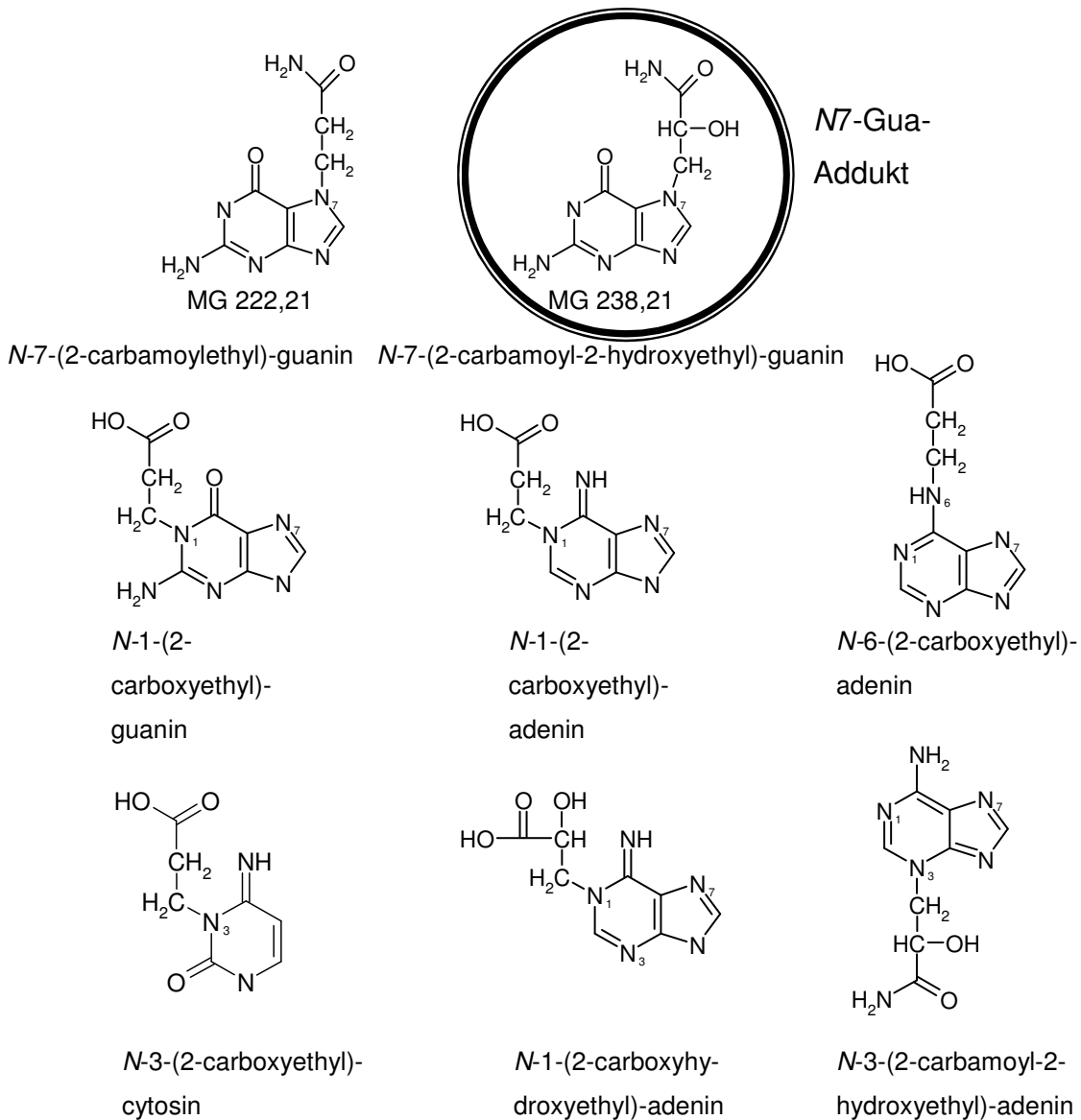


**Abb. 07: Vergleich zwischen dem Linearen und dem Kombinatorischen Modell der Kanzerogenese A) Lineares Mehrstufenmodell der Kanzerogenese B) Mehrdefekt-Modell der Kanzerogenese, modifiziert nach Hanahan und Weinberg (2000).**

Die meisten potenten Kanzerogene binden kovalent an die DNA und sind daher in Mutagenitätstests positiv. Oft korreliert die Menge an nachweisbaren DNA-Addukten mit der Tumorfrequenz und -größe. Es sind in der Regel Dosis-Wirkungs-Beziehungen vorhanden. In einer Sequenzanalyse wurde in den p53-Tumorsuppressorgenen von an Krebs erkrankten Rauchern auch durch polyzyklische Kohlenwasserstoffe (PKWs) charakteristische Mutationsspektren wie etwa G:C nach T:A Transversionen nachgewiesen (Greenblatt *et al.*, 1994).

## Bildung von DNA-Addukten mit Acrylamid

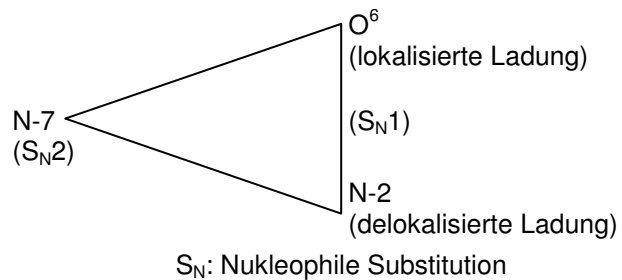
Solomon und Mitarbeiter (1985) identifizierten Addukte von AA mit der DNA. Dazu wurde 86mmol (4,8g) AA bei 37°C und pH 7 für die Dauer von 40 Tagen mit 150mg Kalbsthymus-DNA geschüttelt (Solomon *et al.*, 1985). In Abb. 08 sind die unter diesen sehr drastischen Bedingungen entstandenen und mittels Strukturanalyse identifizierten DNA-Addukte dargestellt.



**Abb. 08: Strukturen von DNA-Addukten mit Acrylamid und Glycidamid nach Besaratinia und Pfeifer, 2005.**

In absteigender Reihenfolge nach Bildungsmengen wurden *N*-1-(2-carboxyethyl)-adenin, *N*-3-(2-carboxyethyl)-cytosin, *N*-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin, *N*-6-(2-carboxyethyl)-adenin und *N*-1-(2-carboxyethyl)-guanin gefunden (Solomon *et al.*, 1985). Das im Bild hervorgehobene *N*-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanin (*N*-7-

Gua-Addukt) ist das hauptsächlich gebildete Addukt in *in vitro*-Situationen (Segerbäck *et al.*, 1995) sowie *in vivo* (Gamboa da Costa *et al.*, 2003). AA ist ein alkylierendes Agens, welches jedoch sehr langsam mit DNA reagiert (vgl. Kapitel 2.2 zur Reaktivität). Nach Anthony Dipple (1995) kann die bevorzugte Reaktionsstelle am Guanosin vorhergesagt werden, wenn der ionische Charakter eines



**Abb. 09: Bindungsstellen verschiedener Kanzerogene am Guanin der DNA nach A. Dipple, 1995.**

alkylierenden oder arylalkylierenden Agens sowie dessen Fähigkeit, als Ion seine Ladung zu lokalisieren oder delokalisieren, bekannt ist. Von ihm stammt das nachskizzierte Reaktions-Dreieck (hier ohne Verbindungsbeispiele) in Abb. 09. Ring-Stickstoff-substituierte Produkte sind instabil. 7-substituiertes Deoxyguanosin führt leicht zur Depurinierung und Imidazol-Ringöffnung.

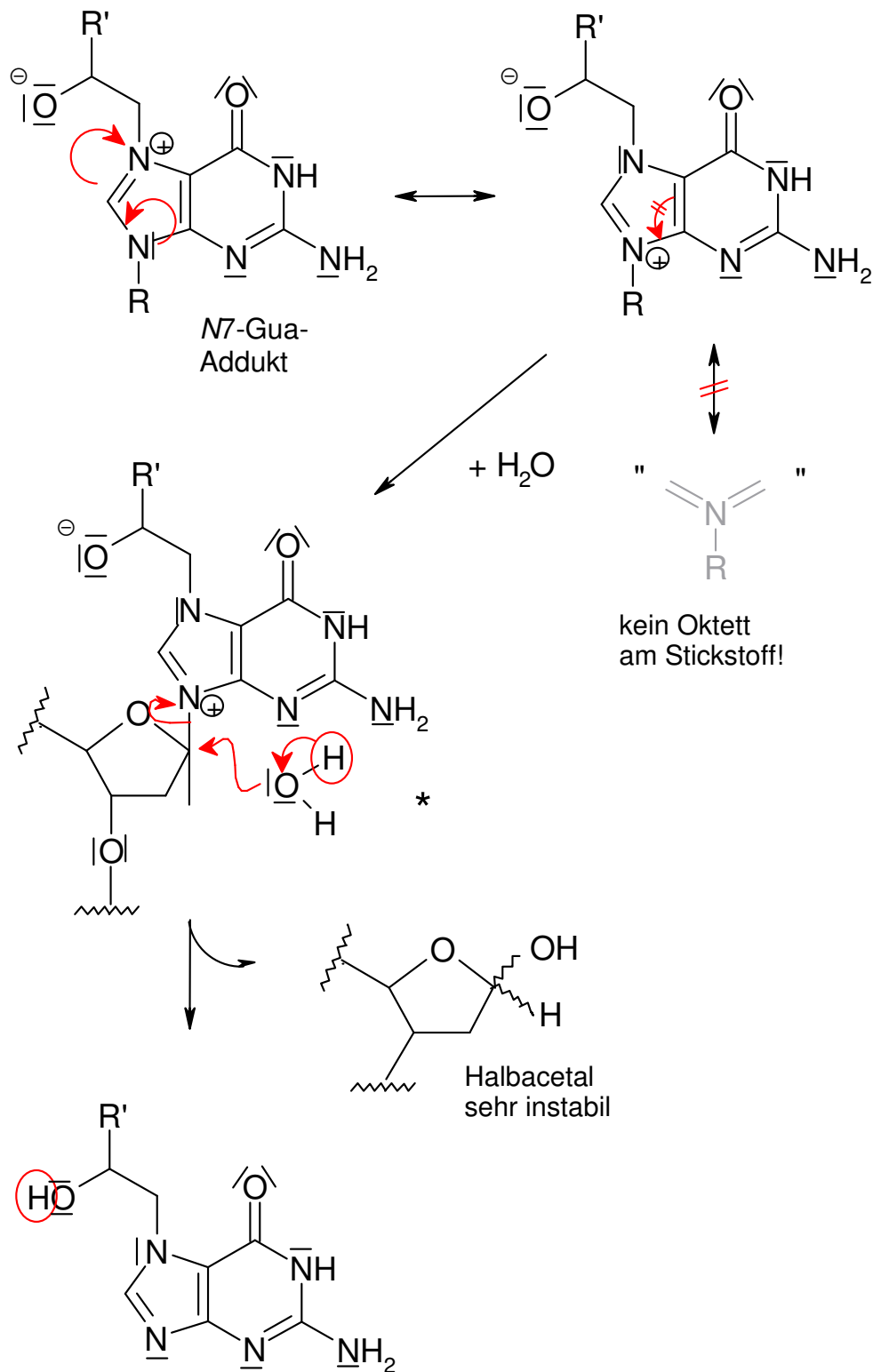
Segerbäck und Mitarbeiter (1995) haben das vorwiegend gebildete *N7*-Gua-Addukt nach direkter Inkubation von AA mit isolierter DNA unter Zugabe eines S-9-Mix<sup>19</sup> bestimmt. Das *N7*-Gua-Addukt wird durch Reaktion von GA gebildet. AA ist im Ames-Test negativ, während GA positiv und reaktiver als AA ist, weshalb GA im Verdacht steht, hauptsächlich für die genotoxische Wirkung von AA verantwortlich zu sein. Zudem wird AA zügig eliminiert und GA zeigt sich als relativ stabiles Epoxid mit einer Halbwertszeit von 1,5h *in vivo*. Daneben behandelten Segerbäck und Mitarbeiter (1995) Mäuse und Ratten mit einer einmaligen, hohen Dosis (43 und 53mg/kg KG) <sup>14</sup>C-markierten AA und bestimmten das *N7*-Gua-Addukt verschiedener Gewebe. Dabei stellte sich heraus, dass die Organspezifität von AA in der Kanzerogenese nicht durch Akkumulation DNA-reaktiver Metabolite (GA) in den Zielorganen zu erklären ist. In beiden Nagetier-Spezies und untersuchten Geweben (Leber, Lunge, Niere, Milz, Gehirn und Testes) wurden ähnliche Adduktlevel gefunden (Segerbäck *et al.*, 1995). Die Ergebnisse sind konsistent mit denen ähnlicher Versuche von Maniere und Mitarbeitern (2005), die an Ratten eine einmalige AA-Dosis von 18, 36 und 54mg/kg KG verabreichten: auch hier war die Adduktverteilung (vom *N7*-Gua-Addukt

<sup>19</sup> S-9-Mix: von engl. Supernatant 9000g= der Überstand eines Leberzellhomogenats der Ratte nach Zentrifugation mit 9000g; enthält Mikrosomen und wird oft als „Aktivierungssystem“ *in vitro* genutzt

und einem Nebenaddukt am N3 der Adeninbase) unspezifisch und ergab keine Korrelation zu den Target-Organen für Kanzerogenität. Allerdings schien der in derselben Studie mittels Comet Assay *in vivo* gemessene DNA-Schaden der Ratte in Gehirn und Testes durch AA mit der in Ratten bekannten Organspezifität von AA übereinzustimmen. Damit könnte der DNA-strangbrechende Effekt der Verbindung ein einfacher Biomarker für die Acrylamidexposition und Genotoxizität sein (Maniere *et al.* 2005).

### **Neutrale thermische Hydrolyse**

Ein entscheidender analytischer „Trick“, welcher die sensible quantitative Bestimmung des N7-Gua-Adduktes ermöglicht, ist das spezifische Herauslösen dieses labilen Adduktes aus dem DNA-Zusammenhang durch neutrale thermische Hydrolyse der isolierten DNA (Segebäck *et al.*, 1995; Gamboa da Costa *et al.*, 2003, Doerge *et al.*, 2005, Yamada *et al.*, 1998). Das durch die Bindung von GA entstandene positiv geladene N7-Gua-Addukt stabilisiert sich bei Hitze im Wässrigen unter Zuckerabspaltung. Im Vergleich dazu führen saure und alkalische Bedingungen zur vollständigen Hydrolyse der DNA, wodurch keine Auftrennung erfolgen würde. Das Prinzip der in dieser Arbeit angewendeten N7-Gua-Addukt-spezifischen neutralen thermischen Hydrolyse ist in der Abb. 10 skizziert.



\*  $\oplus$ - Ladung am N-Atom, welches Zucker bindet ↻

Abspaltung ermöglicht Ladungsausgleich

Abb. 10: Neutrale thermische Hydrolyse

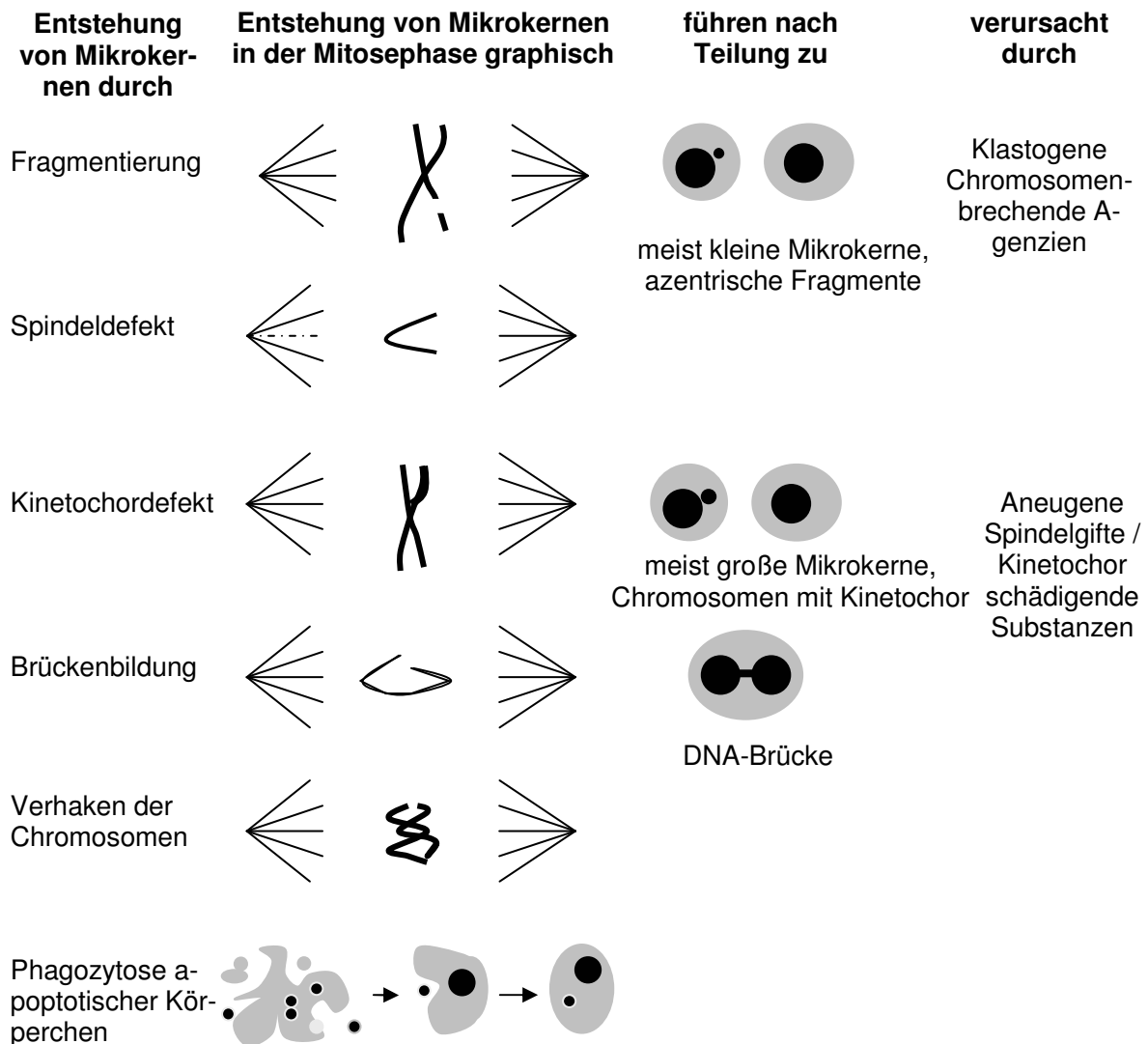
#### **2.4.2.2 Mikrokerne**

Ein Mikrokern besteht aus Chromatin, welches vom Hauptkern abgesondert im Zytoplasma liegt und von einer doppelten Kernmembran umgeben ist. In der Regel sind Mikrokerne Indikatoren für Genommutationen. Hierbei bestehen Mikrokerne aus Chromosomenbruchstücken oder ganzen Chromosomen, die durch Fehlverteilung entstanden sind (oder auch Zerreißen von verhakten Chromosomen, Chromatiden oder apoptotische Kernkörperchen; s. Abb. 11; Fenech, 2000).

Bei eukaryotischen Zellen löst sich die Kernmembran während der Mitose auf und wird in der Telophase um die eng zusammenliegenden Chromosomen neu gebildet (Zankl in Zang und Henn, 1999). Separates Chromatin kann in der Telophase einzeln umschlossen werden. Zusätzliche, fehlverteilte Chromosomen müssen aber nicht unbedingt zu Mikrokernen führen. 30% davon werden mit in den Hauptkern eingebunden (Heddle *et al.*, 1991). Ebenso führen nicht alle Chromosomenaberrationen zu Fragmenten: ein Teil führt zu Insertionen und Translokationen (Hofmann, 2000). Der Mikrokern ist morphologisch außer hinsichtlich der Größe mit dem Hauptkern identisch; er besitzt Kernporen, Kernhülle, Hetero- und Euchromatin.

Die Anzahl an Mikrokernen kann durch Mutagene erhöht werden. Aber auch nach Unterkühlung von Versuchstieren oder nach sportlicher Betätigung von Probanden in humanen Lymphozyten kann eine erhöhte Mikrokernfrequenz festgestellt werden.

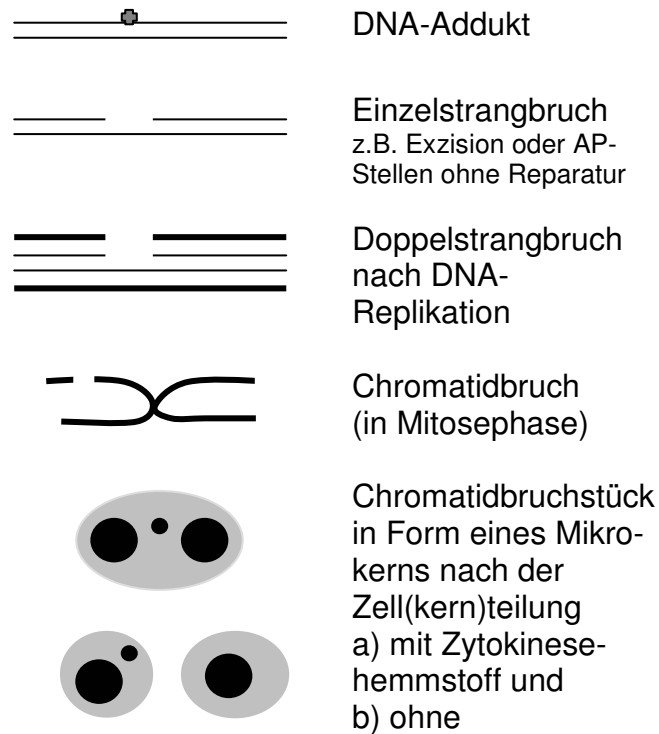
Es gibt zwei Mutagentypen (s. Abb. 11): Aneugene (Spindelgifte) und Klastogene (chromosomenbrechende Agenzien). Aneugene schädigen Kinetochor und/oder Spindel und führen damit zum Verlust oder Gewinn ganzer Chromosomen (Aneuploidie) oder Chromosomensätze (Polyploidie). Bekannte Aneugene sind Colchicin und Diethylstilbestrol. Klastogene haben DNA-strangbrechende Wirkung (s. Abb. 12) und führen zu Bruchstücken von Chromosomen oder Chromatiden.



**Abb. 11: Entstehungsmöglichkeiten für Mikrokerne, modifiziert nach Zankl, 1999.**

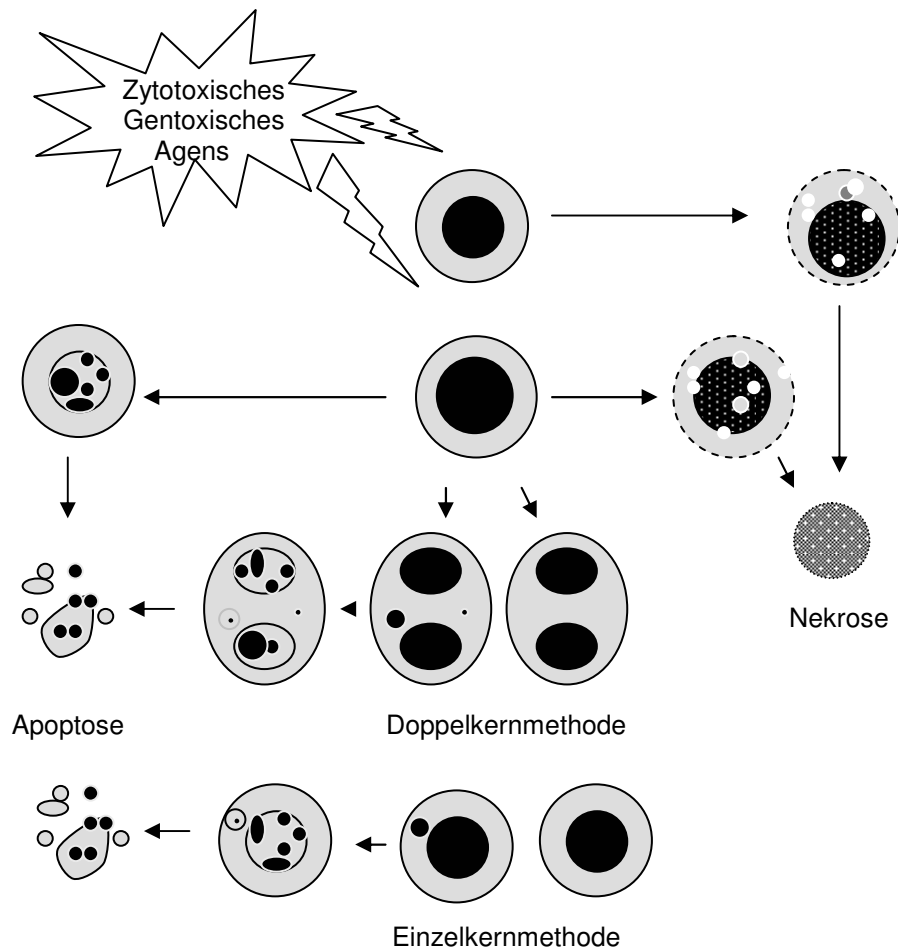
Mikrokerntests sind Gentoxizitäts- und Mutationstest, mit denen ein bereits manifestierter genetischer Schaden betrachtet wird. DNA-Schäden wie DNA-Addukte oder DNA-Strangbrüche sind hingegen nur Indikatoren für *genotoxische* Substanzen. Bereits 1973 hat John Heddle einen *in vivo* Mikrokerntest entwickelt. Die Mikrokerne können auch in der Interphase gezählt werden. *In vivo* werden Knochenmarkzellen von Mäusen untersucht, weil reife Erythrozyten ihren DNA-Kern ausstoßen. Daher kann man Mikrokerne leichter erkennen, die dann in den reifen Erythrozyten verbleiben. An den Knochenmarkzellen kann man die Zytotoxizität einer Substanz abschätzen, indem man das Verhältnis von reifen zu unreifen Erythroblasten mitbestimmt.





**Abb. 12: Schema zur Entstehung eines Mikrokerns ausgehend von einem DNA-Addukt innerhalb eines Zellzyklus, modifiziert nach Fenech, 2000.**

Für den Mikrokerntest *in vitro* sind sich teilende Zellen notwendig. Insbesondere der Mikrokerntest an humanen Lymphozyten, die *in vitro* zum Wachstum angeregt werden müssen, profitiert von einer Weiterentwicklung mit Wachstumskontrolle: der Doppelkernmethode. Hierzu werden Zellen im Mikrokernassay zusätzlich mit Cytochalasin B, einem Zytokinesehemmstoff, behandelt. Die Zellkerne teilen sich, ihr Zytoplasma jedoch nicht. Durch eine Zellteilung unter der Einwirkung von Cytochalasin B entstehen doppelkernige Zellen. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass ein Mikrokern nicht nur aus einer Teilung hervorgegangen ist, sondern auch aus einer Teilung nach der Substanzinkubation. Der Anteil einkerniger ungeteilter Zellen zu den Mehrkernigen gibt Aufschluß darüber, ob eine Testsubstanz zytotoxisch wirkt. Zytostatische Effekte könnten die Mikrokerninduktion potentiell genotoxischer Aktivität verhindern (s. auch Abb. 13; Fenech, 2000).



**Abb. 13: Schicksal von Zellen (in ihrer Zytokinese gehemmt und ungehemmt) nach Exposition eines zytotoxischen/genotoxischen Agens, modifiziert nach Fenech, 2000.**

Im Rahmen eines (Human Micronucleus) HUMN Projektes haben Fenech und Mitarbeiter (2003) Bestimmungskriterien für Mikrokerne nach der Doppelkernmethode festgelegt. Sie gehen prinzipiell auf die von Countryman und Heddle (1976) festgelegten Kriterien zur Klassifikation von Mikrokerne im klassischen Mikrokerntest zurück. Für die Vergleichbarkeit von Mikrokerntests sind einheitliche Kriterien notwendig.

Kriterien für Mikronuklei<sup>20</sup> (Doppelkernmethode)

- Größe des Mikronukleus max. 1/3 des Kerndurchmessers (Hauptkern)
- Farbintensität Mikronukleus  $\leq$  Farbintensität Kern
- Lage im gemeinsamen Zytoplasma des Doppelkernes
- keine Verbindung (DNA-Brücke) zum Kern
- in etwa der Fokussierungsebene Kerne
- glatte, runde oder ovale äußere Form

<sup>20</sup> Nukleus/i: Kern/e

Die Kriterien wurden zur Bestimmung der Mikrokerne durch AA und GA vorliegender Arbeit angewendet (vgl. Kapitel 6.1.1). Den Nuclear Division Index (NDI) von Eastmond und Tucker (1994) hat Fenech 2000 noch um das Zählen apoptotischer und nekrotischer Zellen um „cytotoxicity“ zum NDCI erweitert.

Eine Möglichkeit, klastogene von aneugenen Effekten zu unterscheiden, bietet die

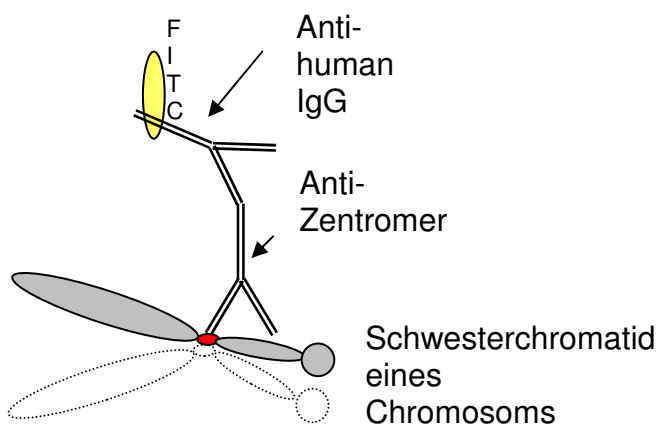


indirekte Immunfluoreszenzfärbung. Hierzu werden Antikörper gegen Zentromere verwendet. Diese werden aus CREST\*-Patienten, die an einer seltenen immunologischen Erkrankung leiden, bei der sich Antikörper gegen die Zentromere richten, gewonnen.

**Abb. 14: Raynaud-Symptomatik, Thermografiebild, Durchblutungsstörung der Hände**

Der Name leitet sich von der Vielzahl an Symptomen ab. \*Dabei steht der Buchstaben C für Calcinosis cutis<sup>21</sup>, R für Raynaud-Symptomatik<sup>22</sup> (s. Abb. 14), E für Esophagus<sup>23</sup>, S für Sklerodaktylie<sup>24</sup> und I für Iteleangiektasie<sup>25</sup>.

Mit dieser Methode (vgl. Kapitel 8.6.3) wurden zentromerhaltige Chromosomenbruchstücke detektiert (s. Abb. 15). Der Zweitantikörper ist zur Detektion markiert.



IgG: Immunglobulin G, FITC: Fluorescein-Isothiocyanat ● Zentromer

**Abb. 15: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern aus CREST-Patienten**

<sup>21</sup> Calcinosis: Verkalkung; cutis: Haut; Calcinosis cutis: Kalkablagerungen in der Haut

<sup>22</sup> Raynaud-Symptomatik = Finger und Hände werden weiß/blau und können absterben

<sup>23</sup> Esophagus = Oesophagus = durch Verhärtung des Bindegewebes hervorgerufene Bewegungsstörungen der Speiseröhre

<sup>24</sup> Skleros: hart; daktylos: Finger d.h. unelastische und unterversorgte Haut

<sup>25</sup> Tele: weit, entfernt; -angi: Gefäß, -ektasie: Erweiterung d.h. Erweiterungen von der Hauptschlagader entfernt liegender winziger Gefäße

### 2.4.3 Kanzerogenität

Die chronische Gabe von AA ins Trinkwasser erhöht die Tumorinzidenz bei Nagetieren. In Ratten kommt es vermehrt zu Tumoren der Tunica vaginalis testis (Scheidenhaut des Hodensacks), zu Fibroadenomen der Brust und Adenomen der follikularen Zellen der Schilddrüse. Zudem scheint AA das Auftreten von Hintergrundtumoren (stammspezifisch) zu beschleunigen. Nach Rice (2005) verursacht AA-Exposition über das Trinkwasser in Mäusen und Ratten Tumore an einer Vielzahl von Organen. In einem 2-Stufen-Kanzerogenese-Modell an Mäusehaut zeigte sich AA nicht als Komplettkanzerogen, sondern als Initiator (Tyl und Friedman, 2003).

AA scheint partielle dopamin-antagonistische Aktivität zu haben. Tyl und Friedman (2003) diskutieren als Mechanismus für Zellproliferation die Modulation von Hormonleveln. Shiver und Mitarbeiter (1992) behandelten Y-1-Zellen, Nebennierenzellen des Mäusetumors, mit 5mM AA und detektierten eine erhöhte Steroidproduktion und Zellabrundung. AA führte in diesen Zellen zu einer gehemmten DNA-Synthese, während die Proteinsynthese ungehemmt erschien. AA hatte keinen Einfluss auf die Polymersierung/Depolymersierung der Mikrotubuli (Shiver *et al.*, 1992).

Die tägliche Dosis AA (erhalten durch lineare Extrapolation vom Tierversuch, 104 Wochen), die zu einem 25%igen Anstieg in der Tumorinzidenz im Vergleich zur Kontrolle über Lebenszeitexposition führt, beträgt 0,65mg/kg KG/Tag (O'Brien *et al.*, 2006). Mithilfe dieser u.a. Berechnungen bilden sie für AA unterschiedliche „Margins of exposure“. Dybing und Scanner extrapolierten Dosis-Wirkungsbeziehungen aus Langzeit-Tierversuchen und kalkulieren für den Menschen bei geschätzter täglicher Aufnahme von 0,49µg/kg KG Tag AA über 70 Jahre, dass 6 von 10 000 Menschen durch AA Krebs entwickeln (Dybing und Scanner, 2003).

#### Epidemiologie

Eine 1999 durchgeführte follow up-Kohortenstudie zur Studie von 1984 bis 1994 an Arbeitern dreier Betriebe in den USA bekräftigte Hinweise für einen kausalen Zusammenhang zwischen AA-Exposition und Krebsmortalität (Marsh *et al.*, 1999). Es wurde ein um 2,26 fach signifikant erhöhtes Risiko für Pankreaskrebs (bei Arbeitern mit Exposition  $> 0,3\text{mg/m}^3$  und Jahr) festgestellt. Dieses Risiko konnte jedoch nicht als Expositions-Wirkungsbeziehung identifiziert werden (Marsh *et al.*, 1999). Die Studie wurde nochmals 2007 aktualisiert (mit drei Betrieben in den USA und einem Be-

trieb in Holland gegenüber einer Kontrollgruppe). Die Schlussfolgerung ist, dass AA-Exposition in den Konzentrationen, denen die Arbeiter dieser Studie ausgesetzt waren, nicht mit einer erhöhten Krebsmortalität verbunden war (Marsh *et al.*, 2007).

Retrospektive Analysen von Fall-Kontrollstudien verschiedener europäischer Populationen haben keinen Zusammenhang zwischen Ernährungsverhalten (AA-Aufnahme) und Krebsinzidenz gefunden. In solchen Studien ist es schwierig, erhöhte Krebsrisiken festzustellen und einer Ursache zuzuordnen, dennoch geben sie ein Indiz dafür, durch AA in der westlichen Ernährung wahrscheinlich keinem erhöhten Risiko ausgesetzt zu sein (Rice, 2005).

Ebenso konnten Mucci und Mitarbeiter bei einer prospektiven Studie keine Assoziation zwischen der täglichen AA-Aufnahme und dem Risiko für Kolon- oder Rektumkrebs unter Frauen finden (Mucci *et al.*, 2006).

#### **2.4.4 Reproduktionstoxizität**

Nach Tyl und Friedman (2003) beeinflusst AA in hohen Dosen, in denen auch neurotoxische Effekte auftreten, die Spermien-Morphologie und -Beweglichkeit männlicher Nagetiere, während GA-bedingte Mutationen keinen Effekt auf die Reproduktion zeigten (Tyl und Friedman, 2003).

AA ist mutagen in Spermatozyten und Spermatid Stadien der männlichen Keimzelllinie (Maus). In den Spermatid Stadien ist AA überwiegend oder ausschließlich klastogen. Die gleiche Dosis AA war intraperitoneal (i.p.) appliziert potenter als dermal und die gleiche Dosis GA war potenter als AA (Favor und Shelby, 2005).

Im NTP<sup>26</sup>-Experten-Brief von 2005 wird es für möglich gehalten, dass AA die menschliche Entwicklung oder Reproduktion beeinträchtigt. Es gibt keinen direkten Beweis für einen nachteiligen Effekt durch AA in der Bevölkerung, jedoch zahlreiche Studien an Labortieren, in denen orale Aufnahme hoher Dosen AA zu negativen Effekten auf Reproduktion und Entwicklung führt (CERHR NTP<sup>27</sup>, 2005).

### **2.5 Fremdstoffmetabolismus**

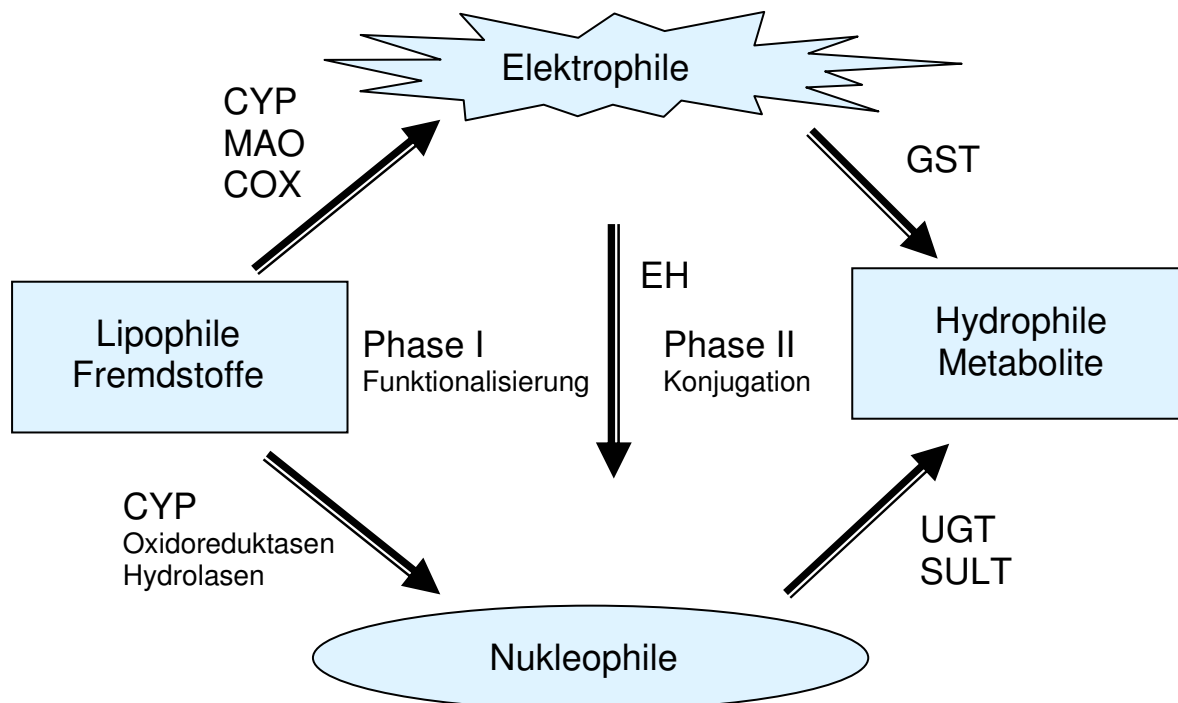
Physiologische Barrieren (z.B. die Zellmembran) und die Enzymausstattung des fremdstoffmetabolisierenden Systems eines Organs tragen maßgeblich zum Schicksal eines Fremdstoffes im Organismus bei. Kleine oder lipophile Substanzen sind

---

<sup>26</sup> NTP: National Toxicology Program

<sup>27</sup> CERHR: Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction

membrangängig. Daher ist es ein Ziel des Körpers, lipophilen Fremdstoffen hydrophile Gruppen anzuhängen und so der Ausscheidung zugänglich zu machen. Dazu bedarf es erst des Einbaus einer funktionellen Gruppe durch sogenannte Phase I-Enzyme. Obwohl es eine Entgiftung darstellen soll, kann es gelegentlich auch zu einer unerwünschten Aktivierung einer Substanz, einem elektrophilen Metabolit, kommen. Dieser wird entweder in der Phase II des Fremdstoffmetabolismus mit Glutathion konjugiert, als Epoxid über die Epoxidhydrolase detoxifiziert oder er reagiert mit einem Nukleophil vor Ort. Abb. 16 gibt einen Überblick über De-/Toxifizierung des Fremdstoffmetabolismus.



CYP: Cytochrome P450; MAO: Monoaminooxidase; COX: Cyclooxigenase;

EH: Epoxidhydrolase; GST: Glutathion-S-Transferase; UGT: UDP-Glukuronosyltransferase

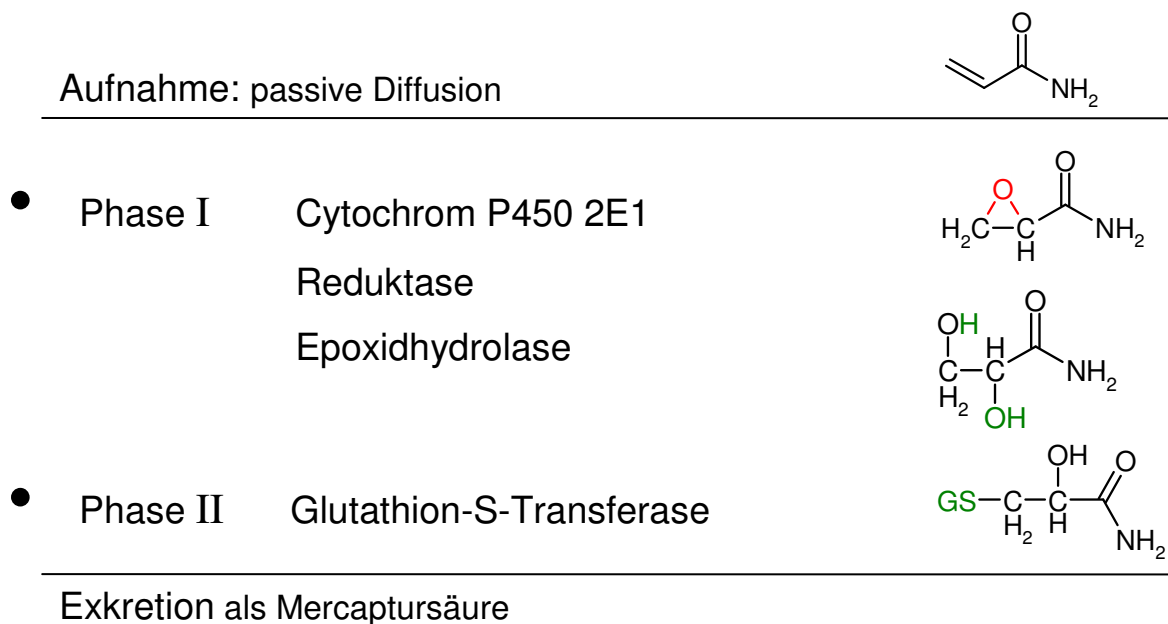
SULT: Sulfotransferase

**Abb. 16: Schematische Darstellung des Fremdstoffmetabolismus**

Der Fremdstoffmetabolismus ist ein effektives System: z.B. 70% der gefundenen Rattenmetabolite im Urin nach AA-Aufnahme und immerhin noch 40% in Mäusen resultieren aus der direkten Konjugation von AA mit Glutathion (Dearfield *et al.*, 1995).

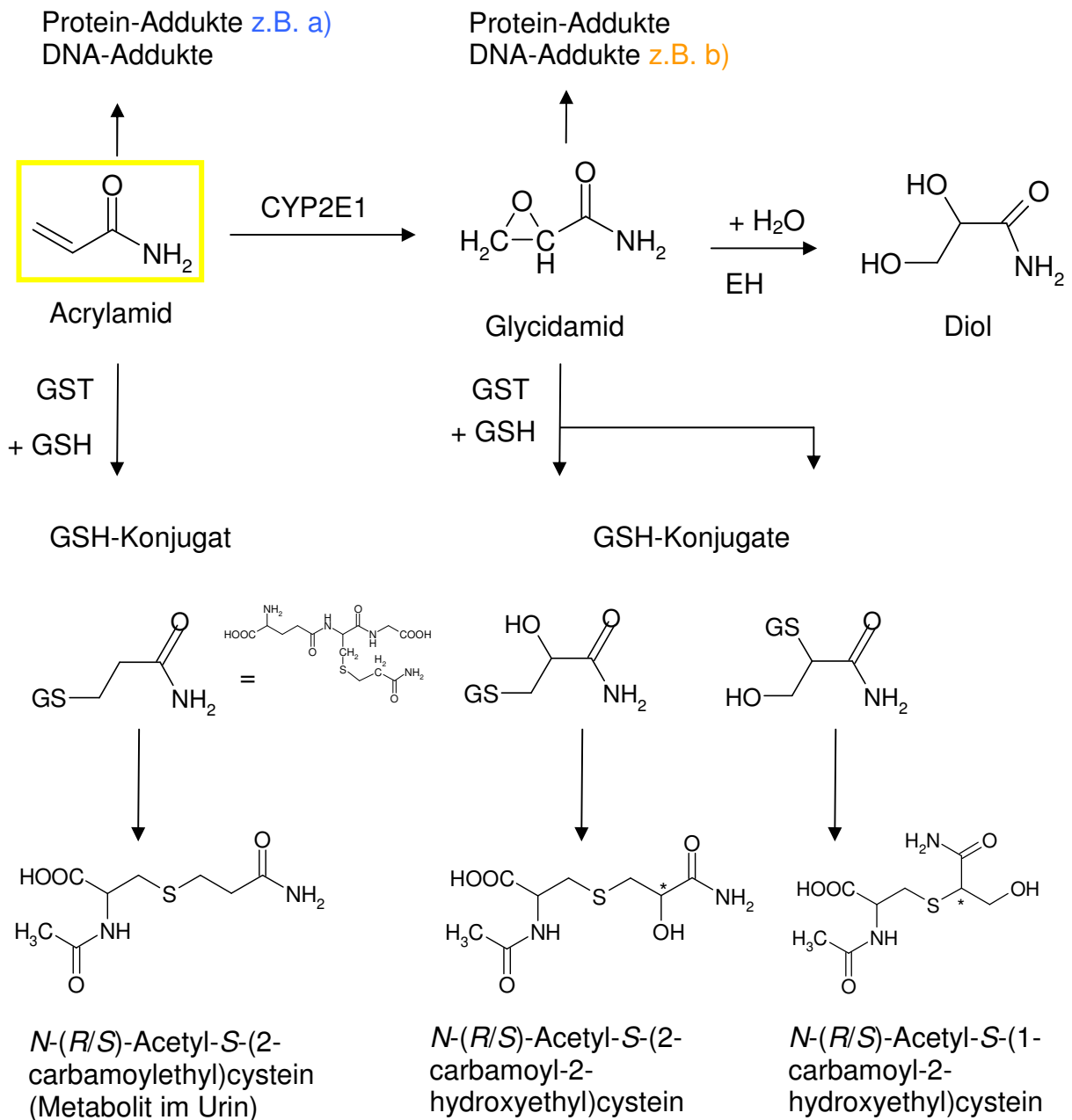
Wie in Abb. 17 und 18 dargestellt, wird AA über Cytochrom P450 2E1 (CYP 2E1) (hauptsächlich in der Leber) zu GA epoxidiert. Das Epoxid kann von der Epoxidhydrolase zum Diol hydrolysiert werden. AA und GA können über die Glutathion-S-Transferase an Glutathion konjugiert werden. Die entsprechenden Mercaptursäuren werden über die Niere ausgeschieden. AA und GA können aber auch direkt mit Proteinen (im Bild Hämoglobin) und mit DNA-Basen (im Beispiel Guanin) reagieren (s. Abb. 18).

Zudem haben Fuhr und Mitarbeiter (2006) eine toxikokinetische Untersuchung zu AA am Menschen durchgeführt. Der größte Teil einer 0,94mg Dosis wurde nach oraler Aufnahme absorbiert. Dominierender Metabolit ist AAMA; d.h. dass die Entgiftung effektiver als die Giftung zum GA ist. Die Bildung des GA-Derivates der Mercaptursäure ist bei Menschen zweimal geringer als bei Ratten und um ein Vierfaches geringer als bei Mäusen nach entsprechenden Dosen. Dieser Faktor ist bei der Extrapolation des Krebsrisikos vom Nager auf den Menschen zu berücksichtigen (Fuhr *et al.*, 2006).

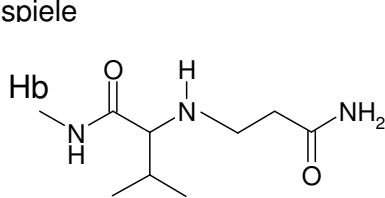


**Abb. 17: Übersichtsschema zum Metabolismus von Acrylamid (Entgiftung)**

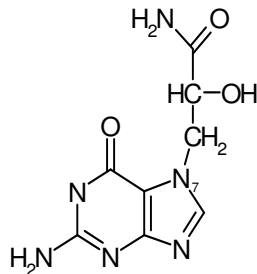
Es sind die Strukturen von Acrylamid, Glycidamid, dem Hydrolyseprodukt von Glycidamid sowie eines Glutathionkonjugats als Beispiel für fremdstoffmetabolische Aktivitäten der Phase I- und Phase II-Enzyme zwischen AA-Aufnahme und Ausscheidung als Mercaptursäure dargestellt.



Beispiele



a) Hämoglobinaddukt am endständigen Valin (Biomarker)



b) *N*-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin

Hb: Hämoglobin; CYP 2E1: Cytochrom P450 2E1-abhängige Monooxygenase

EH: Epoxidhydrolase; GST: Glutathion-S-Transferase; GSH: Glutathion, reduziert mit H am S-Atom

Abb. 18: Zusammenfassung des Fremdstoffmetabolismus von Acrylamid



## 2.5.1 Cytochrome P450

Cytochrome (griech.:  $\chi\rho\omega\mu\alpha$ ) sind farbige Hämproteine in Zellen. Den Cytochromen gemeinsam ist der Wertigkeitswechsel von an Häm gebundenem Eisen als Prinzip der Elektronenübertragung  $\text{Fe}^{3+} + e^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ . Reduziertes CYP P450 bindet Kohlenstoffmonoxid und hat ein Absorptionsmaximum bei 450nm. Daher leitet sich der Name Cytochrom P450 vom Pigment 450 ab.

Cytochrome kommen in allen Organismen vor (Römpp 1998) und sind ubiquitär zu finden. Das menschliche Genom enthält mehr als 60 CYP-Gene.

Humane CYPs katalysieren (je nach Familie s. Abb. 19) die Biosynthese von Steroidhormonen, die Metabolisierung von Fremdstoffen, die Oxidation ungesättigter Fettsäuren zu Botenstoffen und sind u.a. am Metabolismus fettlöslicher Vitamine beteiligt (Hasler *et al.*, 1999).

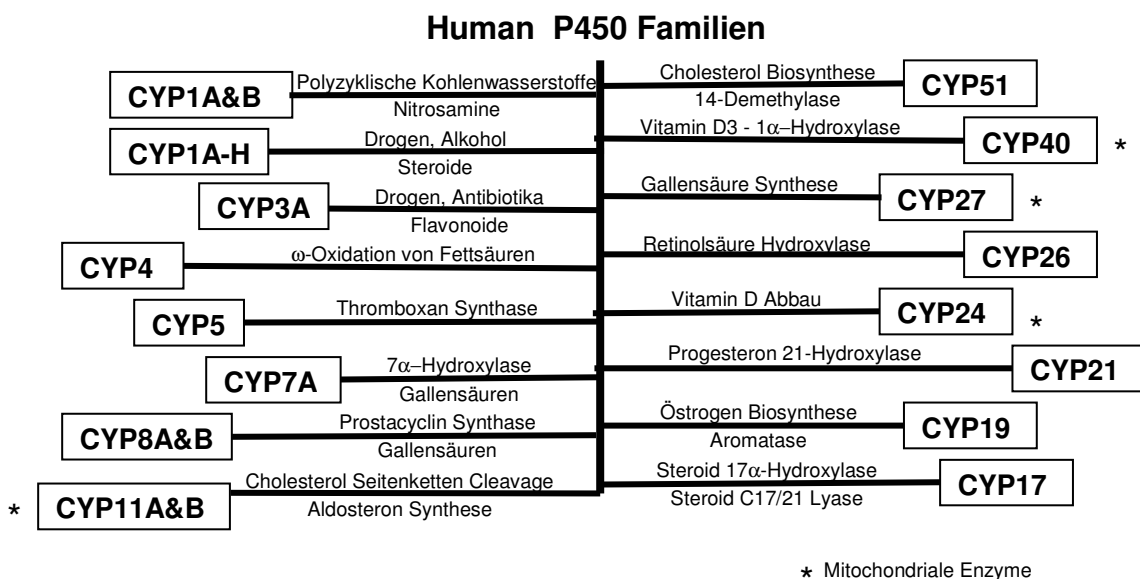


Abb. 19: Humane CYP450-Familien nach Hasler *et al.*, 1999.

Als Phase 1-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus sind die vom Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen für die Funktionalisierung von Fremdstoffen zuständig. Die Oxidoreduktasen aktivieren unter Verbrauch von NADPH molekularen Sauerstoff so, dass ein Atom in den Fremdstoff eingebaut und das andere zu Wasser reduziert wird (Eisenbrand *et al.*, 2005). Dieser nicht unkritische Schritt führt zu einem reaktiven Metabolit, der erst nach Funktionalisierung mit zellulärem Glutathion reagiert und dadurch detoxifiziert werden kann oder mit Makromolekülen (DNA, RNA, Proteine) interagieren kann (Hasler *et al.*, 1999).

Die Superfamilie der CYP wird nach Verwandtschaftsgrad bzw. Identität der Proteinsequenz mit arabischer Zahl in Familien und mit Großbuchstaben in Unterfamilien eingeteilt. CYPs katalysieren vielfältige Reaktionen (s.o.), an denen immer auch eine NADPH-Cytochrom P450-Reduktase das Enzymsystem ergänzt (Eisenbrand *et al.*, 2005).

### Cytochrom P450 2E1

Die CYP 2-Familie ist unter den Säugern die umfangreichste. Manche Enzym-Unterfamilien wie die CYP 2E1 sind ortholog d.h. vor der phylogenetischen Trennung bestimmter Spezies wie Maus, Ratte, Hase, Affe und Mensch entstanden und in allen Spezies daher mit gleicher Bezeichnung vorhanden (Lewis *et al.*, 1998). Das humane CYP 2E1-Gen liegt auf dem Chromosom 10. Etwa 7% des CYP 2E1 kommt in der Leber vor. CYP 2E1-Substrate sind kleine Moleküle, wie z.B. AA. Ethanol ist nicht nur Substrat, sondern induziert auch CYP 2E1. Eine Besonderheit des CYP 2E1 ist das Vorliegen in aktivierter "high spin"-Form auch ohne Substratbindung. In der "high spin"-Konfiguration kann Sauerstoff aktiviert werden. Der Grund für die Hepatotoxizität von Ethanol liegt darin, dass Ethanol durch Bindung an CYP 2E1 dessen Halbwertszeit verlängert. Dadurch kommt es zur Akkumulation von CYP 2E1 und reaktiven Sauerstoffspezies (s. 2.3) (Hu *et al.*, 1995; Lieber, 1997; Platt, 2006).

CYP 2E1 wird konstitutiv in der Leber exprimiert. Von den die Leber durchlaufenden Fremdstoffen wird von CYP 2E1 aber nur etwa 2% umgesetzt. CYP 2E1 wird über Chlorzoxazon-6-Hydroxylierung nachgewiesen (s. Abb. 20). In vorliegender Arbeit wird 6-Hydroxy-Chlorzoxazon im Überstand mittels Hochdruck-Flüssig-Chromatographie modifiziert nach Lucas und Mitarbeitern (1993) bestimmt.

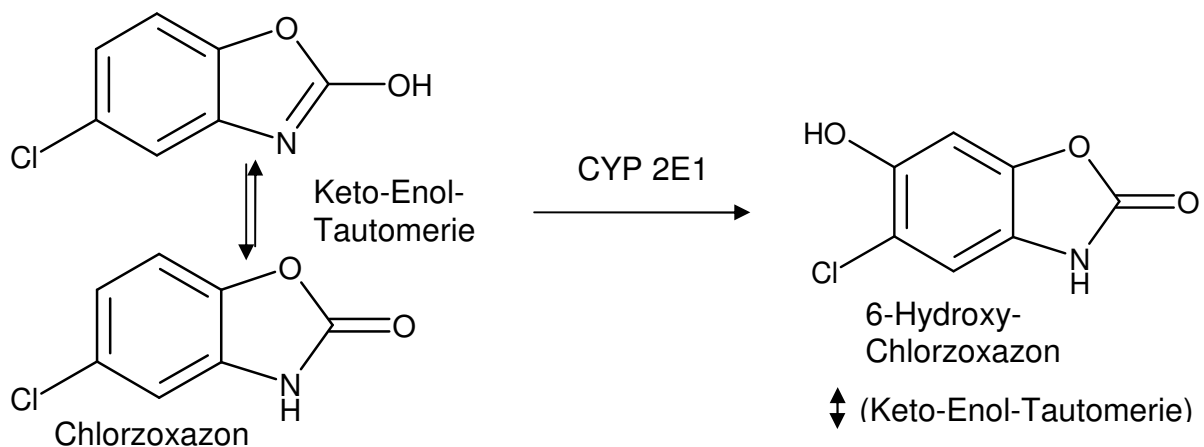
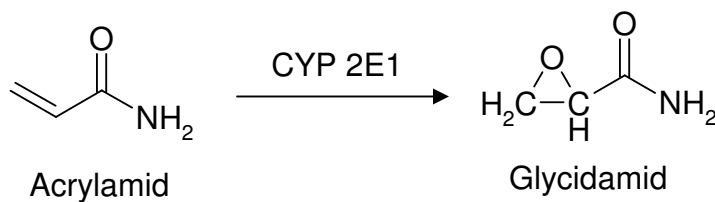


Abb. 20: Strukturen Edukt/Produkt der Umsetzung von Chlorzoxazon

Induktoren von CYP 2E1 sind u.a. Aceton, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Isoniazid. Am bedeutendsten ist Ethanol. Eine erhöhte CYP 2E1-Induktion ist bei der fettleibigen Bevölkerung nachzuweisen (Kotlyar und Carson, 1999). Auch Diabetes führt zur vermehrten Expression von CYP 2E1 auf mRNA- und Proteinebene (de Waziers *et al.*, 1995). Die CYP 2E1-Expression/-Aktivität kann Einfluß auf die Wirkstärke von z.B. AA bzw. seinen Umsatz zu GA haben. Denn CYP 2E1 aktiviert AA (s. Abb. 21), aber auch ähnlich kleine und teilweise kanzerogene Moleküle wie Acrylonitril, Vinylbromid, Chloroform, *N*-Nitrosodiethylamin oder Acetaminophen.



**Abb. 21: Aktivierung von Acrylamid durch die Cytochrom P450 abhängige Monoxigenase 2E1**

Acetaminophen ist auch als Paracetamol bekannt. CYP 2E1 aktiviert Acetaminophen zu einem Chinonimin, welches den GSH-Pool verbraucht und dadurch zu oxidativem Stress führen kann. Inhibitoren von CYP 2E1 sind Diethyldithiocarbamate und Disulfiram (<http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>). Auch Flavonoide, die in der Diskussion stehen, krebspräventive pflanzliche Nahrungsbestandteile zu sein, inhibieren CYP 2E1 (Moon *et al.*, 2006).

Einige Polymorphismen des CYP 2E1-Gens stehen in Verdacht, mit Krebs assoziiert zu sein. Eine Punktmutation (c2-Allel) führt zu einer erhöhten Transkription und CYP 2E1-Expression *in vitro* im Vergleich zum Wild-Typ (c1-Allel) (Tsutsumi *et al.*, 1994). Verschiedene Studien geben Hinweise darauf, dass Patienten mit c2-Allel ein erhöhtes Risiko für alkoholassoziierte Leberschäden und Lungenkrebs haben (Hasler *et al.*, 1999). Nach Chelule und Mitarbeitern (2006) kann ein Polymorphismus in der Promotorregion (c3-Allel), welches gehäuft bei dunkelhäutigen Südafrikanern vorkommt (im Vergleich dazu selten bei Chinesen), als genetischer Marker für Krebs des in dieser Population häufig vorkommenden Plattenepithel-Zellkarzinoms des Oesophagus gelten.

## 2.5.2 Biomarker

Zur Aufklärung der internen Exposition mit AA und seines Schicksals im Körper werden sogenannte Biomarker wie z.B. Hämoglobin(Hb)-Addukte herangezogen (Calleman, 1993). Aufgrund der Entwicklung einer sensitiven *N*-Alkyl-Edman-Analysemethode entwickelte sich die Messung von Addukten am N-Terminus des Valins von Globinketten als ein bedeutendes Instrument für die Dosimetrie genotoxischer chemischer Kanzerogene (Vesper *et al.*, 2006). AA reagiert via Michael-Addition mit der NH<sub>2</sub>-Gruppe und führt zum *N*-(2-carbamoylethyl)valin (s. Abb. 22; Tareke *et al.*, 2000). Die *N*-Alkyl-Edman-Methode beruht auf einer Derivatisierung und spezifischen Freisetzung eines Valinadduktes mit Pentafluorphenylisothiocyanat, welches beispielsweise mittels GC/MS-MS analysiert werden kann (s. in Abb. 22; Paulsson *et al.*, 2003). Auch die Exposition gegenüber *N*-Methyloacrylamid kann über dasselbe Hb-Addukt gemessen werden (Hagmar *et al.*, 2001). Der Durchschnittslevel der Hb-Addukte von Nichtrauchern (Kontrollgruppe) betrug etwa 40pmol/g Globin, deren interindividuelle Varianz um 20-60pmol/g Globin). Der Hintergrundlevel von Wildtieren und grasenden Kühen ist geringer als der in Menschen (Tareke *et al.*, 2000).

Bergmark und Mitarbeiter (1993) haben die Hämoglobinaddukte sowohl mit AA als auch die mit dem Metaboliten GA in chinesischen Arbeitern, welche mit AA exponiert waren, bestimmt. Dabei fanden sie ein Verhältnis von 3:10 (GA:AA) im Blut. Dies ist ein Indiz für die Umwandlungsrate von AA nach GA im Menschen.

Als Biomarker für AA werden neben den Hb-Addukten auch Mercaptursäuren und DNA-Addukte bestimmt (vgl. Kapitel 2.4.2.1.1.). Die Messungen der Mercaptursäuren (acids) von AA und GA *N*-acetyl-*S*-(2-carbamoylethyl)-L-cystein (AAMA) und *N*-(*R,S*)-acetyl-*S*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-L-cystein (GAMA) erfolgen aus dem Urin (Boettcher *et al.*, 2005; Kellert *et al.*, 2006).

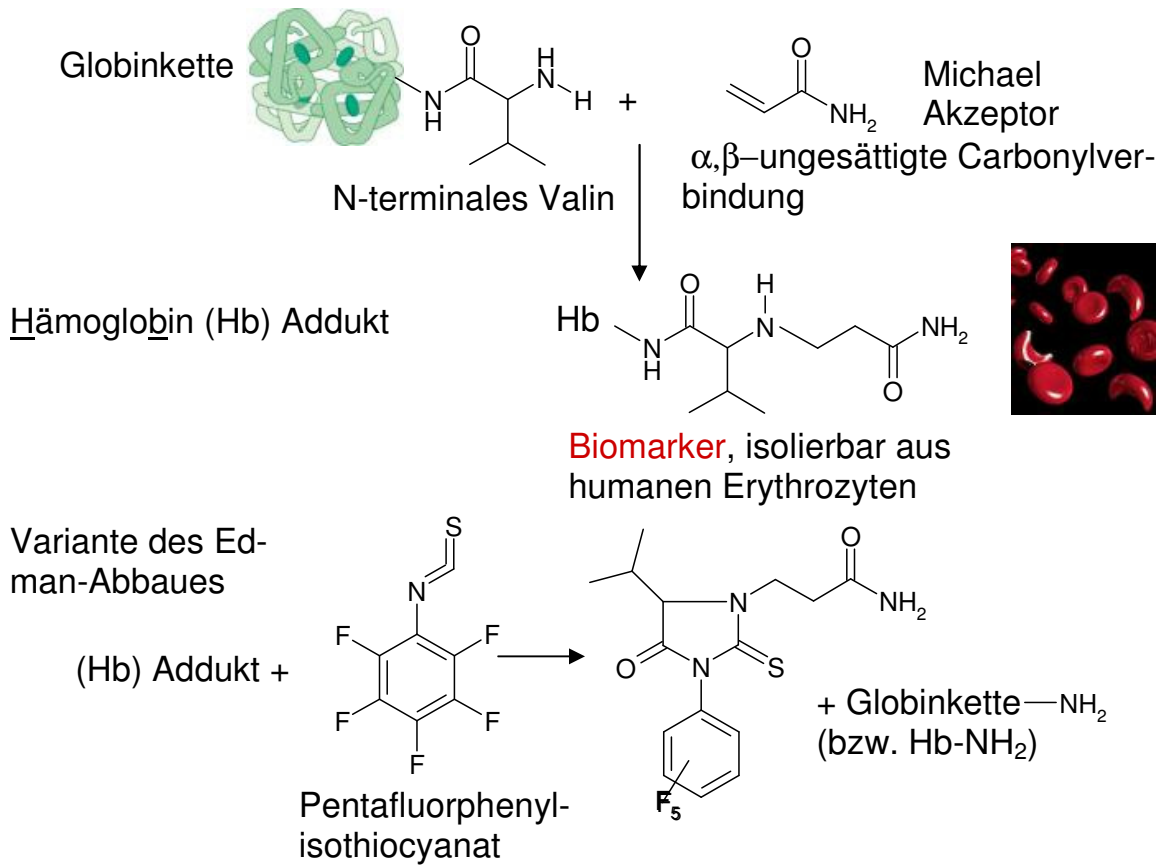
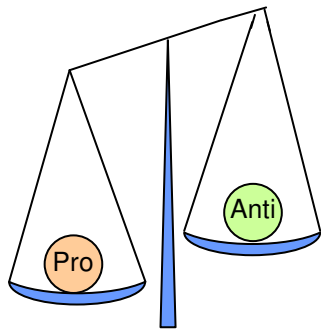


Abb. 22: N-Alkyl-Edman-Abbau

## 2.6 Oxidativer Stress

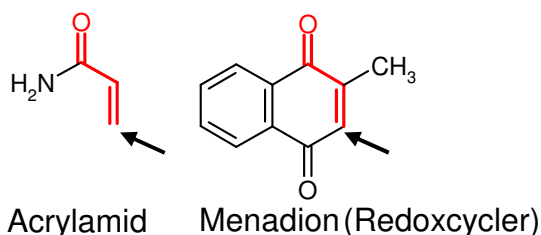
Alle aeroben Organismen sind oxidativem Stress ausgesetzt. Man versteht darunter



**Abb. 23: Redoxgleichgewicht**

die Auslenkung des Oxidans/Antioxidans-Gleichgewichts zu Gunsten der Oxidantien. Neben exogenen Stressoren gibt es auch endogene. Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) entstehen als Nebenprodukte der Atmungskette in den Mitochondrien. Sie verursachen einen großen Teil endogener DNA-Schäden. Der menschliche Körper bzw. die Makrophagen produzieren aber auch gezielt ROS bei Entzündungen zur Abwehr von Virus- und bakteriellen Infek-

tionen. Oxidativer Stress kann zu Lipidperoxidation, Proteinoxidation und DNA-Schädigung führen. ROS-Bildner wirken als Tumorpromotoren in Kanzerogenesmodellen (z.B. Benzoylhydroperoxid in der Haut und Peroxisomenproliferatoren in der Leber). Zellulär letzte Antwort auf sehr hohen oxidativen Stress ist Apoptose oder Nekrose. Die Zelle hat jedoch auch Möglichkeiten, vorher auf Stress zu reagieren. Antioxidantien wie Vitamin C und E können Radikale abfangen. Zelleigenes Glutathion stellt einen besonders reichhaltigen Pool dar. Intrazelluläre Konzentrationen liegen im Bereich von 1-20mM. Glutathion kann in einem Thiol-Zyklus oxidiert und reduziert werden, aber auch reaktive Substanzen durch Glutathion-Konjugation abfangen. Ist die DNA oxidiert, können Basenexzisionsreparaturenzyme (BER) sehr viele Substrate (Oxidationsprodukte) erkennen und aus der DNA ausschneiden. Das bakterielle BER, die Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) erkennt 8-oxo-Guanin, eine häufig oxidierte Purinbase mit promutagenen Eigenschaften (Morland *et al.*, 2002). Der Mensch exprimiert humane Homologe zu FPG wie hFPG1 und hFPG2 (Morland *et al.*, 2002) bzw. entsprechend der in der Maus genannten 8-Oxo-guanin DNA Glykosylase 1 (OGG1) analog hOGG1 (Smart *et al.*, 2006). Wäh-



**Abb. 24: Vergleich der Strukturen von Acrylamid und Menadion**

rend hFPG1 fast ubiquitär vorkommt, ist hFPG2 nur in Testes und Thymus in detektierbaren Leveln exprimiert (Morland *et al.*, 2002). Diese sind Organe, in denen AA bei Tieren Krebs hervorrufen kann.

## 2.6.1 Glutathion

Glutathion ( $\gamma$ -Glutamylcysteinylglycin mit Sulfhydrylgruppe, GSH) ist ein atypisches Tripeptid. Es kommt in jeder Zelle des Körpers vor – mit den höchsten Konzentrationen in Leber, Erythrozyten und weißen Blutzellen. In der Leber wird zunächst L-Glutaminsäure und L-Cystein mittels  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase verknüpft (s.

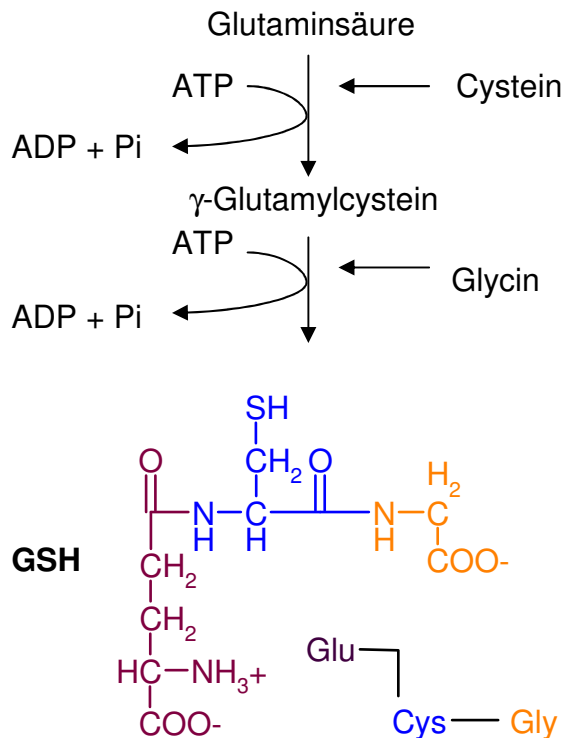


Abb. 25: Biosynthese von Glutathion (GSH)

überführt. Das natürliche Verhältnis beträgt mindestens 9:1 (GSH:GSSG). Glutathion ist auch für den Fremdstoffmetabolismus in der Zelle bedeutend (s. auch Kapitel 2.5): Die Konjugation von Fremdstoffen mit GSH ist eine der wichtigsten Detoxifizierungsreaktionen des Organismus. Die Glutathion-S-Transferase (GST) ist ein Phase-2-Enzym und katalysiert elektrophile Substitutionsreaktionen (überträgt z.B. die Methylgruppe von Methylbromid auf GSH) und Additionsreaktionen an aktivierte Doppelbindungen. AA ist eine solche  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindung, die mittels GST an GSH konjugiert wird (s. Abb. 27).

Abb. 25) und die Vorstufe anschließend mit Glycin durch die Glutathion-Synthetase kondensiert. GSH schützt die Tertiärstruktur von Proteinen, fördert den Transport von Aminosäuren durch die Zellmembranen und spielt eine entscheidende Rolle im antioxidativen Netzwerk. Die freie Sulfhydrylgruppe dient als Elektronendonator. Zwei GSH gehen dabei in die oxidierte Form des Disulfids (GSSG) über. Peroxide werden mittels Glutathion-Peroxidase reduziert und oxidiertes Hämoglobin mittels Methämoglobin-Reduktase und GSH. Mithilfe der Glutathion-Reduktase und NADPH wird GSSG wieder in die reduzierte Form

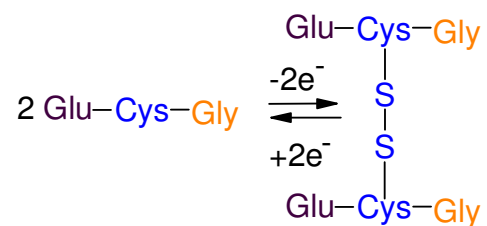


Abb. 26: Oxidierte und reduzierte Form von Glutathion

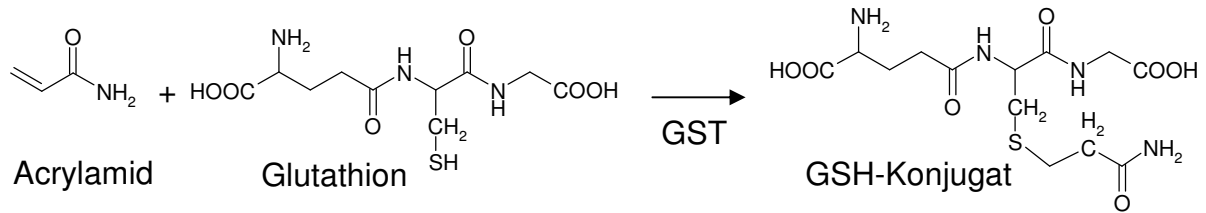
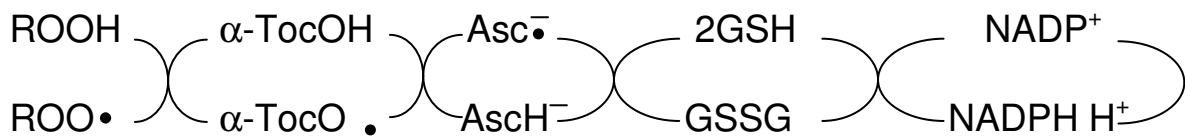


Abb. 27: Bildung eines Glutathion (GSH)-Konjugates mit Acrylamid; GST: Glutathion-S-Transferase

Das GSH-Konjugat von Fremdstoffen ist in der Regel wasserlöslich und führt über den Mercaptursäure-Weg zur Elimination. Ein verschobenes GSH/GSSG-Verhältnis führt zu einem ungünstigen Redoxstatus (oxidativem Stress), und damit u.a. zu vermehrten oxidierten promutagenen DNA-Basen.

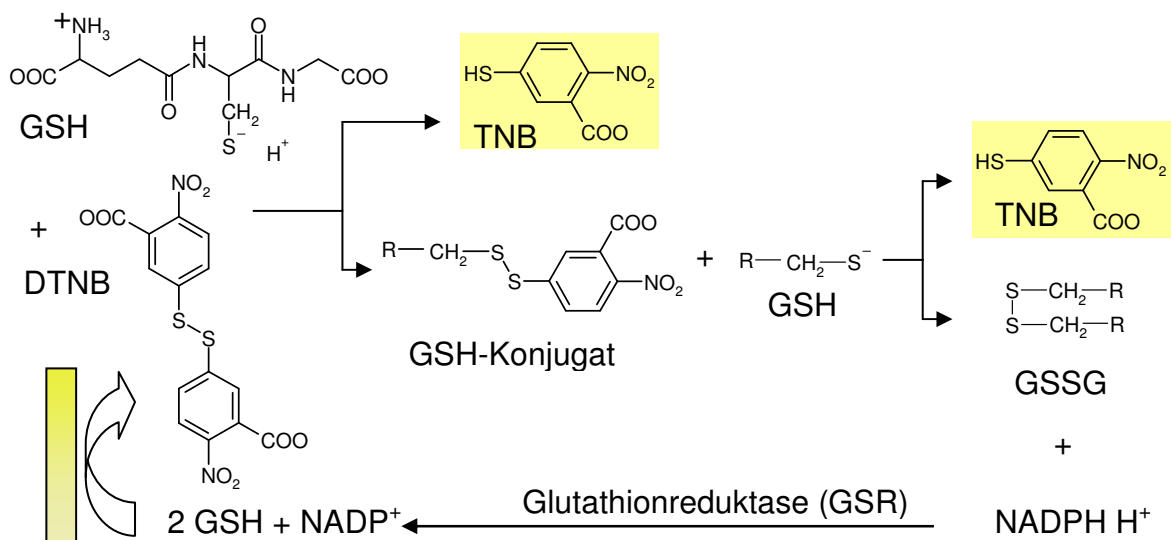


$\alpha$ -Toc:  $\alpha$ -Tocopherol, Asc: Ascorbinsäure, GSH: Glutathion

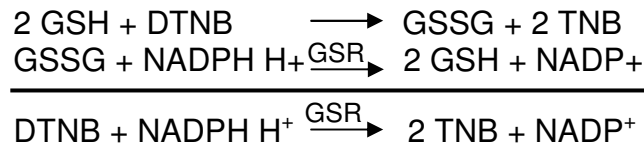
Abb. 28: Antioxidatives Netzwerk nach Packer und Obermüller-Jevic, 2003.

Glutathion wurde in vorliegender Arbeit nach einer Methode von Gallagher und Mitarbeitern (1994) bestimmt. In Gegenwart von Glutathion wird das Ellman's Reagenz, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure), zu 5-Thio-2-nitrobenzoat (gelb) reduziert (s. Abb. 29). Die vorherige Derivatisierung von reduziertem Glutathion ermöglicht die Messung vom oxidierten Glutathion (s. Abb. 30).

Prinzip der photometrischen Messung bei 405nm:





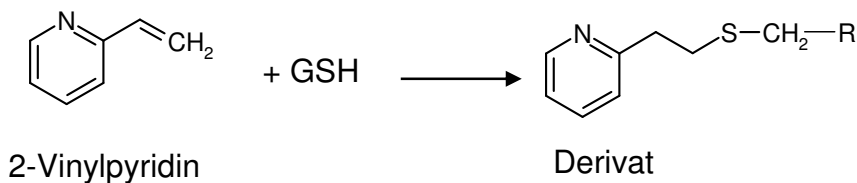
**Gesamtreaktion**

GS-SG: oxidiertes Glutathion mit Disulfidbrücke

TNB: 5-Thio-2-nitrobenzoat

DTNB: 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)

**Abb. 29: Glutathion-Mess-Prinzip**



**Abb. 30: Derivatisierung von Glutathion (GSH)**

GSH-Depletion kann zu verminderter Detoxifizierungsmöglichkeit elektrophiler Substanzen mangels GSH führen. Elektrophile können dann mit Proteinen und der DNA reagieren. Ein bekanntes lebertoxisches Agens in hohen Dosen ist Acetaminophen. Es wird über CYP 450-Enzyme aktiviert (aktivierte Doppelbindung) und führt aufgrund von Acetaminophen-GSH-Addukten zu hepatischer GSH-Depletion. Erst in hoher Dosis nach Erschöpfung des GSH-Pools kommt es zu reaktiven Metaboliten bzw. Lebertoxizität (Roche). Aber auch ein Mangel an GST kann zu demselben Nachteil führen. Beim Menschen gibt es einen Polymorphismus der GST-Isoenzyme GST M1, GST T1 und GST P1. Der Polymorphismus von GST M1 ist beispielsweise mit einem erhöhten Krebsrisiko bei Rauchern assoziiert. Die Bedeutung der GST-Kompetenz zeigt sich auch bei Speziesunterschieden (Maus/Ratte) und damit erhöhter Empfindlichkeit gegenüber Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)-bedingtem Leberkrebs: Die TD<sub>50</sub> (Dosis, bei der 50% der Tiere im Langzeitversuch Tumore bekommen) von AFB<sub>1</sub> und Toleranz bei Mäusen ist mit >2mg/kg KG/Tag deutlich höher als die TD<sub>50</sub> zwischen 1 und 6 µg/kg KG/Tag bei Fischer- und Wistar-Ratten. Nach Hengstler und Mitarbeitern (1999) wurden bei der Maus gegenüber der Ratte und dem Menschen erheblich mehr Aflatoxin B<sub>1</sub>-GSH-Konjugate gefunden. Umgekehrt wurden DNA-Addukte mit AFB<sub>1</sub> nur in Ratte und Mensch detektiert, dagegen kamen bei Versuchen an primä-

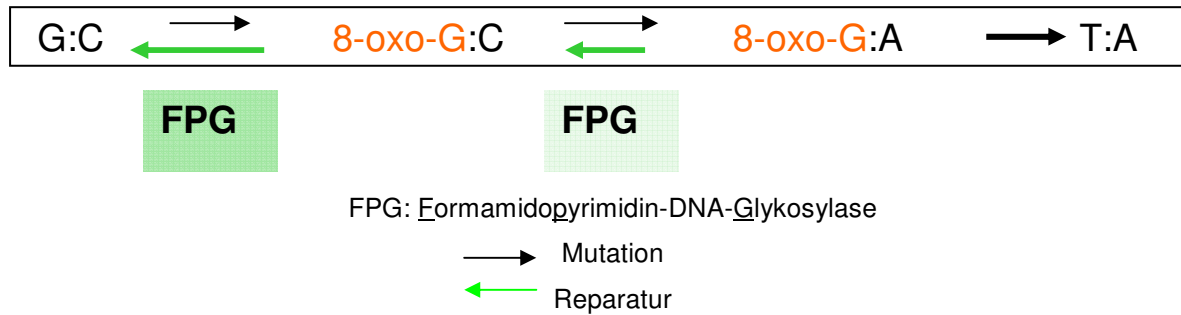
ren Hepatozyten keine DNA-Addukte in der Maus vor. Während Mäuse nahezu AFB1-resistent sind, fehlt Truthühnern GST, wodurch es 1960 zu einem Truthahnsterben "turkey-x-disease" in England kam. Ursache war importiertes Erdnussschrot aus Brasilien, welches mit Aflatoxin belastet war. GSH kann in Zellen auch durch L-Buthioninsulfloximin (BSO) depletiert werden: BSO greift in die Biosynthese von GSH als Inhibitor der  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase ein (s.o.). BSO ist ein allgemeines Werkzeug, um das oxidative Gleichgewicht in Zellen zu stören. In vorliegender Arbeit wurden Zellen mit BSO behandelt, um den Einfluss von GSH auf die Wirkung von AA zu untersuchen.

## 2.6.2 Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase

Die Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase FPG ist ein Basenexzisionsreparatur (BER)-Enzym. Seine biologische Funktion ist u.a. die Reparatur von promutagenen oxidativen DNA-Schäden. Bei FPG handelt es sich um ein gut untersuchtes prokaryontisches Metalloprotein mit 30,2 kDa. Aufgrund seiner wichtigen biologischen Funktion für aerobe Organismen gibt es z.B. im Menschen auch eine humane Form (hFPG1 und hFPG2 wie in Kapitel 2.6 erwähnt). Zur Reparatur bindet FPG an die doppelsträngige DNA. FPG besitzt drei katalytische Aktivitäten: eine DNA-Glykosidase, eine AP-Lyase und eine Desoxyribophosphodiesterase-Aktivität (Buchko *et al.*, 2002).

AA induziert dosisabhängig oxidativen Stress in Ratten und reduziert u.a. die Sulfhydrylgruppen in verschiedenen Geweben (Yousef und El-Demerdash, 2006). FPG wurde in dieser Arbeit nach Zellinkubation mit AA oder GA im sogenannten Comet-Assay nach der Zellyse verwendet (vgl. Kapitel 8.7.2). Daher wird im Folgenden darauf eingegangen, was FPG allgemein und speziell nach AA-Exposition bewirkt.

Eine sehr stressanfällige, da leicht oxidierbare Base ist das Guanin. Es wird vorzugsweise am C8-Atom oxidiert. Guanin existiert vorrangig in Anti-Konformation in der DNA und paart nahezu ausschließlich mit Cytosin (Efrati *et al.*, 1999). Solange das 8-oxo-dG sich in der DNA natürlicherweise vorkommenden Anti-Konformation befindet und über 3 Wasserstoffbrücken an Cytosin bindet, stellt die am C8-Atom oxidierte Base für die Zelle noch kein Problem dar. Wie in Abb. 31 dargestellt, kann 8-oxo-dG:C von FPG erkannt und herausgeschnitten (repariert) werden.

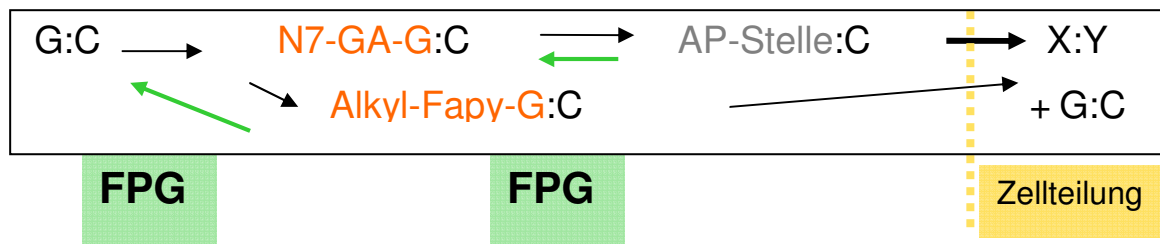


**Abb. 31: Mutation und Basenexzisionsreparatur (nach oxidativem DNA-Schaden)**

Dreht sich die Base jedoch am Zucker, führt dies zu einer Konformationsänderung. In Syn-Konformation entsteht eine größere Lücke, in der Platz für eine zweite Purinbase gegenüber 8-oxo-dG entsteht. In Abb. 34 sind die Basenpaarbindungen natürlicher Basenpaare und die Syn- und Anti-Konformationen und resultierenden Basenpaarbindungen des 8-oxo-dG abgebildet. Nur bei 8-oxo-dG kommt es zur Rotation um die glykosidische Bindung und statt der Watson-Crick-Basenpaarung resultiert eine ebenfalls stabile Hoogsteen Syn: Anti = 8-oxodG:dA-Basenfehlpaarung (Cheng *et al.*, 2005). Abb. 34 zeigt die Parallelen von Syn-8-oxo-dG:A zu T:A auf. Es bilden sich zwei Wasserstoffbrücken aus. FPG hat nur noch schwache, vernachlässigbare Aktivitäten gegenüber 8-oxo-dG:A (Morland *et al.*, 2002). Dieser Schaden wird selten erkannt und repariert, was nach DNA-Teilung zu einer manifestierten DNA-Punktmutation (G→T-Transversion), d.h. zu einem falsch eingebauten DNA-Basenpaar führt (s. Abb. 31).

FPG muss sehr spezifisch 8-oxo-dG in Verbindung mit Cytosin erkennen. Jedoch gibt es noch andere wichtige Purinläsionen wie Formamidopyrimidine (Fapy). Das sind Imidazol-ringoffene Purine. Sie entstehen oft neben *N7*-alkylierten Purin (Coste *et al.*, 2004).

GA, ein Metabolit des AA, bildet vorrangig mit Guanin das *N7*-Gua-Addukt (vgl. Kapitel 2.4.2.2.1). Dieses Addukt führt nach Ringöffnung zum 5-*N*-Alkyl-2,6-diamino-4-hydroxy-Fapy. FPG ist in der Lage, dieses Alkyl-Fapy-dG zu erkennen. Andererseits kommt es beim *N7*-Gua-Addukt mit GA aber unter physiologischen Bedingungen zur Depurinierung. Auch apurine Stellen (AP-Stellen) sind Substrate des FPGs (Cunniffe *et al.*, 2007). Das bedeutet, dass auch promutagene DNA-Schäden durch AA bzw. GA noch von FPG erkannt und repariert werden können (s. Abb. 32).



FPG: Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase

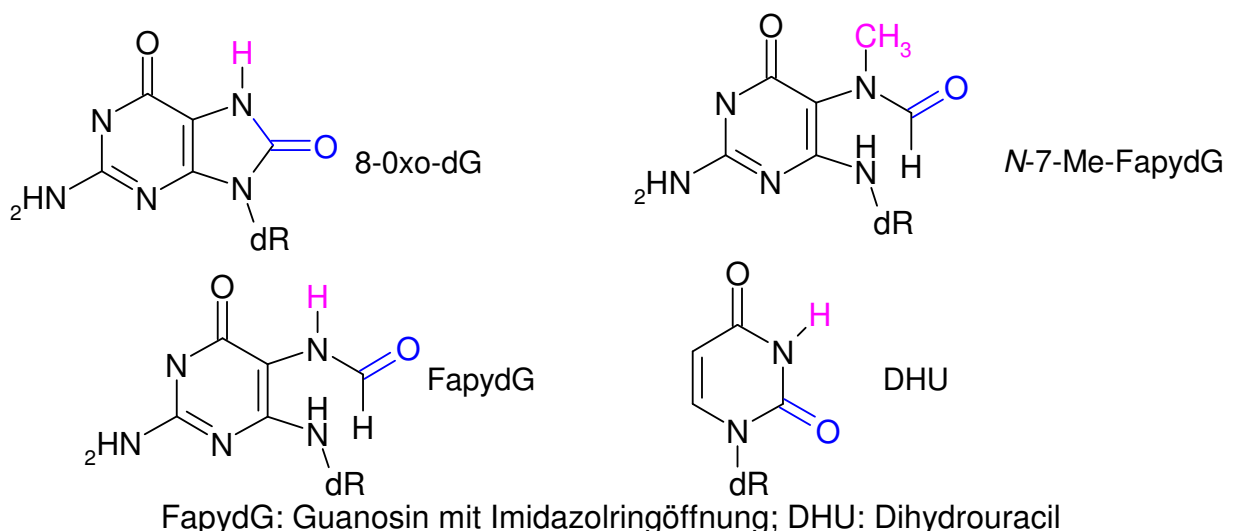
AP-Stelle: Apurinische Stelle

→ Mutation

← Reparatur

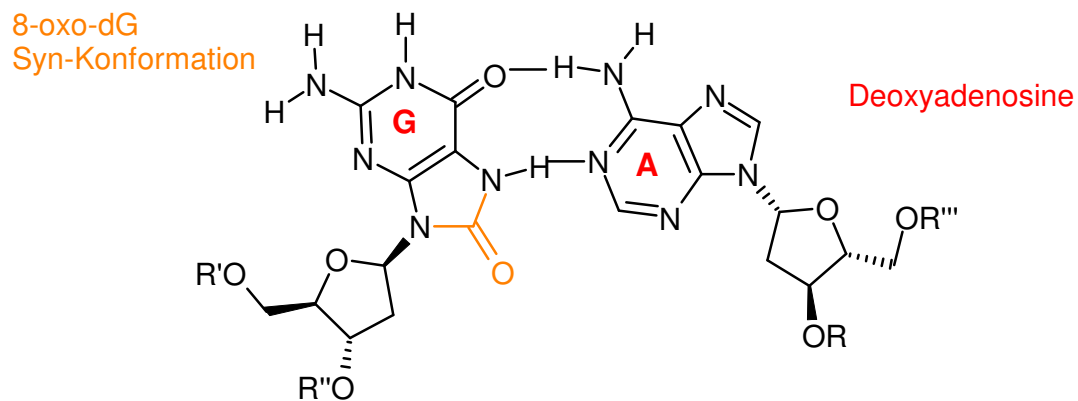
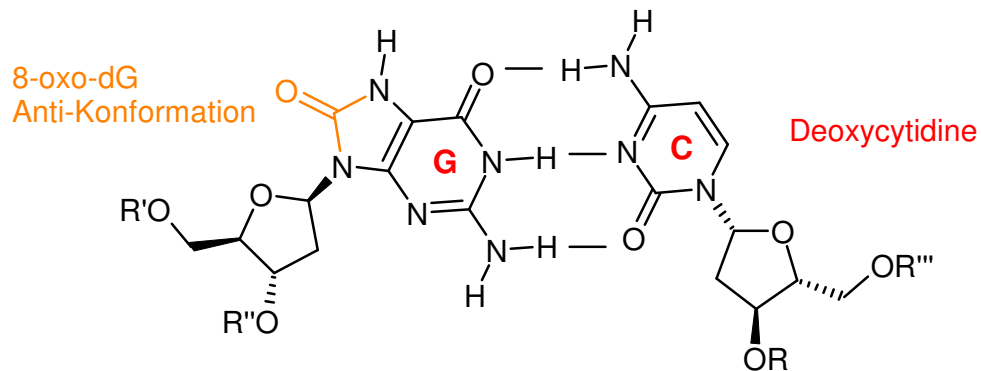
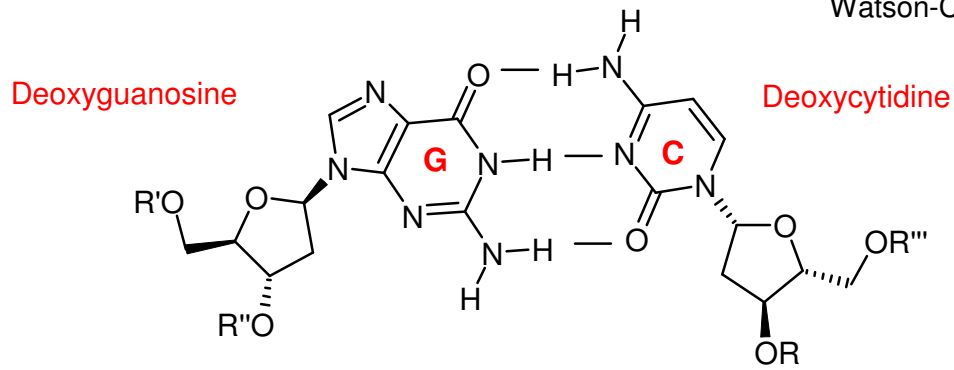
**Abb. 32: Mutation und Basenexzisionsreparatur (nach Glycidamid-Einwirkung)**

An doppelsträngige DNA gebundenes FPG hat eine hohe Bindungsaffinität zur funktionellen Ketogruppe am C8-Atom des Guanin, welche in 8-oxo-dG:dC in der großen Furche liegt (s. Abb. 33). Diese Bindung ist sehr viel stärker als in 8-oxo-dG:dA, wo sich die Ketogruppe in der kleinen Furche befindet (Tchou *et al.*, 1994). FPG selbst geht etwa vier bis fünf Konformationsänderungen während der Interaktion mit abasischen und 8-oxo-dG-beinhaltenen Substraten innerhalb von 2ms bis 10sec ein (Koval *et al.*, 2004). Dadurch ist FPG in der Lage, seine vielfältigen Aufgaben, von der DNA-Bindung über die Erkennung der Läsion bis hin zur Katalyse der Reparatur-schritte zu durchlaufen.



**Abb. 33: Einige Substrate der Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase**

## Watson-Crick-Basenpaarung



## Watson-Crick-Basenpaarung

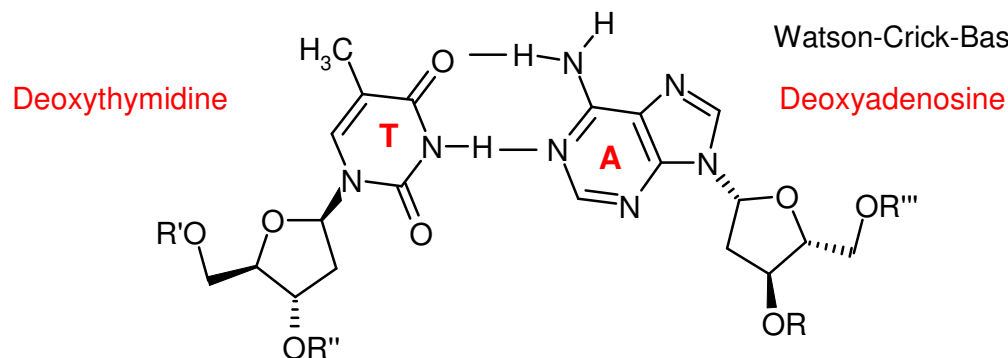


Abb. 34: Syn- und Antikonformation<sup>28</sup>; Strukturen mit Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dG:dC, 8-oxo-dG:dC, 8-oxo-dG:dA & dT:dA.

<sup>28</sup> energetisch besonders günstig ist die N...H...N -Bindung

## 2.7 Apoptose

Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod. Apoptose ist eine Fähigkeit vielzelliger Tiere und wahrscheinlich auch von Pilzen (Kroemer *et al.*, 1997). Dieser physiologische Prozess ist eine gezielte und ATP-verbrauchende Beseitigung unerwünschter oder geschädigter Zellen (Falbe und Regitz, 1998).

Die Apoptose ist u.a. während der Embryogenese notwendig. So müssen z.B. bei der Bildung tubulärer Strukturen die Zellen im Inneren sterben, um einen Hohlraum entstehen zu lassen. Bekanntes Beispiel sind auch die Fischhäute zwischen den Fingern, die während der Embryonal-Entwicklung entstehen und wieder in Apoptose gehen.

Auch beim adulten Menschen gibt es apoptotische Zellen. Die differenzierten ständig aus Stammzellteilungen hervorgehenden Zellen in den Darmvilli sterben an der Spitze ab. Virusinfizierte (nicht lytische) Zellen werden häufig auf diesem Wege beseitigt und Brustepithel geht nach Lactation in Apoptose usw. .

Nervenzellen bedürfen sogenannter Überlebensfaktoren, um nicht in Apoptose zu gehen: diese Art der Regulation ermöglicht, dass inaktive bzw. ungenutzte Nervenzellen absterben. Gleiches Schicksal erfahren physiologischerweise Zellen, die sich aus dem Zell-Zell-Verband oder Zell-Matrix-Kontakt gelöst haben.

### 2.7.1 Apoptose-Signalweg

Andererseits gibt es auch Todesfaktoren und entsprechende Rezeptoren, um in Zellen Caspase-Kaskaden auszulösen, die zum Zelltod führen. Zu den Todesfaktoren gehören beispielsweise Fas (Liganden), Strahlung und ROS. Geschädigte Mitochondrien, welche für den Energiehaushalt der Zelle bedeutend sind und bei Fehlfunktion vermehrt ROS-Abfall bilden können, können den Zelltod auslösen.

Die Permeabilisierung der äußeren Membran der Mitochondrien wird durch Bcl-2-Proteine reguliert, welche die Kontrolle über die Freisetzung von pro-apoptischen Molekülen aus dem Intermembranraum haben (z.B. Cytochrom c und Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI). Die Membrandurchlässigkeit der inneren Membran wird Ca-abhängig und von oxidativem Stress beeinflusst über MPT (mitochondrial permeability transition) reguliert und kann nach Armstrong (2006) zu Nekrose führen. Denkbar wäre auch

eine Verbindung zwischen Bcl-2-Proteinen und MPT, Permeabilisierung beider Membrane und einer resultierenden Mischform von Apoptose und Nekrose (J. Armstrong, 2006).

Zu den deutlich sichtbaren Vorteilen und Unterschieden zur Nekrose gehört bei der Apoptose die Vermeidung von Entzündungsreaktionen. Die Zelle schrumpft, das Chromatin kondensiert und die anschließende Zellfragmentation führt zu apoptotischen Körperchen, die von Makrophagen *in vivo* phagozytiert werden; *in vitro* kommt es allerdings zu einer sekundären Nekrose (die Aufnahme von Farbstoffen durch die geschädigte Membran als Beweis für Nekrose kann *in vitro* zu falschen Schlüssen führen). Apoptotische Körperchen sind von einer Membran umschlossene Fragmente; die Organellen bleiben intakt. Weitere morphologische Veränderungen sind das Abrunden der Zellen und „blebbing“ (=Ausstülpungen an der Oberfläche) (Gill und Dive, 2000).

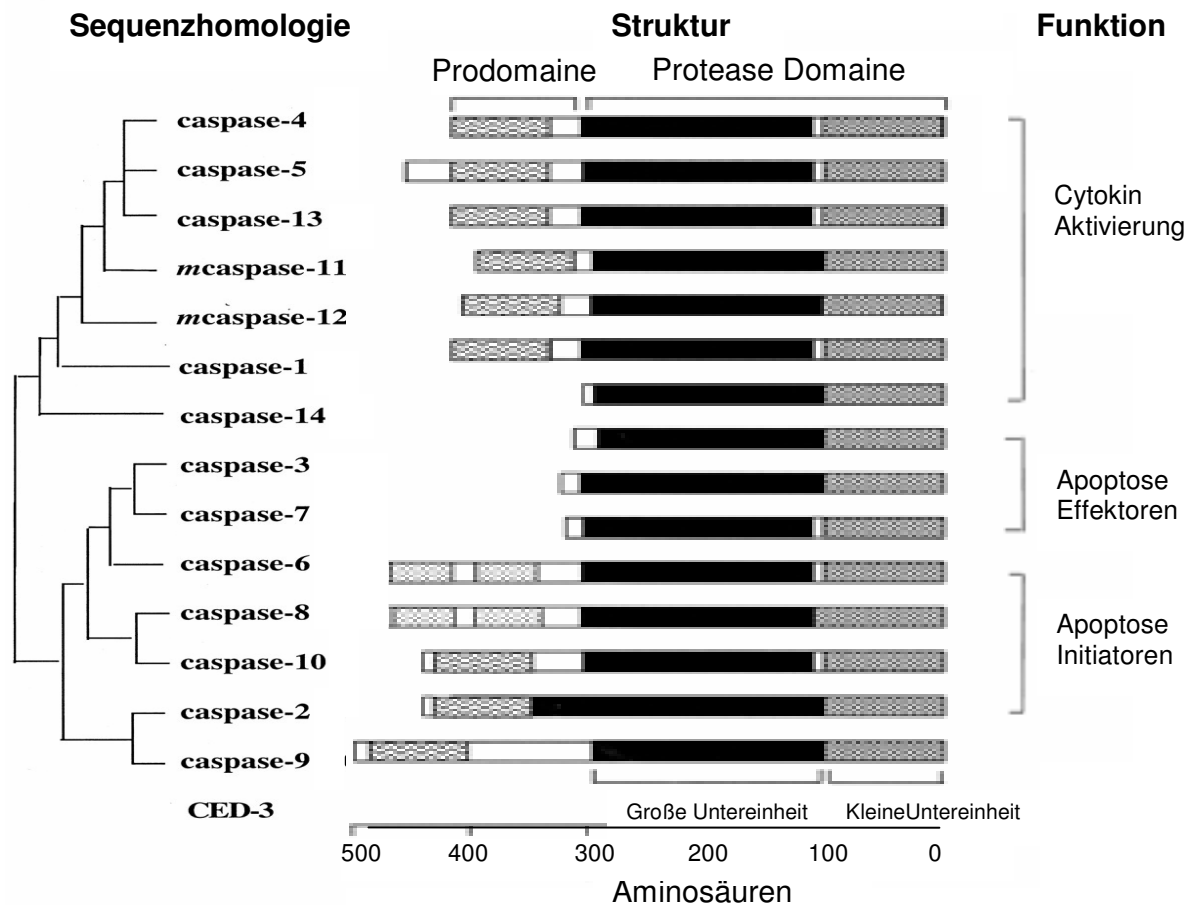
Die Apoptose kann in drei Phasen untergliedert werden: in eine Todes-Stimulus-abhängige heterogene Induktionsphase, eine gemeinsame Effektorphase, in der die Entscheidung zum Zelluntergang getroffen ist und eine gemeinsame Degradierungsphase, in der die biochemischen und morphologischen Veränderungen des Endstadiums der Apoptose festzustellen sind (Kroemer *et al.*, 1997).

Während AA hauptsächlich einen Pro-karzinogenen Effekt aufgrund seiner Genotoxizität hat, gibt es Functional Food, dem durch Apoptoseinduktion auch krebspräventive Eigenschaften zugesprochen werden (R. Martin, 2006). Eine mögliche Apoptoseinduktion durch AA wurde über den Nachweis der Aktivität der Caspase-3 untersucht.

## 2.7.2 Caspasen

Caspasen sind eine große Familie evolutionär konservierter Proteasen, welche bei *Caenorhabditis elegans* wie auch beim Menschen gefunden wurden (s. Abb. 35). An *C.elegans* wurde die Apoptose grundlegend erforscht. Es sterben genau 131 Zellen während seiner Embryonalentwicklung. Die Caspasen sind Aspartasen, welche Substrate mittels Cystein im aktiven Zentrum binden und nach dem Aspartatrest schneiden. Caspasen führen die zelluläre Selbstzerstörung aus. Man unterscheidet im Wesentlichen Initiator- und Effektorcaspasen. Initiatorcaspasen aktivieren Effektor-

caspasen als Antwort auf zellspezifische Todessignale. Effektorcaspasen schneiden zelluläre Proteine. Daneben gibt es noch scheinbar Apoptose-unabhängige inflammatorische Caspasen. Caspase-1 wird z.B. auch Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE) genannt, welches reife Cytokine generiert, die u.a. zu Vasodilation (Gefäßerweiterung) und Lymphozytenaktivierung führen (Chang und Yang, 2000).

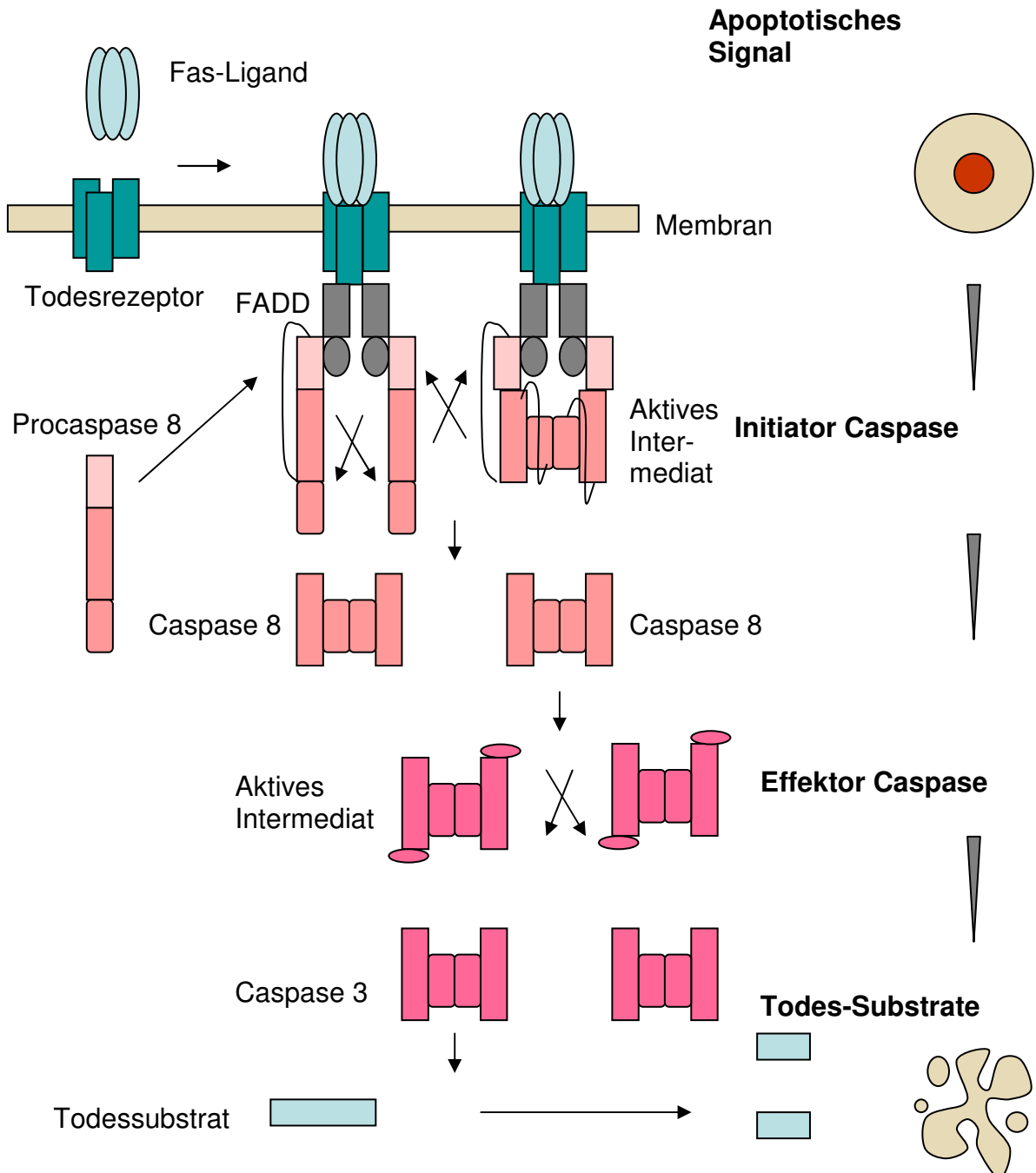


**Abb. 35: Säugetier Caspase Familie und *C. elegans* Caspase CED-3, modifiziert nach Chung und Yang, 2000.**

Caspasen liegen als inaktive Procaspasen in der Zelle vor. Proteolytische Prozesse führen zur Abspaltung der Prodomäne von der katalytischen Domäne, die aus einer kleinen und großen Untereinheit besteht. Das aktive Enzym ist letztlich ein Tetramer, welches aus zwei Procaspasen hervorgeht. Meist aktivieren sich Caspasen in einer Caspase-Kaskade. Die Adapterprotein-abhängige Oligomerisierung (s. Abb. 36, Caspase-8) unterliegt der Regulierung sowohl seitens der Überlebensfaktoren/ Todesrezeptoren sowie des Cytochrome c-Apaf1-Apoptose-Signalweges (Chang und Yang, 2000).



Wie in Abb. 36 zu sehen, wird die Effektor Caspase-3 durch die Initiator Caspase-8 aktiviert. Proteolytisch aktive dimere Intermediate schneiden sich gegenseitig zu reifen Caspasen. Weder Caspase-3 noch 8 schneiden ihre eigenen Procaspasen (Liu *et al.* 2005). Caspase-3 hat eine Substrat Präferenz für DEVD, was man sich für ihren Aktivitätsnachweis zunutze macht (Chang und Yang, 2000).



FADD: Fas Associated protein with Death Domain

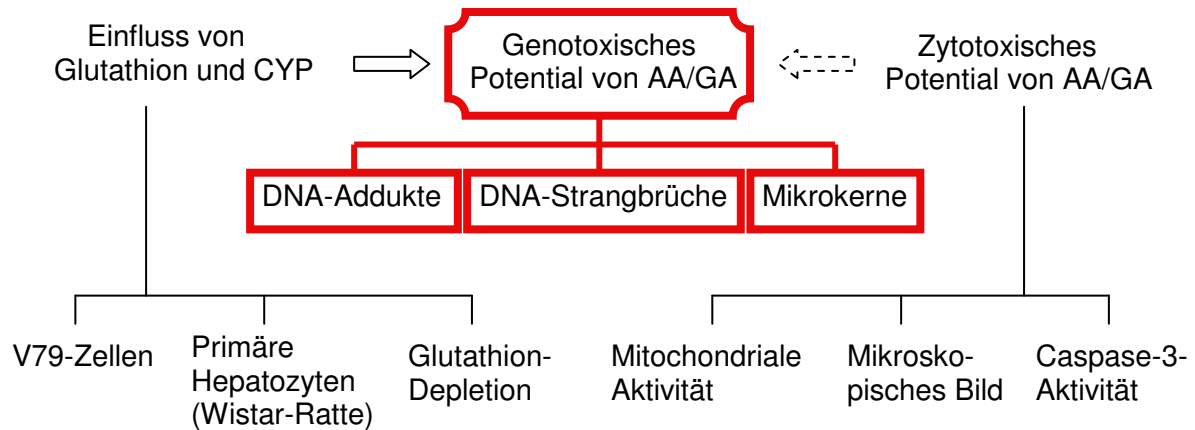
Abb. 36: Aktivierung der Procaspasen und Caspase-Kaskade modifiziert nach Chang und Yang, 2000; nach Liu *et al.*, 2005.

### 3. Problemstellung

Zur Verbesserung der Datenbasis für die Risikoabschätzung von AA für den Menschen soll das genotoxische Potential von AA und seinem *in vivo* gebildeten Metabolit GA an Säugerzellen untersucht werden. Die Schädigung des Erbmaterials wird als Ausgangspunkt für eine mutagene/kanzerogene Wirkung angesehen. Es stellt sich die Frage, ob über AA-Exposition aus Lebensmitteln eine Dosis erreicht wird, die zu einer für die Kanzerogenese relevanten Schädigung führt.

Daher soll die Dosis-Wirkungsabhängigkeit der DNA-Addukt-Bildung sowie der Induktion von DNA-Schäden durch AA bestimmt werden. Als biologischer Marker wird die konzentrationsabhängige Bildungsrate des vom reaktiveren Metabolit GA hauptsächlich gebildeten *N7*-Gua-Adduktes nach Zellinkubation *in vitro* bestimmt. Die Konzentrationen, die zu genotoxischen Schädigungen führen, werden mittels Comet-Assay ermittelt. Mit Hilfe des Mikrokerntests werden mutagene Ereignisse erfasst. Eine CREST-Färbung soll Aufschluss darüber geben, ob chromosomale Aberrationen überwiegend klastogenen oder aneugenen Ursprungs sind. Das genotoxische Potential, das sich an diesen verschiedenen biologischen Endpunkten zeigt, soll untereinander und mit Daten zu Genmutationen verglichen werden.

Da es eine Hypothese gibt, nach der Erbgutschädigungen erst nach überlasteten Abfangreaktionen mit unkritischen Proteinen wie Glutathion zum Tragen kommt, soll das genotoxische Potential von AA und GA an unterschiedlich metabolisch kompetenten Zellen untersucht werden. Die Fragestellung liegt auf dem Einfluss von Giftings- und Entgiftungsmöglichkeiten der Säugerzellen, dem Effekt von Glutathion und CYP 2E1 auf die Genotoxizität der Substanzen. Für dieses Experiment werden metabolisch aktive primäre Leberzellen der Wistar-Ratte und eine Standardzelllinie an Lungenhamsterfibroblasten mit fehlender CYP 2E1-Expression verwendet (s. Abb. 37).



Abk.: CYP: Cytochrom P450, AA: Acrylamid, GA: Glycidamid

**Abb. 37: Arbeitsschema/Problemstellung**

Weitere Fragestellungen ergaben sich aus ersten Ergebnissen. AA führte unter GSH-Depletion zu einem drastischen Viabilitätsverlust der Säugerzellen. Aus diesem Grund wurde neben der Genotoxizität auch die Zytotoxizität von AA/GA in die Untersuchungen mit einbezogen. Dazu wurde der Dosis-Wirkungs-Effekt von AA unter GSH-Reduktion auf die mitochondriale Aktivität als Maß für die Viabilität getestet. Die Frage nach Apoptoseinduktion durch AA/GA ergab sich durch die Überlegung, dass DNA-Schäden im Comet-Assay auch auf apoptotische Körperchen zurückzuführen sein können.

## 4. Synthesen

### 4.1 Synthese von Glycidamid

Um Untersuchungen zur Genotoxizität des Metaboliten von AA zu ermöglichen, wurde das Epoxid synthetisiert. Zur Synthese des GA wurde eine Synthesevorschrift von Payne und Mitarbeitern (1961) verwendet. Die Synthese erfolgte ausgehend von Acrylnitril und in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Eisenbrand (TU Kaiserslautern). Acrylnitril reagiert mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Basischen zum Epoxid GA (s. Abb. 38).

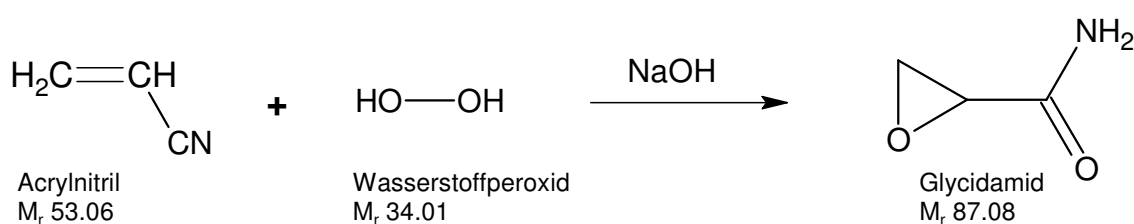


Abb. 38: Darstellung von Glycidamid; Reaktionsgleichung

Unter Argon-Schutzatmosphäre wurde das hygroskopische GA aus trockenem Aceton bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  langsam auskristallisiert.

Ausbeute Rohprodukt: 50-60%

Ausbeute nach der Kristallisation: ca. 17%

$^1\text{H}$ -NMR,  $\text{D}_2\text{O}$ , Bruker AMX 400 (400 MHz)

$\delta =$   
           2.77 (dd,  $^1\text{H}$ , 5.6 Hz, 2.6 Hz)  
           2.93 (dd,  $^1\text{H}$ , 5.6 Hz, 4.7 Hz)  
           3.39 (dd,  $^1\text{H}$ , 4.6 Hz, 2.6 Hz)

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR:         $\delta =$        47.4  
   49.0  
   174.4

Damit war das synthetisierte GA ausreichend charakterisiert und konnte in den weiterführenden Versuchen eingesetzt werden.

## 4.2 Synthese von *N*-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin

Die folgende Synthese wurde notwendig, um einen Standard für die Bestimmung von *N*7-Gua-Addukten nach Inkubation mit AA/GA in Zellen zur Verfügung zu haben. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe von Herrn Dr. Karlheinz Merz der Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Eisenbrand (TU Kaiserslautern).

Als externer Standard wurde das *N*7-Gua-Addukt hergestellt (s. Abb. 39). Als interner Standard sollte durch Verwendung von Guanosin, dessen N-Atome aus  $^{15}\text{N}$ -Atomen bestehen, markiertes *N*7-Gua-Addukt aus der Synthese hervorgehen.

1. *N*7-Gua-Addukt mit MG (238,21)
2. *N*7-Gua-Addukt mit MG (243,21) mit stabilem Isotop  $^{15}\text{N}$

Da für eine Synthese des reinen Isotopen-markierten *N*7-Gua-Adduktes keine ausreichende Menge des Isotopen-markierten Guanosin erhältlich war, wurde schweres und leichtes Guanosin im Verhältnis 1:3 verwendet  $\rightarrow$  1x MG 243,21 + 3x MG 238,21.

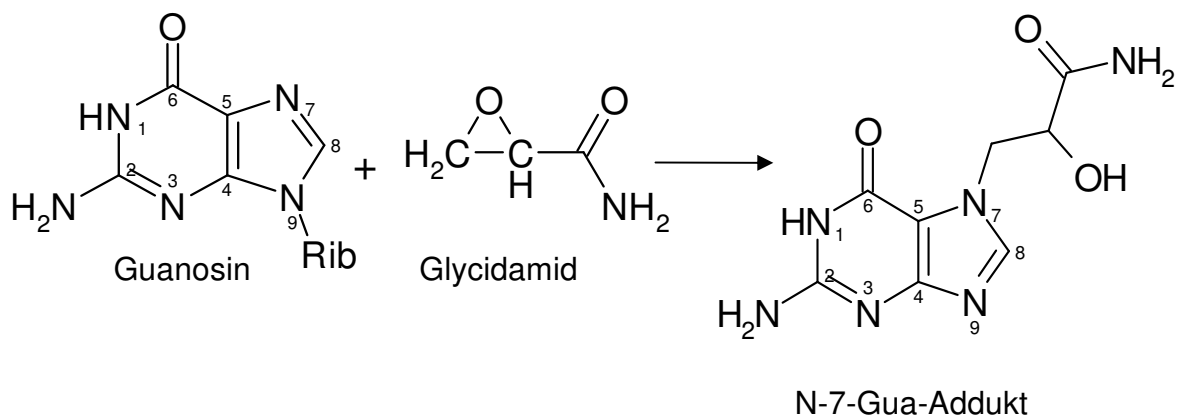
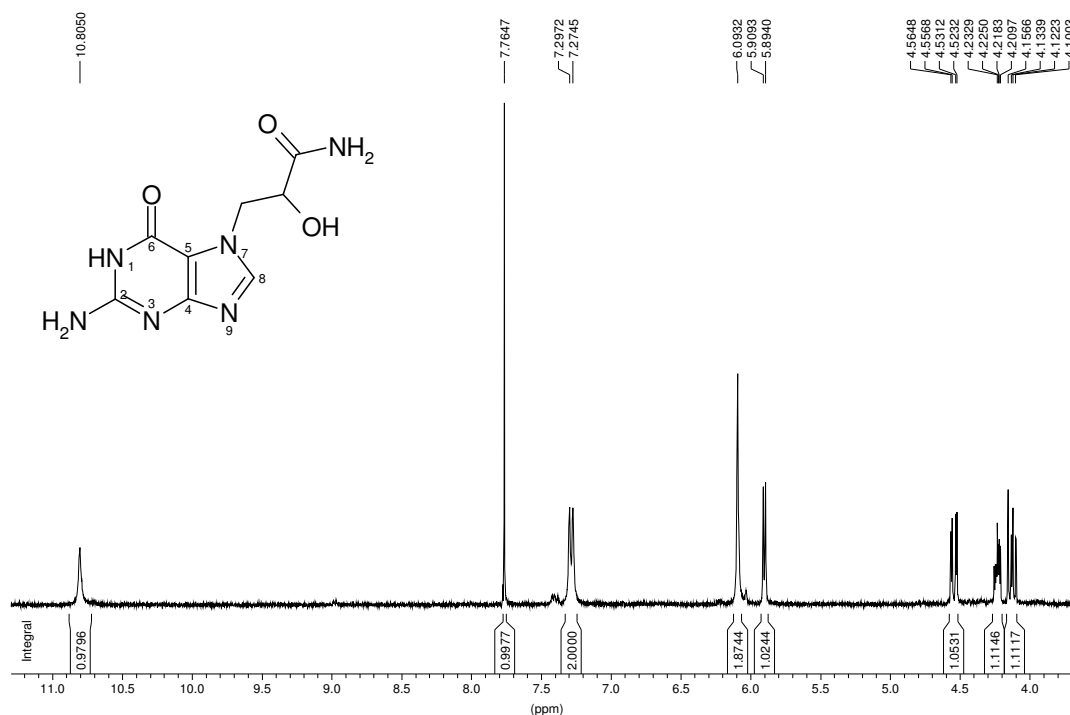


Abb. 39: Strukturen Edukte/Produkt

Zur Überprüfung der Reinheit des Produktes wurden 4,5 mg des Niederschlages in deuteriertem DMSO aufgenommen und ein  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum gemessen (s. Abb. 40).



$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ): d 10,805 (1H, s, N1H), 7,765 (1H, s, H8), 7,286 (1H, s, COH2), 6,093 (2H, s, N2H2), 5,90165 (1H, d,  $J=6.0$ , OH), 4,5398 (1H, dd,  $J_{\text{gem}}=13.2$ ,  $J_{\text{vic}}=3.0$ , N7CHaHb), 4,198975 (1H, m, CHOH), 4,128275 (1H, dd,  $J_{\text{gem}}=13.2$ ,  $J_{\text{vic}}=9.2$ , CHaHb)

Abb. 40:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von *N*-7-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)guanin (in DMSO) (1. und 2. identisch im  $^1\text{H-NMR}$ )

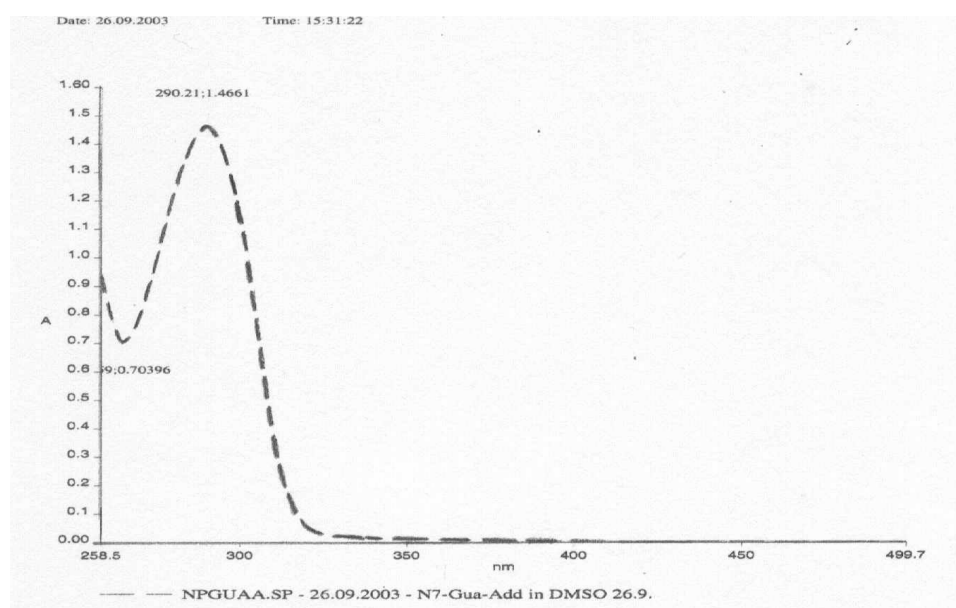


Abb. 41: UV-Spektrum vom *N*7-Gua-Addukt in DMSO

Das Absorptionsmaximum vom *N7*-Gua-Addukt (DMSO) beträgt  $\lambda_{\max}$  290,2nm (s. Abb. 41). Zur Analyse wurde das *N7*-Gua-Addukt mittels HPLC/UV-Detektor bestimmt. Die Retentionszeit betrug 5,2min (2,5% Acetonitril in 10mM Ammoniumformiat, wässrig, Flussrate 200 $\mu$ l/min). Die Methode zur Bestimmung der Addukte nach Zellinkubation wurde modifiziert (vgl. Kapitel 8.9) und erfolgte mittels HPLC/MS/MS.

In der Massenspektroskopie des *N7*-Gua-Adduktes ergaben sich folgende Massenbruchstücke im Produktionenscan  $m/z$  239 (s. Abb. 42):

MS (ES)  $m/z$  239 [(M+H)<sup>+</sup>], MS/MS ( $m/z$  239) 194 [(MH-HCONH<sub>2</sub>)<sup>+</sup>], 152 [(Gua + H)<sup>+</sup>]

Das Spektrum zeigt die Bruchstücke 88, 135, 152 und 194 entsprechend den Literaturwerten von Segerbäck und Mitarbeitern (1995).

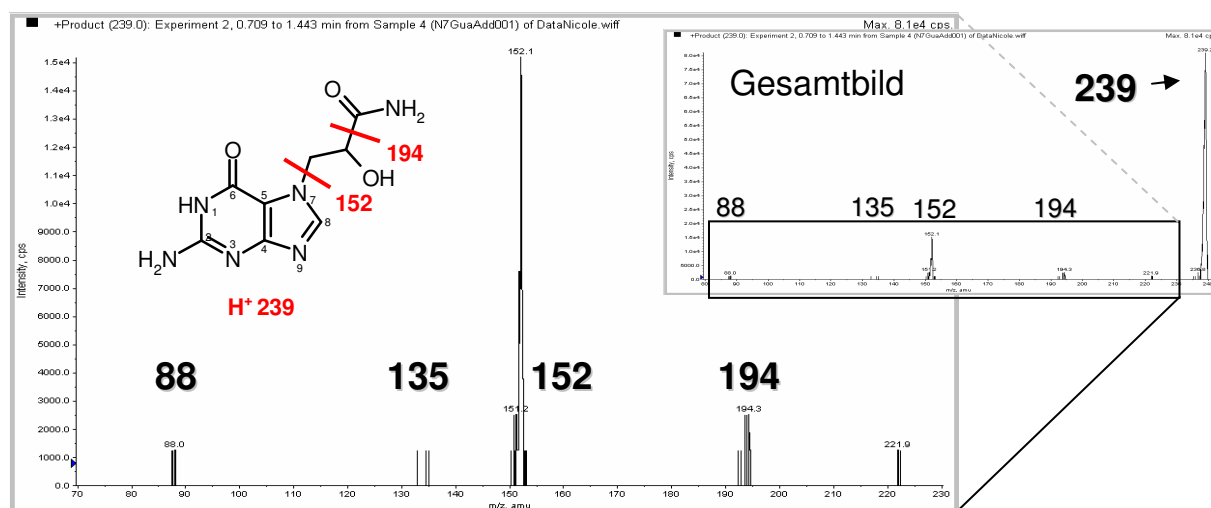


Abb. 42: Produktionenscan  $m/z$  239

**239: Elterion, das *N7*-Gua-Addukt**  
**152: Verlust von Glycidamid**  
**194: Verlust von HCONH<sub>2</sub>**

Damit war das *N7*-Gua-Addukt ausreichend charakterisiert und konnte in den weiterführenden Versuchen eingesetzt werden.

## 5. Etablierung geeigneter Testsysteme

### 5.1 Nachweis der GSH-Depletion durch BSO an V79-Zellen und primären Rattenhepatozyten

Eine Fragestellung in dieser Arbeit war der Einfluss des intrazellulären Glutathion-Spiegels auf das genotoxische Potential von AA. Der GSH-Spiegel kann mittels L-Buthioninsulfoximin (BSO) in Zellen gesenkt werden (Chen *et al.*, 2005). In einem ersten Versuch wurde anhand der verwendeten Zelllinien die BSO-Konzentrationsabhängigkeit überprüft. Der GSH-Gehalt wurde dazu nach 24h BSO-Behandlung gemessen. Abb. 43 zeigt die Ergebnisse an V79-Zellen<sup>29</sup> und Abb. 44 an primären Rattenhepatozyten. In weiterführenden Untersuchungen wurden die Zellen für 24h mit BSO vorinkubiert und für die Dauer der Substanzinkubation mit BSO koinkubiert.

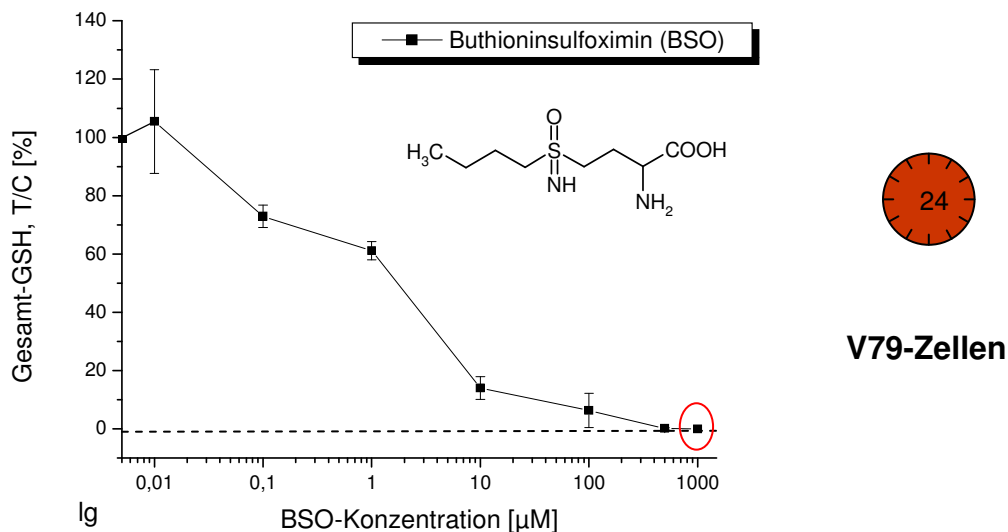


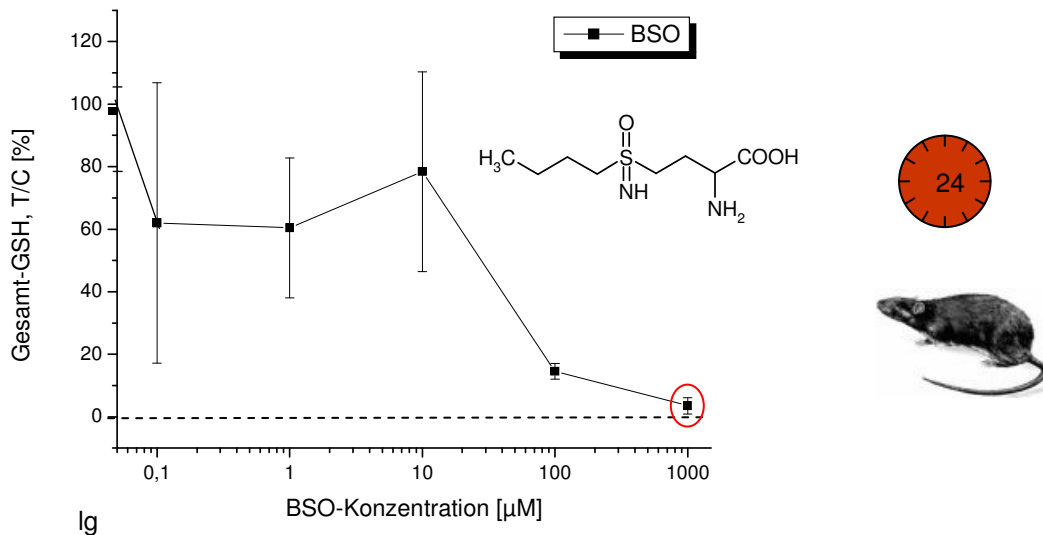
Abb. 43: GSH-Assay; V79-Zellen, 24h BSO-„Vor“-Inkubation (10%FKS) n ≥ 3.

BSO führt konzentrationsabhängig zu einer GSH-Abnahme in V79-Zellen. 0,1µM BSO reduziert den GSH-Gehalt nach 24h bereits auf  $73 \pm 4\%$ . Ab 1mM hemmt BSO die  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase in V79-Zellen vollständig; es ist kein GSH mehr detektierbar ( $0 \pm 0\%$ ). Der  $EC_{50}$ -Wert<sup>30</sup> (berechnet nach linearer Regressionsanalyse über 0,1-10µM) beträgt  $3,5\mu\text{M} \pm 0,6\mu\text{M}$ .

<sup>29</sup> V79-Zellen: Lungenfibroblasten eines chinesischen Hamsters

<sup>30</sup>  $EC_{50}$ : effect concentration = Konzentration, bei der der GSH-Gehalt um 50% erniedrigt ist





**Abb. 44: GSH-Assay; Primäre Rattenhepatozyten, 24h BSO-, Vor“-Inkubation (1%ITS) n = 3.**

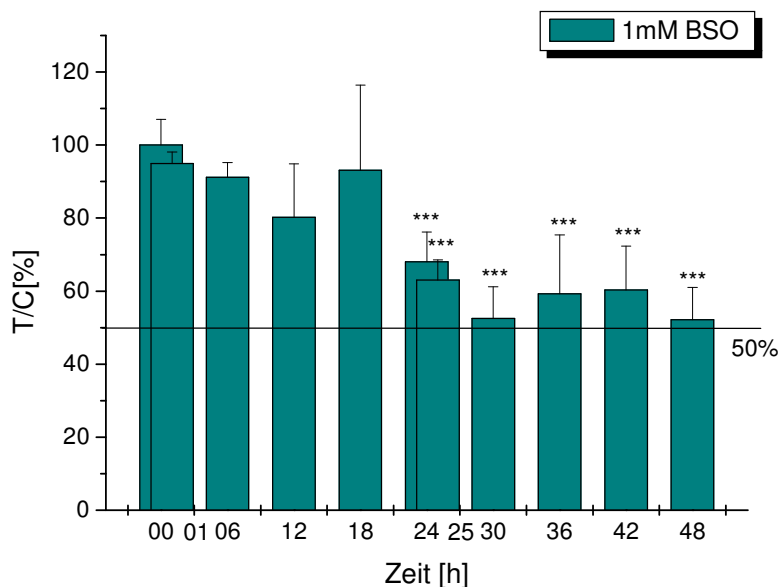
Die primären Hepatozyten verschiedener Rattenindividuen (Wistar-Ratte) reagieren unterschiedlich sensibel auf BSO im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10 µM (Abb. 44). Bis zu einer BSO Konzentration von 10µM (24h) wurde der GSH-Gehalt innerhalb sehr hoher Standardabweichungen, die bei V79-Zellen nicht auftraten, an den primären Hepatozyten einiger Individuen nicht beeinflusst und an denen anderer Individuen bis mehr als 50% reduziert. 100µM BSO für 24h führt jedoch zu einer deutlichen und einheitlichen Reduktion auf  $14,5 \pm 2,5\%$  des GSH-Gehaltes. 1mM BSO senkt effektiv den GSH-Gehalt der primären Rattenhepatozyten innerhalb von 24h auf  $3,5 \pm 2,6\%$  im Vergleich zum GSH-Level unbehandelter Zellen.

Die lineare Regressionsanalyse über 0,1-100µM ergibt einen  $EC_{50}$ -Wert von  $35 \pm 18\mu\text{M}$ . Der  $EC_{50}$ -Wert von BSO ist mit  $35\mu\text{M}$  10x höher als der  $EC_{50}$ -Wert an V79-Zellen ( $3,5\mu\text{M}$ ). Ein Grund für die geringere Effektivität des BSO gegenüber den Hepatozyten könnte darin liegen, dass diese über einen größeren GSH-Pool verfügen als V79-Zellen. Die  $EC_{50}$ -Werte liegen in dem Bereich von Stock (2005), der  $EC_{50}$ -Werte (15h) von unter  $0,1\mu\text{M}$  bis  $25\mu\text{M}$  für die GSH-Depletion durch BSO an malignen humanen Gliomzelllinien ermittelt hat.

Im Vergleich zu V79-Zellen ist noch ein minimaler GSH-Gehalt nach 24stündiger Vorbehandlung mit 1mM BSO mittels GSH-Assay photometrisch zu detektieren (0 gegenüber 3,5%). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BSO den GSH-Gehalt konzentrationsabhängig reduziert und 1mM BSO den GSH-Gehalt in V79-Zellen und primären Rattenhepatozyten nach 24h effektiv reduziert.

### 5.1.1 Zytotoxischer Effekt von BSO

Neben der GSH-Depletion wurde auch die Auswirkung von BSO auf die Zellviabilität überprüft. Die Inkubation mit BSO ist mit einem Rückgang der Zellproliferation verbunden und der Glutathionlevel korreliert mit Aktivierung des Wachstumsfaktorrezeptors (Rigacci *et al.* 1997). Kang und Enger (1992) stellten einen zytostatischen Effekt des BSO auf Rattennierenfibroblasten (NRK-49F-Zellen) fest, der unabhängig vom GSH-depletierenden Effekt ist. Im Folgenden wurde der Verlust mitochondrialer Aktivität als Maß für Zytotoxizität bestimmt. Es wurde der zytotoxische/zytostatische Effekt von 1mM BSO an V79-Zellen in Abhängigkeit der Inkubationsdauer untersucht. In Abständen von 6h wurden mit 1mM BSO behandelte und unbehandelte Zellen mit WST-1-Reagenz versetzt und ihre mitochondriale Aktivität verglichen.



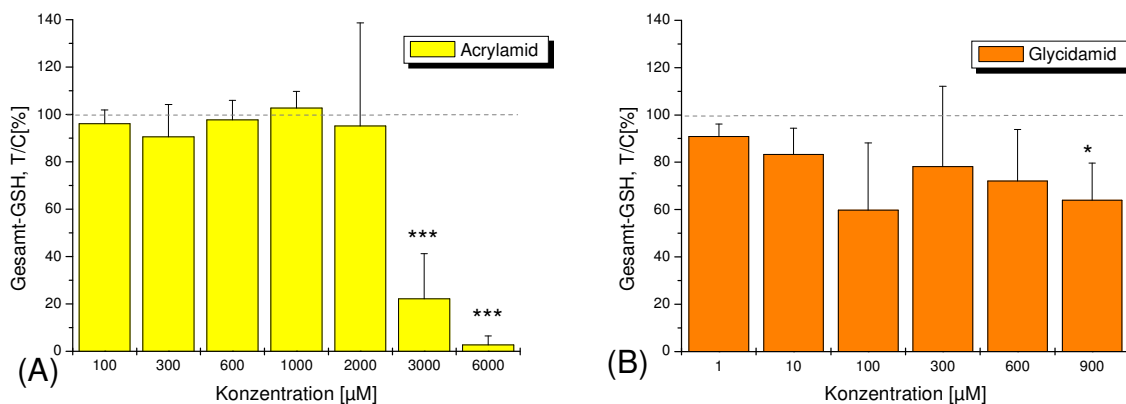
**Abb. 45: WST-1-Assay; BSO an V79-Zellen, n = 3-6 (1n = Mittelwert aus 4-8x Bestimmung)**  
 Die eingezeichneten Signifikanzen beziehen sich auf die für den Zeitpunkt jeweilige Kontrolle ( $100 \pm \text{SD}[\%]$ ; nicht gezeigt) mit  $***p < 0,005$  [t-Test, Origin 6.0]  
 Mediumwechsel nach 24h: 0-24h mit 10%FKS, 24-48h serumfrei; 1%PBS (Lösungsmittel).

Wie in Abb. 45 dargestellt ist, beeinflusst BSO zeitabhängig die mitochondriale Aktivität in V79-Zellen. Ab 24h kommt es zu einem hoch signifikanten Effekt durch BSO im Vergleich zur Kontrolle (0h). Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert liegt bei  $42\text{h} \pm 6\text{h}$ . Dies ist konsistent mit den Untersuchungen von Chi und Mitarbeitern (2007), nach denen GSH-Depletion die mitochondriale Funktion herabsetzt. Der Unterschied in der mitochondrialen Aktivität kann entweder auf einem zytostatischen oder zytotoxischen

Effekt von BSO beruhen. Da die mitochondriale Aktivität nach 24h in Anwesenheit von 1mM BSO und 10% FKS nur noch  $68 \pm 8\%$  beträgt, kann der Effekt auf eine geringere Proliferationsrate zurückzuführen sein. Ein zytotoxischer Effekt kann aufgrund des geringen Unterschiedes zwischen der 24- und 48stündigen, serumfreien Inkubation ausgeschlossen werden. Weiterhin bestätigen Literaturdaten die vorliegenden Ergebnisse, nach denen 1mM BSO zu einem Wachstums-Arrest in NRK-49F-Zellen führte (Kang und Enger, 1992).

### 5.1.2 Reduktion des Glutathions durch Acrylamid/Glycidamid in V79-Zellen

Wenn der GSH-Spiegel einen Einfluss auf das genotoxische oder zytotoxische Potential von AA oder GA hat (vgl. Kapitel 6), stellt sich die Frage, ob AA oder GA selbst im vorliegenden System den GSH-Spiegel konzentrationsabhängig modulieren. Die GSH-Reduktion durch AA und GA wurde in einem Konzentrationsbereich bis 6mM (für AA) und bis 900 $\mu$ M (für GA) durchgeführt.



**Abb. 46: GSH-Assay; V79-Zellen, 24h-Inkubation, 1%DMSO**  
**GSH-Depletion (A) Acrylamid n=3-5 (B) Glycidamid n=4-5;**  
**Signifikanzen im Vgl. zur Kontrolle\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,005$ .**



AA führt ab 3mM zu einem drastischen Rückgang auf 22% des GSH-Gehaltes in V79-Zellen (s. Abb. 46 A). Bis 1mM AA für 24h wird der GSH-Spiegel kaum beeinflusst. 6mM AA senkt den GSH-Gehalt fast vollständig. Klauning und Kamendulis

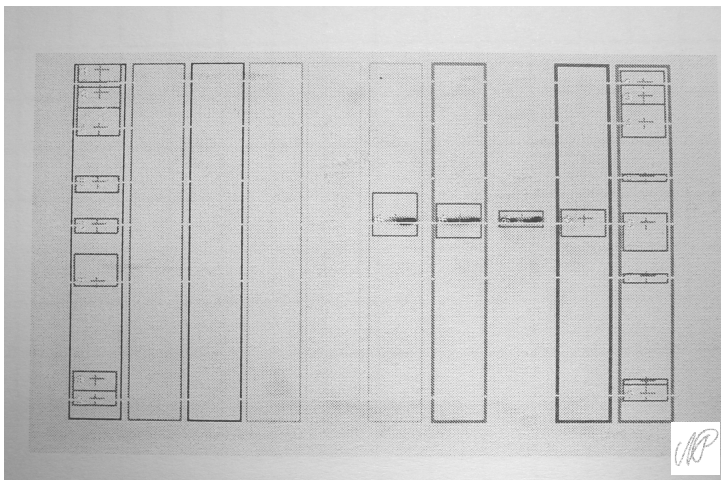
(2005) stellten einen Zusammenhang zwischen AA bedingter Modulation des GSH-Spiegels und einem Zelltransformationsprozess in SHE-Zellen<sup>31</sup> fest.

GA (s. Abb. 46 B) wurde bis 900µM getestet und zeigt in diesem Konzentrationsbereich (im Vergleich zu AA früher) einen leichten GSH-reduzierenden Effekt auf V79-Zellen, der bis 600µM jedoch nicht signifikant ist. Es ist eine Verringerung des GSH-Gehaltes durch GA auf etwa 60% zu verzeichnen, der ab 900µM signifikant ist (64 ± 16%, p < 0,05).

## 5.2 Nachweis von CYP 2E1 an verschiedenen Zellsystemen

### Nachweis auf Proteinebene

Die Kenntnis über die Enzym-Ausstattung der Zellen ist für die Versuche *in vitro* zur Toxizität von AA bedeutend. Es ist bekannt, dass CYP 2E1 AA giften kann. Daher wurden zunächst die verwendeten Zellen (V79-Hamsterlungen-fibroblasten, humane Coloncarzinomzellen CaCo-2 und primäre Wistar-Rattenhepatozyten) mittels WesternBlot auf ihre CYP 2E1-Expression analysiert.



**Abb. 47: WesternBlot; von links nach rechts: 1x Marker, 2x V79, 2x Caco-2, 2x Hep 0h, 1x Hep 2h, 1x Hep 24h, 1x Marker) Hep: Primäre Rattenhepatozyten.**

Auf Proteinebene wurde die Expression von CYP 2E1 an den primären Hepatozyten der Wistar-Ratte nachgewiesen (s. Abb. 47). Diese Zellen gelten auch in der Literatur als metabolisch kompetent und aktiv: Woodcroft und Novak (1998) untersuchten die Cytochrom P450 2E1 Expression in primären kultivierten Rattenhepatozyten und

<sup>31</sup> SHE-Zellen: Syrische Hamster Emryonalzellen

ihre Induktion durch Xenobiotika. Sie stellten fest, dass sich das Kultursystem primärer Rattenhepatozyten aufgrund der CYP 2E1-Expression und Induktion durch Xenobiotika für Studien zur Rolle von CYP 2E1 bei der Bioaktivierung von z.B. mutmaßlichen Kanzerogenen eignet (Woodcroft und Novak, 1998). Frisch isolierte Hepatozyten der Ratte gelten auch aufgrund der Ähnlichkeit in Aktivität, Kinetik und Substrat/Inhibitor-Spezifität ihrer fremdstoffmetabolisierenden Enzyme als ein gutes Modell, um die Verhältnisse und Empfindlichkeit im Menschen wiederzuspiegeln (O'Brien *et al.*, 2004).

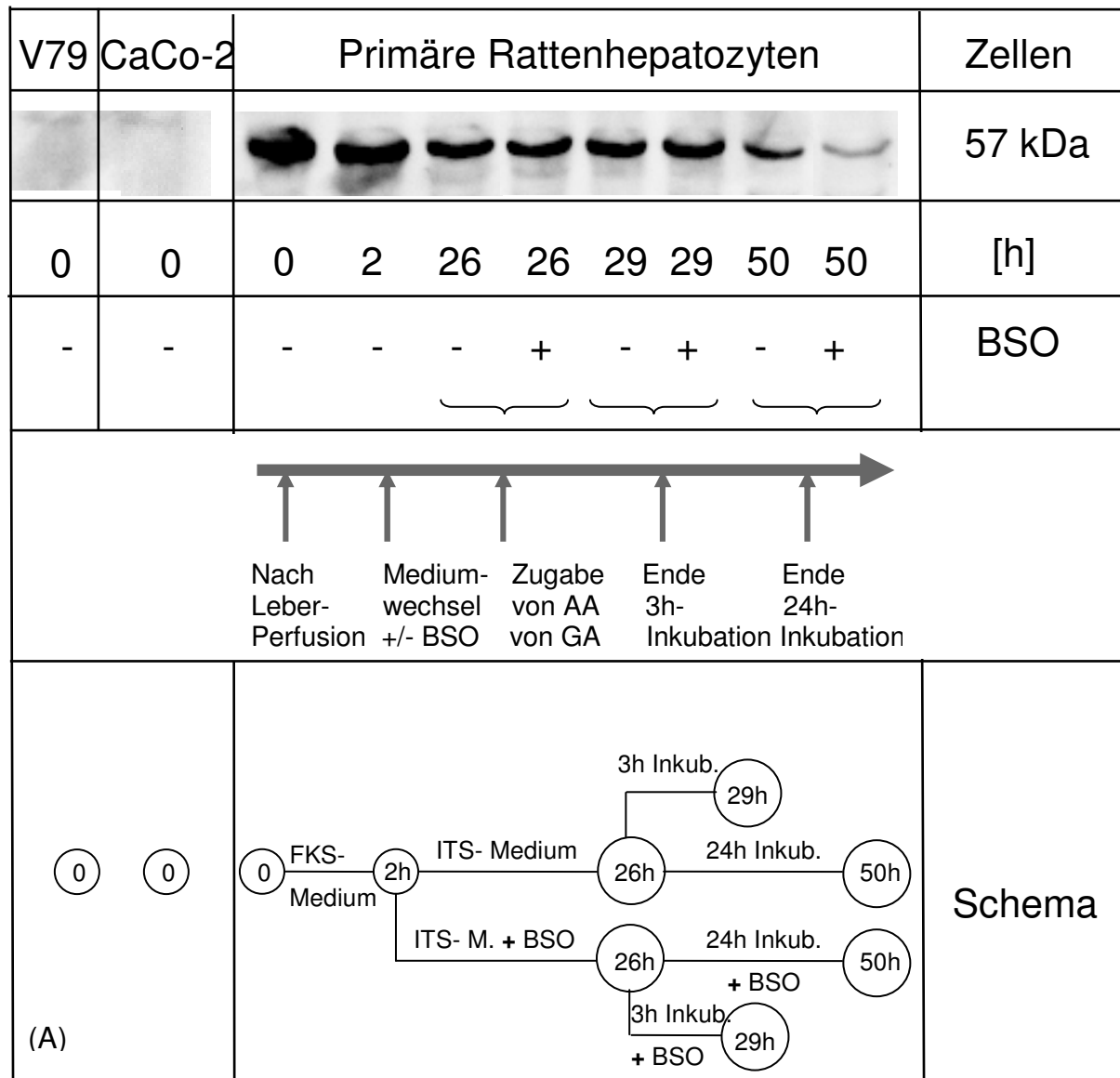
V79-Zellen und CaCo-2-Zellen zeigen keine detektierbaren Banden (s. Abb. 47). Auch nach Literaturangaben exprimieren V79-Zellen endogen keine messbaren Gehalte von Cytochrom P450-Proteinen (Krebsfänger *et al.*, 2003). CaCo-2-Zellen hingegen scheinen über marginale Mengen an CYP 2E1 zu verfügen, die Strupp (2003) mittels WesternBlot aus mikrosomalen CaCo-2-Proteinen nachweisen konnte. Im Verhältnis zu den CYP 2E1-Gehalten der Rattenhepatozyten ist der CYP 2E1-Gehalt der CaCo-2-Zellen aber sehr gering und daher vermutlich ohne Mikrosomenaufarbeitung nicht detektierbar.

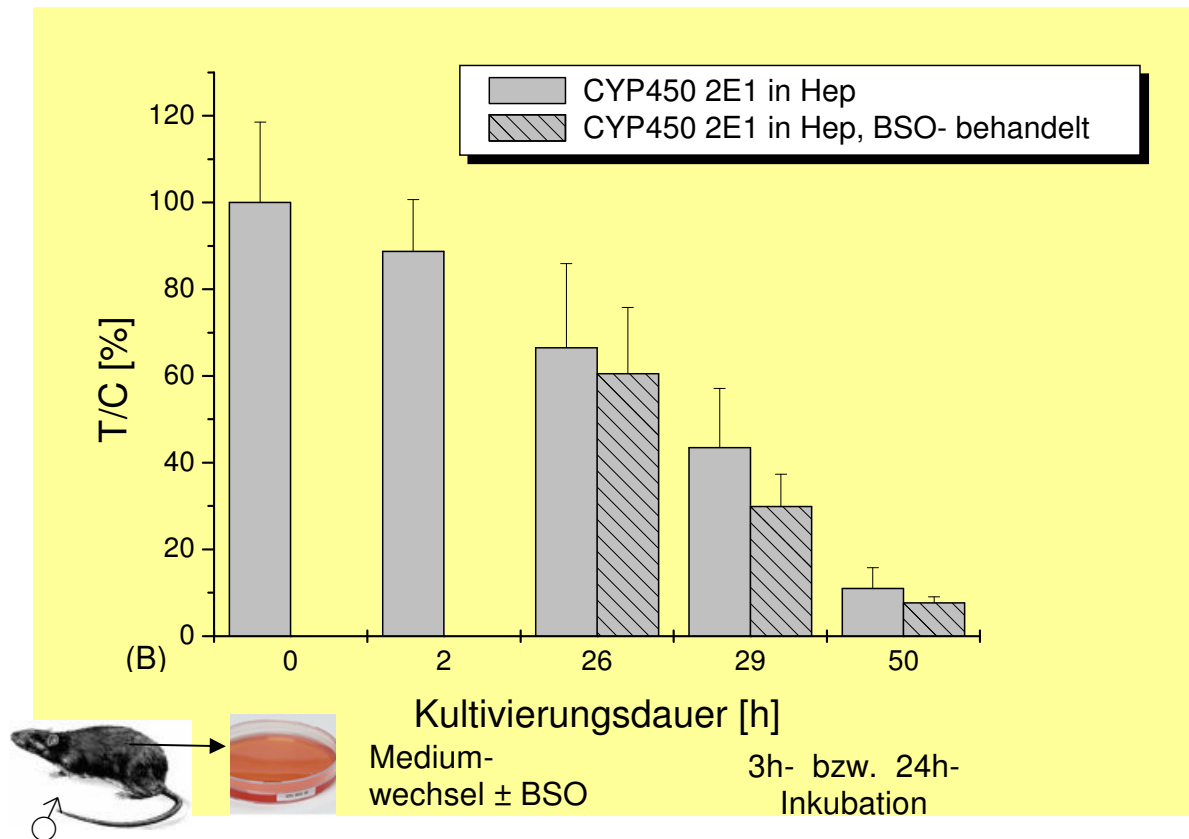
Im Rahmen dieser Arbeit stellen damit V79-Zellen und primäre Rattenhepatozyten die geeigneten Zellsysteme für den Vergleich der Wirkung von AA auf Zellen mit und ohne CYP 2E1 dar. Primäre Rattenhepatozyten sollten AA giften können, V79-Zellen nicht.

Allerdings wird auch von einem zeitabhängigen Verlust des CYP 450 vermittelten Metabolismus an frisch isolierten Hepatozyten berichtet, wobei verschiedene Kultivierungssysteme zu einer unterschiedlichen Verlängerung der Lebensdauer führen (Griffin und Houston, 2004). Daher wurde an den primären Rattenhepatozyten die Abhängigkeit der CYP 2E1-Expression von der Kultivierungsdauer untersucht.

### 5.2.1 Nachweis der CYP 2E1-Expression in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer an primären Rattenhepatozyten

Die Kultivierungsbedingungen, wie die Nahrungszusammensetzung des Mediums oder die Matrix, auf der die Zellen anheften, nehmen Einfluss auf die spezifischen Funktionen der Zellen (Guguen-Guillouzo und Guillouzo, 1983). Unter konventionellen Kultivierungsbedingungen nimmt auch die Aktivität der CYP 450 abhängigen Monooxygenase stündlich ab (Guguen-Guillouzo und Guillouzo, 1983). Studien, die eine 24stündige Vorbehandlung der Zellen bedingen, machen eine zeitabhängige Kontrolle des CYP 2E1-Gehaltes der Primärzellen notwendig. Daher soll der Einfluss der Versuchsbedingungen, die zu den Ergebnissen des Comet-Assay vorliegender Arbeit geführt haben, betrachtet werden.





Abk.: FKS: fötales Kälberserum, ITS: Insulin Transferrin Selenium, BSO: Buthioninsulfoximin, AA: Acrylamid, GA: Glycidamid, Inkub.: Inkubation, Hep: Primäre Rattenhepatozyten

**Abb. 48: WesternBlot: Expression des CYP 2E1-Proteins in primären Rattenhepatozyten in Abhängigkeit der Zellkultivierung (Zeit) und GSH-Depletion durch BSO.** Zeitpunkt Null wurde dem Vorliegen der frisch präparierten Rattenhepatozyten gleichgesetzt. Bei primären Rattenhepatozyten erfolgt nach 2h ein Mediumwechsel von FKS-haltigem zu ITS-haltigem Medium. Anschließend wird ein Teil der Zellen für 24h mit BSO vorbehandelt. Für die CYP 2E1-Versuchsreihe wurde ohne Testsubstanz, aber +/- BSO inkubiert.  
**A) Repräsentativer WesternBlot für drei voneinander unabhängige Versuche.**  
**B) Zusammenfassung der Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung: CYP 2E1 in [%] im Vergleich zur Kontrolle (0h) (Test over Control T/C).**

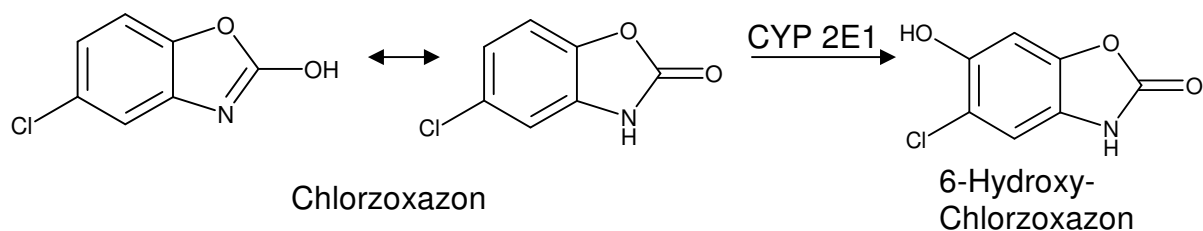
Die WesternBlot-Untersuchungen sollen nachweisen, ob ausreichend CYP 2E1 zur Aktivierung von AA im Inkubationszeitraum vorhanden ist. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet, lysiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und der CYP 2E1-Gehalt mittels WesternBlot bestimmt. Der Cytochrom P450 2E1-Gehalt nahm in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer ab (s. Abb. 48). Nach dem ersten Mediumwechsel nach 2h waren noch etwa 90% des CYP 2E1-Proteins detektierbar. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Vorinkubation begonnen. Alternativ dazu wurde aufgrund des hier nachgewiesenen CYP 2E1-Verlustes in Kapitel 6.1.2 ebenfalls eine direkte Inkubation mit AA ohne BSO-Behandlung nach 2h durchgeführt. 26h nach Entnah-

me und Ausstreuen der primären Rattenhepatozyten sind in Abwesenheit von BSO noch  $67 \pm 19\%$  der CYP 2E1-Proteine in den Zellen vorhanden. Die BSO-Behandlung bzw. GSH-Depletion führt zu einer marginalen nicht signifikanten Erniedrigung des CYP 2E1-Gehaltes im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dieser CYP 2E1-Gehalt sollte ausreichend sein, um das AA zu GA zu aktivieren. In dem folgenden 3h-Inkubationszeitraum kommt es zu einem weiteren 20-30%igen Verlust des CYP 2E1-Protein-Anfangsgehaltes. Am Ende des Experimentes, 50h nach der Leberperfusion, ist mit und ohne 48 stündiger BSO-Behandlung der CYP 2E1-Protein Level auf etwa 10% gesunken. Daraus ergibt sich, dass BSO keinen signifikanten Einfluss auf die CYP 2E1-Expression an primären Rattenhepatozyten besitzt. Entscheidend für die Untersuchungen auf Genotoxizität war die nachgewiesene Möglichkeit, dass primäre Rattenhepatozyten im Vergleich zu V79-Zellen in der Lage sind, AA mittels CYP 2E1 zu aktivieren. Der durchgeführte WesternBlot bestätigt zunächst die Expression. Die Aktivität lässt sich mittels Aktivitäts-Assay nachweisen und wurde im Anschluss an diese Untersuchungen ermittelt.

## 5.2.2 Nachweis der CYP 2E1-Aktivität

### Nachweis der Funktion

Im Folgenden wird ein funktioneller Assay durchgeführt um zu untersuchen, ob das in primären Rattenhepatozyten exprimierte CYP 2E1, welches mittels WesternBlot nachgewiesen wurde (vgl. Kapitel 5.2.1), durch die Kulturbedingungen in seiner Aktivität beeinflusst wird. CYP 2E1 kann durch Oxidation von Chlorzoxazon nachgewiesen und mittels HPLC detektiert werden (s. Abb. 49).



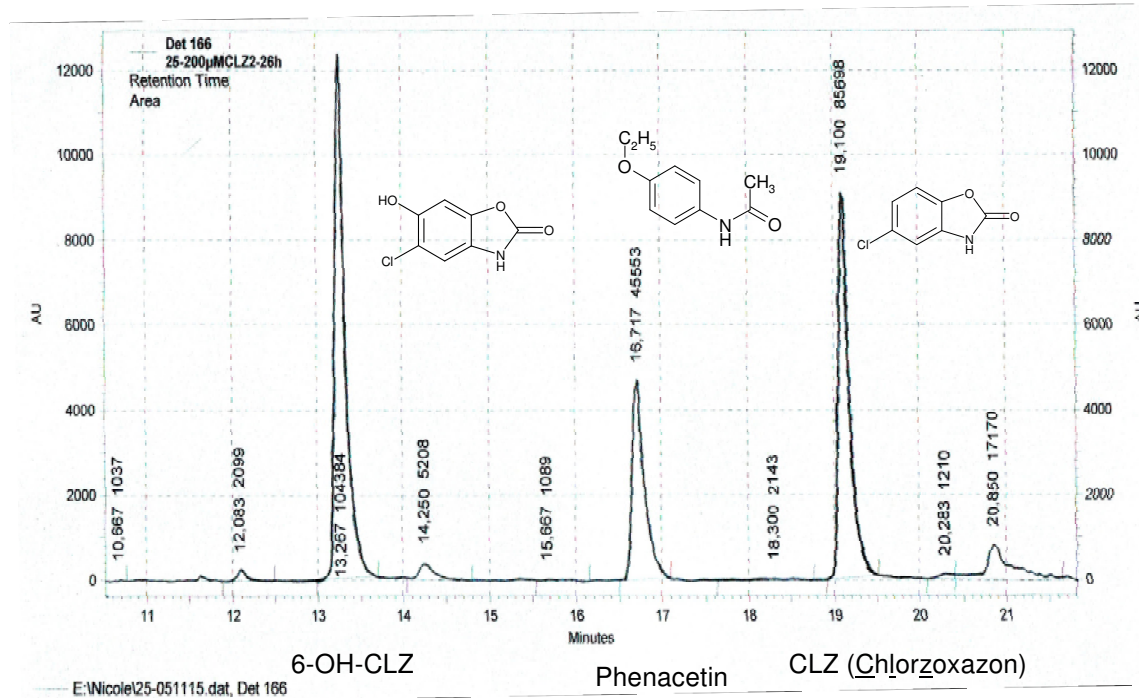
**Abb. 49: CYP 2E1-vermittelte Oxidation von Chlorzoxazon**

Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung nach Leberzellentnahme jeweils für 24h mit Chlorzoxazon als spezifisches Substrat für CYP 2E1 inkubiert. Das Produkt wird aus dem Mediumüberstand mittels HPLC analysiert. Als Maß für die CYP 2E1-Aktivität ist in Abhängigkeit der angebotenen Substratmenge



die Menge des gebildeten Produktes 6-Hydroxy-Chlorzoxazon (6-OH-CLZ) aufgetragen (s. Abb. 51) sowie der Umsatz von CLZ zu 6-OH-CLZ dargestellt (s. Abb. 52). Als interner Standard diente Phenacetin (Antipyretikum und Analgetikum).

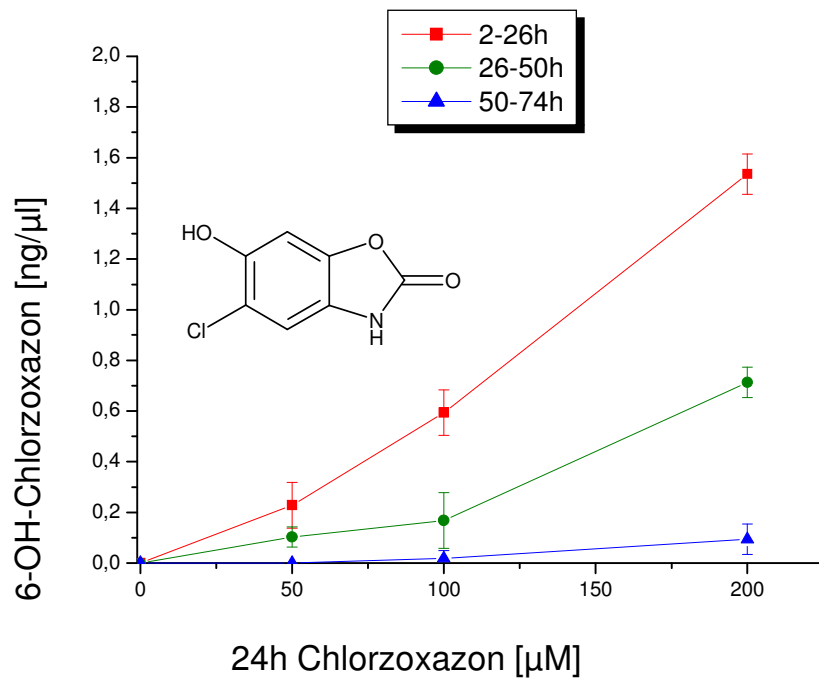
Es wurde eine deutliche Auftrennung der Substanzen erreicht (s. Abb. 50). Die Nachweisgrenze für 6-OH-CLZ betrug 0,01 ng/μl (3:1=Signal:Rauschen).



**Abb. 50:** Repräsentatives Chromatogramm, welches die Auftrennung der drei Substanzen zeigt.

Quantitativ wurde festgestellt, dass innerhalb der ersten 24h nach dem Ausstreuen bzw. erstem Mediumwechsel bis zu etwa 925ng CLZ von 6Mio primären Rattenhepatozyten oxidiert wird. Wie in Abb. 51 dargestellt ist, steigt mit einem größeren Substratangebot erwartungsgemäß auch die Menge des entstandenen Produktes im Überstand (6-OH-CLZ) und ist damit weiteres Indiz für die Funktionalität und Qualität des Assays.

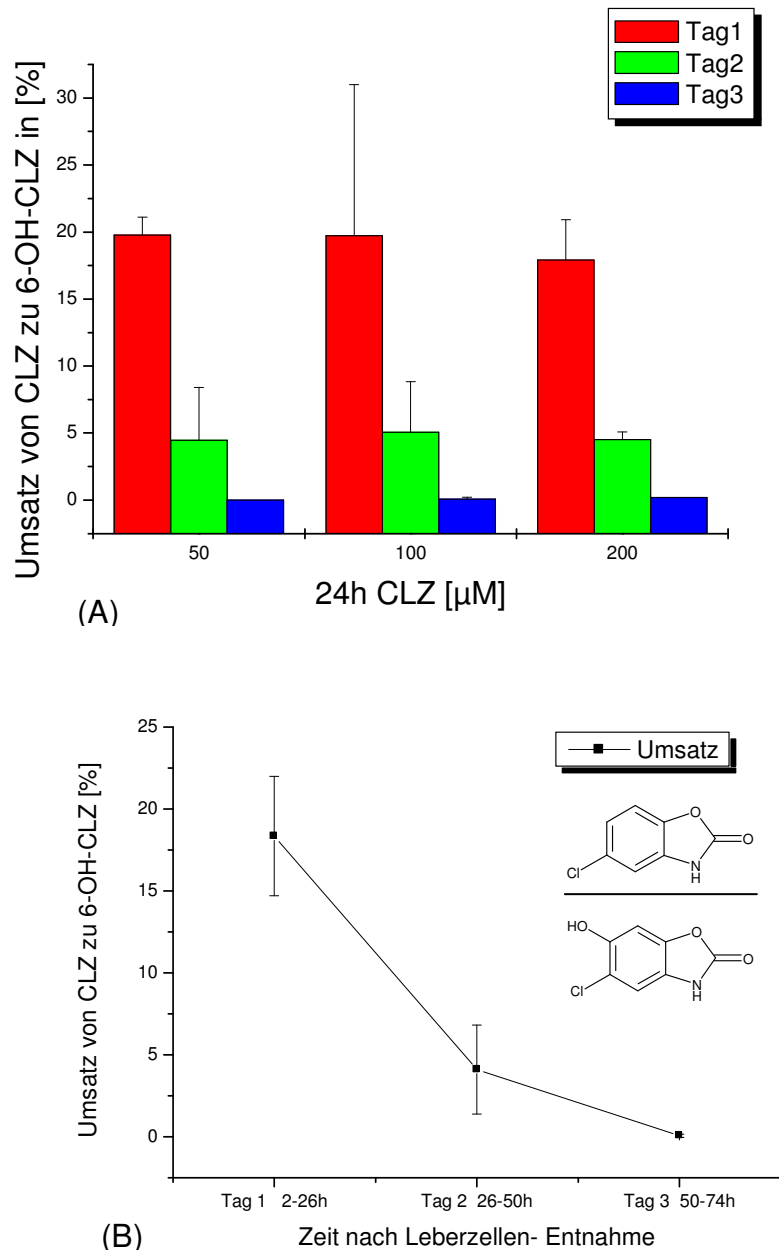
Bei identischer CLZ-Konzentration entsteht, je länger die Zellen sich in Kultur befinden bevor sie inkubiert werden, weniger 6-OH-CLZ. Bei der niedrigsten eingesetzten CLZ-Konzentration von 50μM ist im Überstand der vom 2. auf den 3. Tag inkubierten Zellen kein 6-OH-CLZ mehr detektierbar. Unter üblichen Versuchsbedingungen ist die Substanzinkubation jedoch spätestens am 2. Tag (50h nach Leberperfusion) abgeschlossen und die Zellen werden verworfen. Die Ergebnisse implizieren, dass die primären Rattenhepatozyten unter gewählten Kulturbedingungen bis zu etwa 50h nach Präparation eine hohe CYP 2E1-Aktivität besitzen.



**Abb. 51: Menge des in primären Rattenhepatozyten CYP 2E1-vermittelt gebildeten 6-OH-Chlorzoxazon, bestimmt im Überstand in Abhängigkeit von Substratmenge und Kulturdauer (angegeben: Zeitfenster der 24h-Inkubation bezüglich der Kulturdauer) Anzahl der Bestimmungen  $n=8$  für 2-26h;  $n=6$  für 26-50h und  $n=3$  für 50-74h.**

Bei der Berechnung des Umsatzes von CLZ zu 6-OH-CLZ stellt sich heraus, dass am ersten Tag  $18,4 \pm 3,6\%$  der angebotenen Substratmenge umgesetzt werden. Die Umsatzrate scheint unabhängig von der Substratkonzentration zu sein: es werden 20% von  $50\mu\text{M}$  ebenso wie von  $100\mu\text{M}$  oder  $200\mu\text{M}$  CLZ umgesetzt. Das deutet darauf hin, dass Diffusionsprozesse beteiligt sind bzw. die Aufnahme von CLZ in die Zelle konzentrationsabhängig ist (z.B. nur 20% in die Zelle gelangt oder sie wieder verlassen). Vermutlich führen Induktionsprozesse dazu, dass bei höherem Substratangebot absolut gesehen mehr umgesetzt werden kann.

Der Umsatz beträgt am 2. Tag noch um 5% ( $4,1 \pm 2,7\%$ ), während am 3. Tag nahezu kein Umsatz ( $0,1 \pm 0,1\%$ ) mehr detektierbar ist.



**Abb. 52: Umsatz von CLZ zu 6-OH-CLZ durch CYP 2E1 in primären Rattenhepatozyten, bestimmt im Überstand (24h-Inkubation) in Abhängigkeit der Kulturdauer; Anzahl der Bestimmungen n=7 für 2-26h; n= 5 für 26-50h und n=3 für 50-74h; (A) Umsatz gegen Substratkonzentration; (B) Umsatz gegen Zeit nach Leberzellentnahme.**

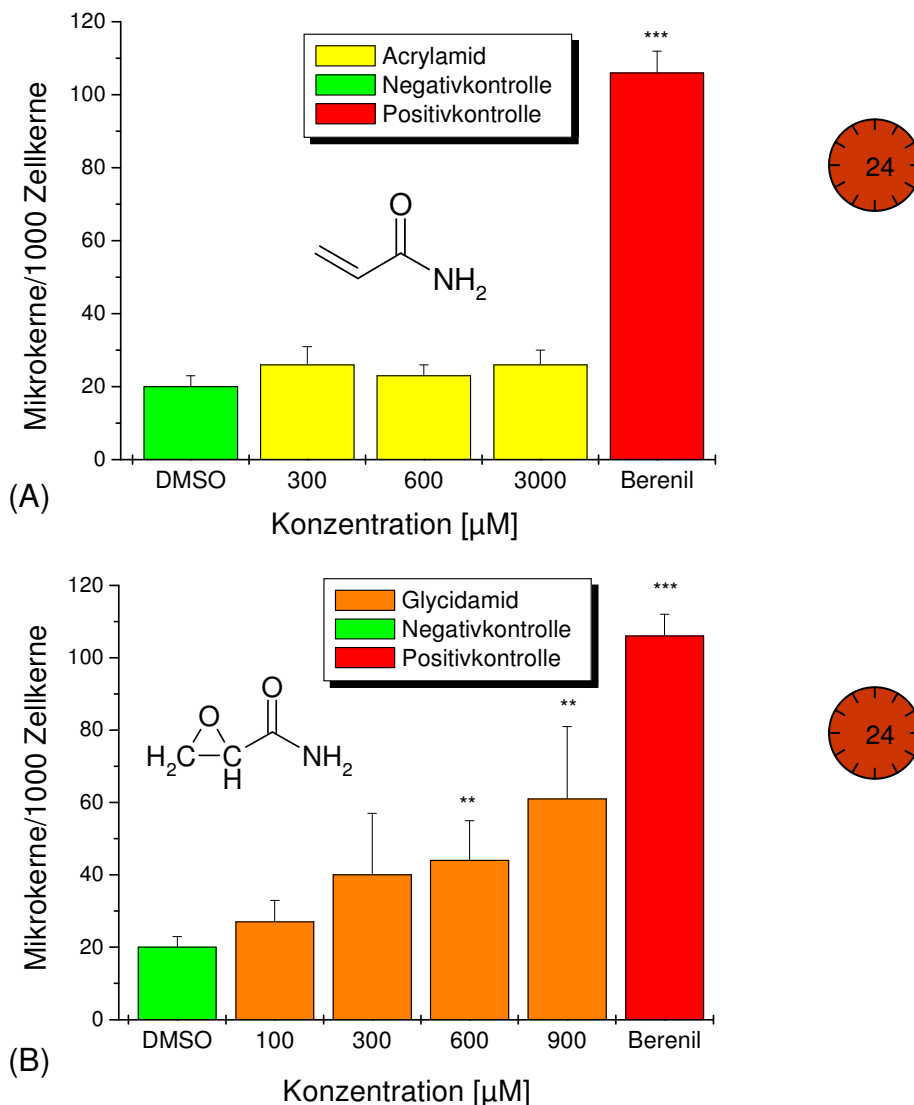
Das Ergebnis bestätigt, dass eine hohe CYP 2E1-Aktivität unter den Kulturbedingungen in den Hepatozyten vorliegt, die aber mit der Zeit nachlässt. Daher wurden die Zellen in den vorliegenden Studien unter kontrollierten Bedingungen bis maximal 50h nach der Entnahme aus dem Organismus verwendet.

## 6. Ergebnisse und Diskussion

### 6.1 Untersuchungen zur Genotoxizität

#### 6.1.1 Induktion von Mikrokernen an V79-Zellen

Anhand der Induktion von Mikrokernen wurde das mutagene Potential von AA und GA an V79-Zellen miteinander verglichen. Der Mikrokernstest ist ein einfach durchführbarer Genotoxizitätstest, bei dem die Anzahl der Mikrokern/1000 Zellkerne [%] nach Substanzinkubation und einer Zellteilung bestimmt wird. Das bedeutet, dass es



**Abb. 53: Mikrokernstest mit 24h A) Acrylamid B) Glycidamid; V79-Zellen; Einzelkernmethode n=3 (für die Kontrolle 1% DMSO n=6, ausreißerbereinigt nach Nalimov); Positivkontrolle Berenil 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Signifikanzebenen \* p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,005; Signifikanzen sind zur Kontrolle berechnet; Versuchsbedingungen: 24h Anwachsen, 24h serumfreie Inkubation, 24h Nachkultivierung.**

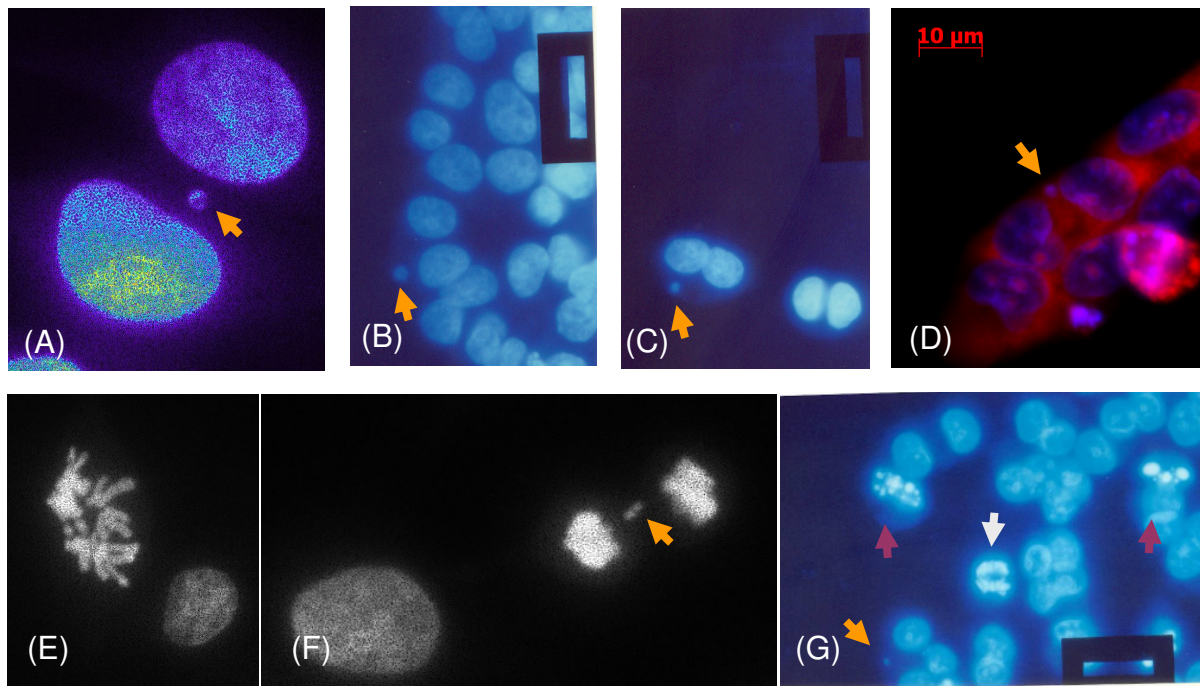
sich bei dem gewählten Endpunkt um eine bereits in den Tochterzellen manifestierte genetische Veränderung handelt. Als Positivkontrolle wird Berenil verwendet, ein Diminazen Azetat und Medikament, welches in der Parasitologie der Veterinärmedizin gegen Protozoen eingesetzt wird. Berenil kann in die DNA interkalieren sowie an die kleine Furche AT-reicher Domänen<sup>32</sup> von DNA-Doppelhelices binden. Berenil bindet beim Parasiten an die AT-reichen Domänen der zyklischen DNA des Kinetoplasten im Mitochondrium (Sands *et al.*, 1985; Wilson *et al.*, 2005). 300µg Berenil pro ml induzierte nach 24h im Durchschnitt etwa 110 Mikrokerne/1000 Zellkerne in V79-Zellen. Die Inkubation erfolgte serumfrei, um möglichst wenig AA mit Serumproteinen abreagieren zu lassen, auch wenn man sich dadurch vom physiologischen Zustand *in vivo* entfernt. Anschließend erfolgte eine Nachkultivierung mit FKS, um die Zellen zur Zellteilung anzuregen und die Entstehung von Mikrokernen zu ermöglichen. Als Wachstumskontrolle wurde ein MTT-Test „Water soluble Tetrazolium salt“ (WST-1-Assay) analog mit AA an V79-Zellen durchgeführt (s. Kapitel 6.2).

Wie in Abb. 53 zu sehen, hat AA bis 3mM und 24h keinen Effekt auf die Mikrokernrate in V79-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Obwohl AA mutagene Eigenschaften *in vivo* besitzt (Dearfield *et al.*, 1995), ist auch bekannt, dass AA selbst sehr langsam mit der DNA reagiert (Solomon *et al.*, 1985). Die direkte Inkubation mit dem Metaboliten GA für 24h erhöht signifikant ab 600µM die Mikrokernrate in V79-Zellen (s. Abb. 53 B). GA wird *in vivo* durch CYP 2E1 gebildet und gilt als das ultimale Kanzerogen (Calleman *et al.*, 1990; Sumner *et al.*, 1999). V79-Zellen sind nicht in der Lage AA mittels CYP 2E1 zu GA zu giften (vgl. Kapitel 5.2). Ohne Toxifizierung induziert AA in diesem Testsystem keine Mikrokerne. Baum und Mitarbeiter (2005) fanden in einer Studie mit 15 Spendern durch Inkubation mit 5mM AA an humanen Lymphozyten (*ex vivo*) eine leichte Erhöhung der Mikrokernfrequenz, welche nicht signifikant war. Durch 1mM GA erhöhte sich die durchschnittliche Mikrokernfrequenz ebenfalls nicht signifikant um das 2,4fache von 2,5‰ auf  $6,1 \pm 4,2\%$  binuklearer<sup>33</sup> Zellen (Baum *et al.*, 2005).

---

<sup>32</sup> AT-reiche Domänen enthalten viel Adenosin und Thymidin

<sup>33</sup> binukleare Zellen enthalten 2 Zellkerne, hervorgerufen durch Cytochalasin B in der Doppelkernmethode (vgl. Kapitel 2.4.2.1.2)

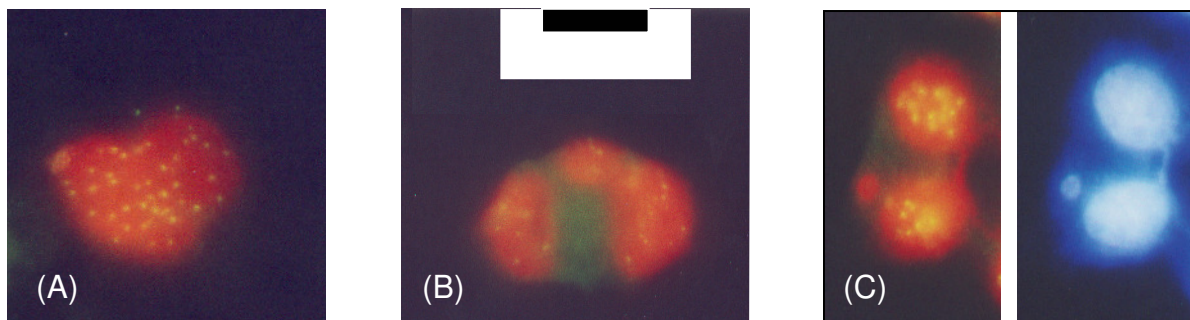


**Abb. 54: Mikrokernelinduktion durch GA in V79-Zellen, verschiedene Darstellungen A-C Doppelkerne (A) Pseudofarben; Meta View Imaging System (B+C) Vergrößerung 1:160 – das Lineal entspricht 5mm auf dem Film (D) mit 10µM-Massstab; Propidiumjodid und DAPI-Färbung (E+F) Mitose; schwarz-weiß (F) Entstehung eines Mikrokernelns, das Chromatin ist stark aufkondensiert (G) nach Pfeilfarbe: violett: apoptotische Körperchen; weiß: Mitose; orange: Mikrokerneln.**

Ein Vorteil des Mikrokerneltests ist, dass man statistisch relevante Mengen einzelner Zellen unter dem Mikroskop betrachtet und weit mehr Informationen als die Mikrokernelrate erhält. Es können Veränderungen in Morphologie, Zellzahl und Anzahl an Zellen, die sich in Mitose befinden, beobachtet werden (s. Abb. 54 G). In Kapitel 6.2 sind mikroskopische Aufnahmen zur Apoptoseinduktion von AA zu finden. Wie aus der Wachstumskontrolle und der Morphologie hervorgeht, kommt es 24h nach 24stündiger AA-Inkubation mit 6mM zu einem massiven Viabilitätsverlust und Auftreten apoptotischer Körperchen. Von genotoxischen Substanzen hoher Zytotoxizität, die „nur“ Hochdosiseffekte zeigen, geht im Allgemeinen ein geringeres krebsauslösendes Risiko aus: V79-Zellen scheinen abzusterben, bevor ein genotoxischer Schaden durch AA sich in Form einer erhöhten Mikrokernelfrequenz manifestieren kann.

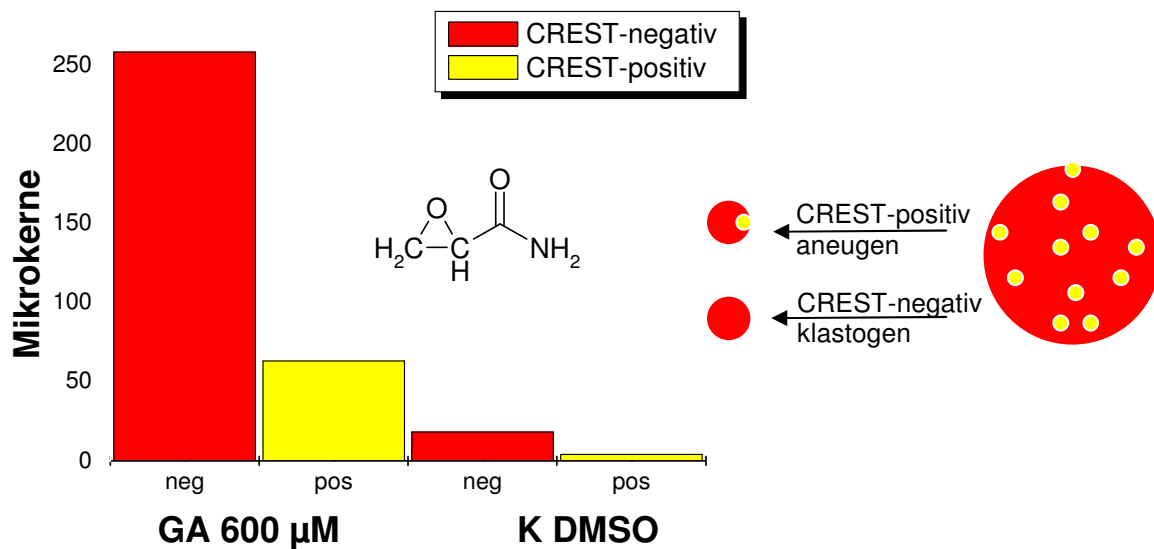
### 6.1.1.1 Indirekte Immunofluoreszenzfärbung

Genotoxische Substanzen, welche Mikrokerne induzieren, können weiter unterteilt werden in Aneugene und Klastogene. Aneugene schädigen Spindel und/oder Kinetochor. Spindelgifte wie Colchicin führen zu Chromosomenfehlverteilungen und damit Verlust oder Gewinn ganzer Chromosomen sowie Chromosomensätze (Aneuploidie und Polyploidie). Klastogene (wie z.B. das Mitomycin) sind chromosomenbrechende Agenzien und führen meist zu azentrischen Fragmenten. Eine Möglichkeit zu ihrer Unterscheidung ist das Anfärben der Kinetochore (Zentromere). Dazu wird im Anschluß an einen Mikrokerntest (nach Mikrokernelinduktion) die Zellmembran permeabilisiert, mit Anti-Zentromer-Antikörpern (CREST-Antikörper) inkubiert und mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelten Zweitantikörpern sichtbar gemacht.



**Abb. 55: Immunofluoreszenzfärbung;**  
**(A+B) Propidiumjodid- und CREST-Färbung, Blauanregung**  
**(B) CREST-positiver Mikrokernel mit CREST-Signal**  
**(C) CREST-negativer Mikrokernel ohne CREST-Signal;**  
**Propidiumjodid- und CREST-Färbung im Vergleich zur DAPI-Gegenfärbung;**  
**1:160 Größenvergleich Lineal  $\pm$  5mm auf dem Film**

CREST-positive Mikrokerne enthalten Chromosomen oder -bruchstücke mit angefärbtem Kinetochor (s. Abb. 55 B). CREST-negative Mikrokerne erscheinen vollständig rot und enthalten nur azentrische Fragmente ohne Kinetochor (s. Abb. 55 C). Daher sind CREST-negative Mikrokerne das Resultat klastogener Substanzen und die Induktion überwiegend CREST-positiver Mikrokerne wird auf Aneugene zurückgeführt. Wie man ebenfalls an Abb. 55 erkennen kann, handelt es sich bei Mikrokerneln klastogener Natur meistens um kleinere und bei CREST-positiven um größere. Aneugene sind für Organismen in den meisten Fällen extrem toxisch, können aber Schwellenwerte aufweisen, was für genotoxische Substanzen allgemein nicht gilt.



**Abb. 56:** Ergebnis der CREST-Färbung: Anteil CREST-negativer zu CREST-positiven Mikrokerneln in V79-Zellen nach Inkubation mit 600µM Glycidamid für 24h im Vergleich zu un-behandelten Zellen (Lösungsmittelkontrolle).

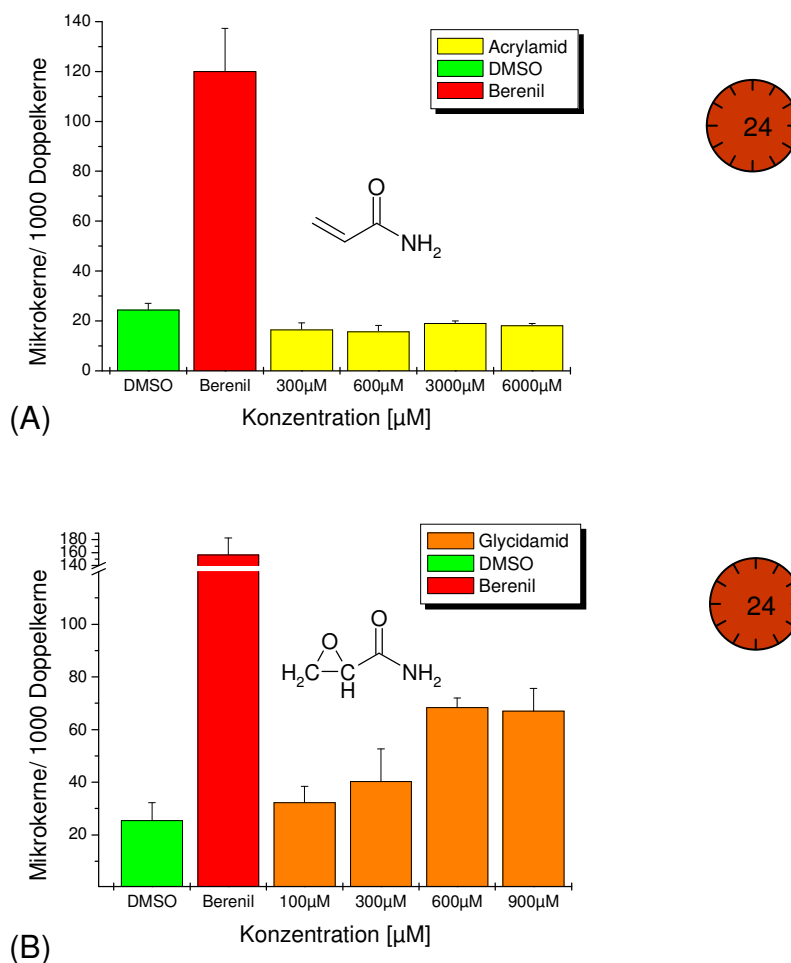
Von den mikroskopisch untersuchten, spontan entstandenen Mikrokerneln sind in der Kontrolle 81,8% CREST-negativ und 18,2% CREST-positiv. Nur die Anzahl, nicht aber das Verhältnis ändert sich nach 24-stündiger Inkubation mit 600µM GA: 80,4% CREST-negative zu 19,6% CREST-positiven (s. Abb. 56). Man kann davon ausgehen, dass von den zusätzlich durch GA induzierten Mikrokerneln 4x mehr CREST-negative als CREST-positiv sind. GA (600µM, 24h) hat damit zu 4/5 klastogenen Effekt auf V79-Zellen, was für einen klastogenen Mechanismus spricht. In der Kontrolle waren nur wenige Mikrokerneln zu finden und daher ist die statistische Absicherung für die Kontrolle gering. Da AA selbst in V79-Zellen zu keiner erhöhten Mikrokernelnrate führt, kann nur von der Wirkung des GA auf die Wirkung der Mutterkomponente AA geschlossen werden: Der Hinweis auf den überwiegend klastogenen Effekt des GA ist konsistent mit der klastogen beschriebenen Wirkung von AA (Dearfiel *et al.*, 1995), welches zu GA *in vivo* aktiviert wird. In der Literatur wird AA überwiegend als klastogen beschrieben. Nach Shiver und Mitarbeitern (1992) beeinflusst AA *in vitro* weder Polymerisation noch Depolymerisation von Mikrotubuli, welche am Aufbau des Spindelapparates beteiligt sind und für einen aneugen Mechanismus sprechen würden. Unterstützt wird das Resultat der sehr spezifischen Immunofärbung mittels humaner Antikörper aus CREST-Patienten gegen Zentromere durch Hinweise aus dem Mikrokernelntest. Es ist bekannt, dass Aneugene, welche zu Chromoso-



menfehlverteilungen führen können, größere Mikrokerne verursachen als Klastogene, deren Mikrokerne nur aus Chromosomenbruchstücken hervorgehen. Im Mikrokerntest waren mikroskopisch überwiegend sehr kleine Mikrokerne nach 24stündiger Inkubation mit bis zu 900 $\mu$ M GA festzustellen, welche sehr selten an 1/3 des DNA-Kerndurchmessers heranragten.

### 6.1.1.2 Doppelkernmethode

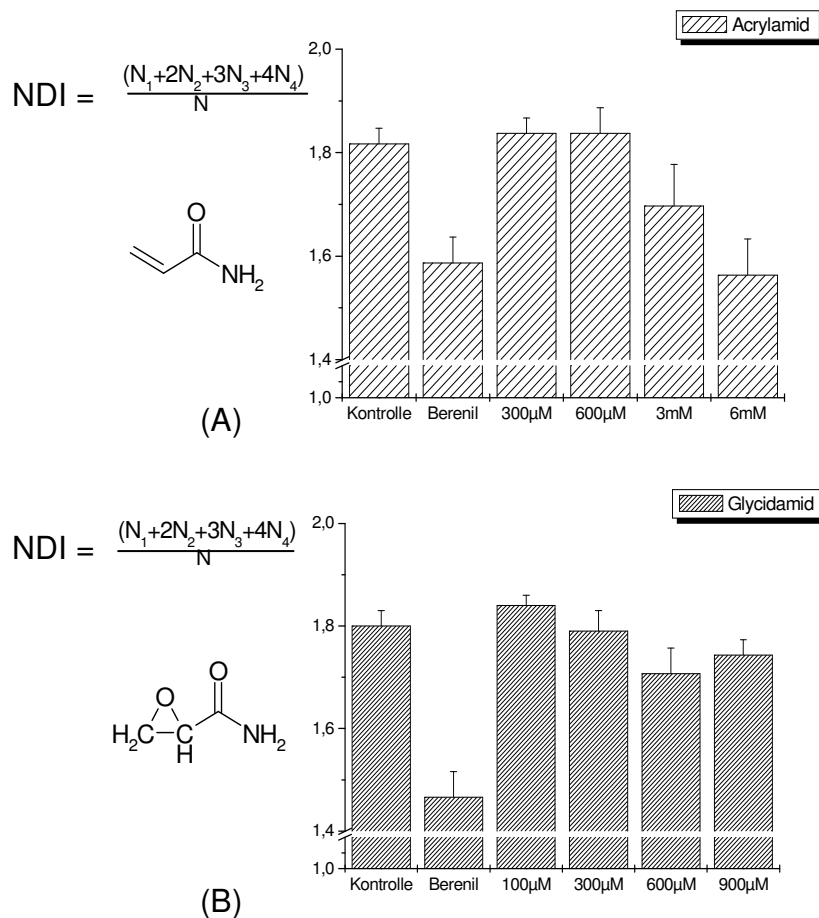
Der Mikrokerntest wurde anfänglich nach der Doppelkernmethode durchgeführt. Cytochalasin B verhindert die Trennung des Zytoplasmas nach Zellkernteilung.



**Abb. 57: Mikrokerntest (Doppelkernmethode) n=3 Mikrokernefrequenz/% binuklearer Zellen durch (A) AA und (B) GA an V79-Zellen, 24h Inkubation.**

Die Doppelkernmethode mit Cytochalasin B als Zytokineseinhibitor wird gewöhnlich an humanen Lymphozytenkulturen verwendet und für diese empfohlen (Kirsch-Volders *et al.*, 2000).

Als Wachstumskontrolle wird der NDI<sup>34</sup> berechnet (s. Abb. 58).



**Abb. 58: Nuclear division index (NDI) – Wachstumskontrolle an V79-Zellen im Mikrokerntest nach Doppelkernmethode (vgl. Abb. 53), Positivkontrolle Berenil 300µg/ml, n=3,  $N_i$  mit  $i=\{1,2,3,4\}$ ,  $N_i$ =Anzahl der Zellen mit  $i$  Kernen (A) Acrylamid und (B) Glycidamid.**

Die Resultate zur Mikrokernelinduktion durch AA und GA sind mit und ohne Cytochalasin B-Behandlung übereinstimmend (vgl. Abb. 53 und 57). V79-Zellen sind im Wachstum schnell und unempfindlich. Eine zusätzliche Behandlung mit Cytochalasin B scheint an V79-Zellen keinen größeren Vorteil zu bringen. Die Methode verbessert nicht die Detektion Chemikalien-induzierter Mikrokerne an kontinuierlich wachsenden Zellen (Matsushima *et al.*, 1999). Die Doppelkernmethode ermöglicht allerdings die Zuordnung eines oder mehrerer Mikrokerne zu einer Zellteilung. Dadurch, dass keine Mikrokerne von Einzelkernen gezählt werden, entfällt der Hintergrund, der nicht auf die Substanz zurückzuführen ist – nur Mikrokerne, die nach Substanzinkubation entstanden sind, werden gezählt. Bei der Doppelkernmethode ist die Wachstumskontrolle inbegriffen, der Arbeitsaufwand durch die Zahl der zu zählenden Kerne

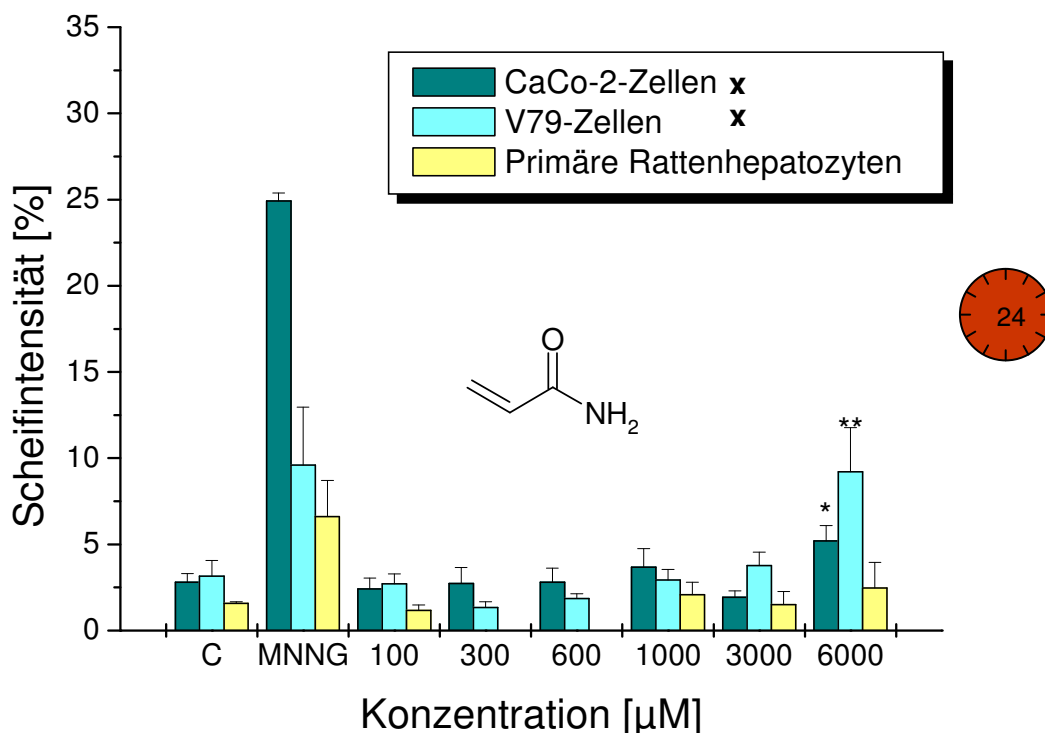
<sup>34</sup> NDI: Nuclear division index

und Inkubation mit Cytochalasin B wird jedoch erhöht. In der Einzelkernmethode wird der Einfluss durch Cytochalasin B vermieden. Der Verzicht auf eine 24stündige Nachkultivierung war möglich und hat zu vorliegenden Ergebnissen geführt, die mit den erhaltenen Resultaten nach Doppelkernmethode vergleichbar sind. Hierbei ist von Vorteil, dass AA und GA auf V79-Zellen einen wachstumsstimulierenden Effekt haben. AA setzt einen Proliferations-Stimulus im WST-1-Assay und Sulforhodamin B (SRB)-Test an V79-Zellen (Elschenbroich, 2006). Auch GA verstärkt an menschlichen Brustzellen im Microarray die Wachstumssignale (Clement, HEATOX, 2006).

### 6.1.2 Induktion von DNA-Strangbrüchen an Säugerzellen

Der Genotoxizität, die die Substanzen in Mutagenitätstests wie im Mikrokerntest dieser Arbeit oder Amestest in der Literatur zeigen, sollten messbare DNA-Schäden vorangegangen sein. Zur Bestätigung und zum Vergleich des festgestellten genotoxischen Potentials wird im Folgenden ein Indikatorrest für Genotoxizität, der Comet-Assay, durchgeführt. Als mutagene Referenzsubstanz wird *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitroso-guanidin (MNNG) verwendet. Ein Vorteil beim Comet-Assay ist u.a. die Durchführung am Zellsystem und die damit verbundenen Optionen, wie den Einfluss zellspezifischer Unterschiede zu erfassen.

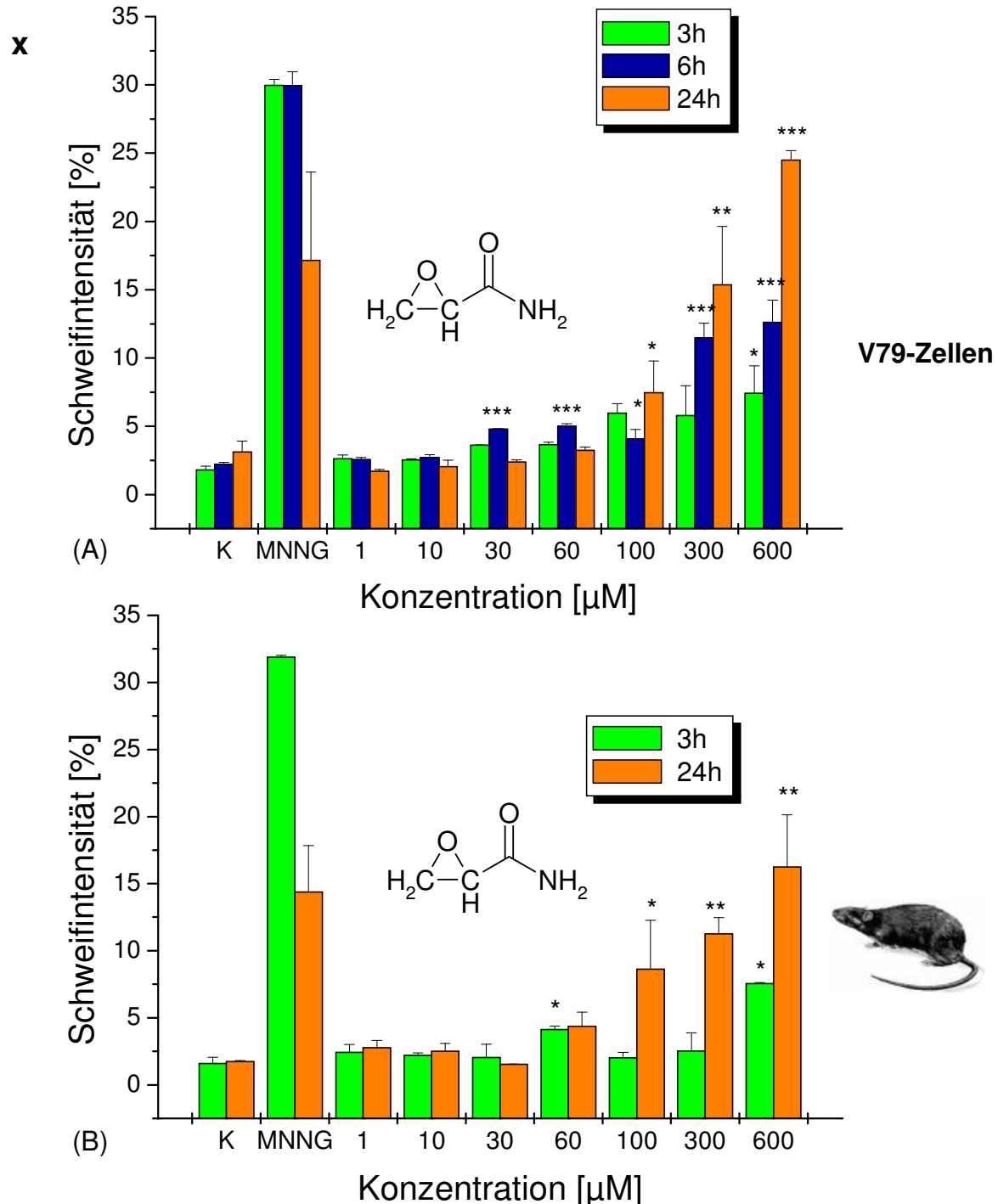
In Vorarbeiten (s. Abb. 59) wurde gezeigt, dass von drei getesteten Zelllinien (CaCo-2-Zellen, V79-Zellen und primäre Rattenhepatozyten) V79-Zellen am sensitivsten auf AA nach 24h im Comet-Assay reagieren (Füller, 2003; Puppel *et al.*, 2005).



**Abb. 59:** Induktion von DNA-Strangbrüchen durch 24h Acrylamid an CaCo-2-Zellen und V79-Zellen (Füller, 2003) im Vergleich zu primären Rattenhepatozyten. MNNG: *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (10 µM) wurde als Positivkontrolle verwendet; n≥3. Die Signifikanz beziehen sich auf die entsprechende Lösungsmittelkontrolle C mit \* p < 0.05; \*\* p < 0.01 (nach Daten von Puppel *et al.*, 2005 und x: Füller, 2003).

Die 24h-Inkubation mit AA wird bis 6mM von primären Rattenhepatozyten toleriert. Marginale Effekte hat AA auf die DNA-Strangbruchrate in CaCo-2- und V79-Zellen.

Im Vergleich zu AA induziert GA nach 24h ab 100µM DNA-Strangbrüche und diese sowohl in V79-Zellen als auch in primären Rattenhepatozyten (s. Abb. 60). Verglichen mit dem Mikrokerntest zeigt der Comet-Assay eine ähnliche Sensitivität gegenüber AA und GA.



**Abb. 60:** Zeit- und konzentrationsabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Glycidamid. A: V79-Zellen (Füller, 2003) B: Primäre Rattenhepatozyten; MNNG: *N*-Methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (10 µM) wurde als Positivkontrolle verwendet;  $n \geq 3$ . Die Signifikanzen beziehen sich auf die entsprechende Lösungsmittelkontrolle K mit \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  und \*\*\* =  $p < 0.005$ . (Graphik in Puppel *et al.*, 2005 mit x: Daten von Füller, 2003).

Die Inkubation für 3h mit GA beeinflusst kaum die DNA-Integrität; erst ab 600µM ist die DNA-Schweifintensität in beiden Zelllinien signifikant erhöht. Nach 6h Inkubation wurden signifikant erhöhte Schweifintensitäten ab 30µM an V79-Zellen detektiert. MNNG führte nach Inkubationen von 3-24h zu signifikanten DNA-Schäden. Die 24stündige Inkubation mit GA induzierte konzentrationsabhängig ab 100µM an V79-Zellen und primären Rattenhepatozyten DNA-Strangbrüche.

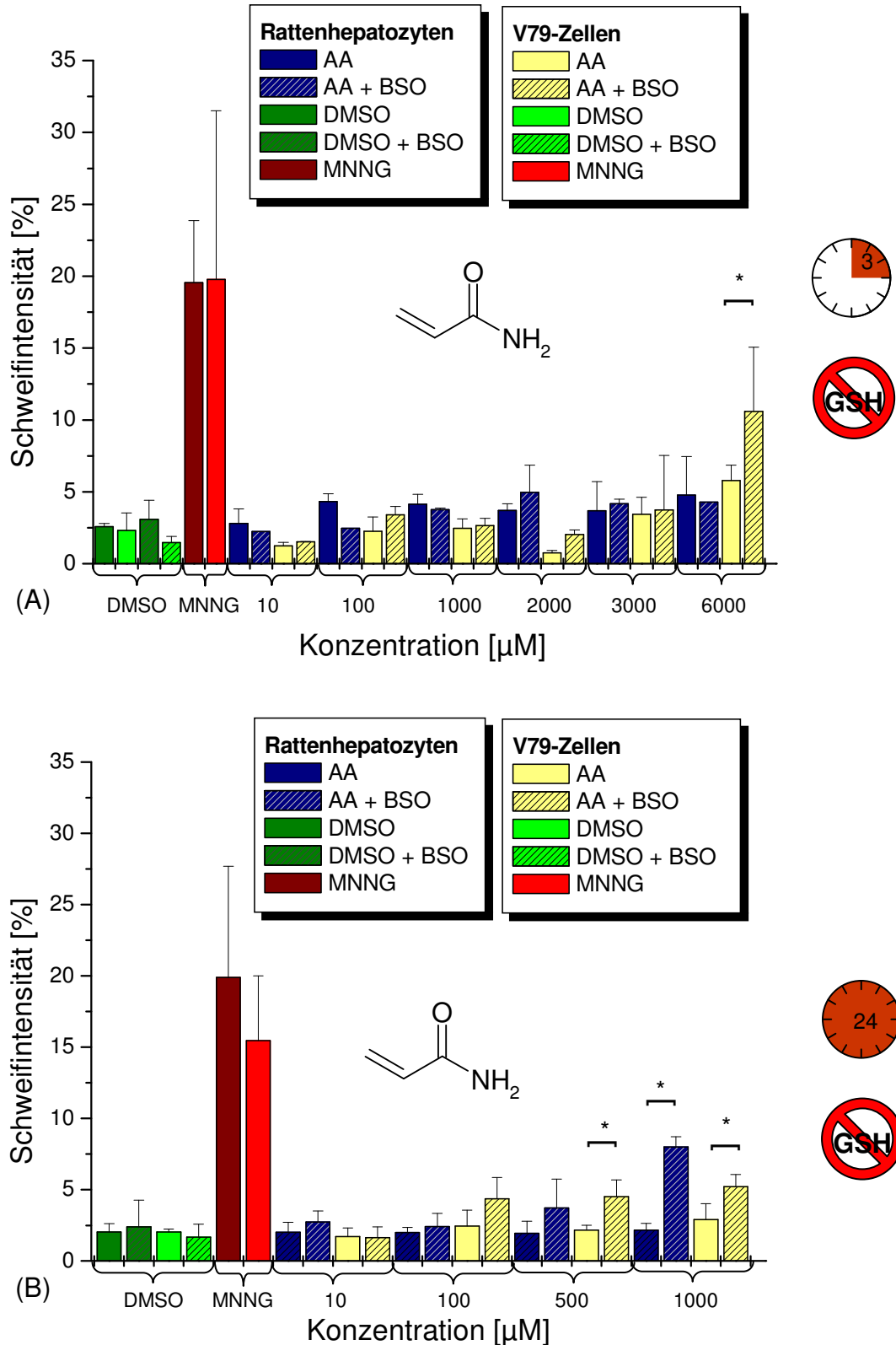
Nun sollte der DNA-strangbrechende Effekt von AA und GA an Säugerzellen unterschiedlicher CYP 2E1-Expression untersucht werden. Nach CYP 2E1-Nachweis (vgl. Kapitel 5.2) können primäre Rattenhepatozyten als CYP 2E1-kompetente Zellen gegenüber CYP 2E1-armen V79-Zellen und CaCo-2-Zellen betrachtet werden. Daher wurden im Folgenden primäre Rattenhepatozyten und V79-Zellen als Testsysteme gewählt. Es zeigte sich, dass AA zu einem DNA-strangbrechenden Effekt ab 6mM und 24h an V79-Zellen führt. Im Gegensatz dazu blieb die DNA-Integrität der primären Rattenhepatozyten bis 6mM unbeeinflusst (s. Abb. 59). Eine hohe CYP 2E1-Expression und -Aktivität ist demnach unter den gewählten Bedingungen nicht der einzig relevante Faktor für die genotoxische Wirkung von AA an Säugerzellen. Nun unterscheiden sich die Zelllinien nicht nur durch unterschiedliche CYP 2E1-Expression.

Daher wurden weitere zelluläre Faktoren untersucht, die einen Einfluss auf das DNA-schädigende Potential von AA haben könnten. Es wäre denkbar, dass Rattenhepatozyten aufgrund hoher GSH-Spiegel mehr AA entgiften<sup>35</sup> können als V79-Zellen. Wie bereits bekannt ist, spielt GSH neben der Detoxifizierung vor allem elektrophiler Xenobiotika in der Phase II des Fremdstoffmetabolismus auch eine bedeutende Rolle für das Abfangen reaktiver Sauerstoffspezies bzw. freier Radikale. Im Folgenden wurde der Einfluss des GSH-Spiegels auf das DNA-schädigende Potential von AA untersucht.

V79-Zellen stellen dabei ein gutes System zur Untersuchung der Muttersubstanz dar, da sie den Metaboliten GA wegen des CYP 2E1-Mangels nicht bilden können. Durch GSH-Depletion könnten V79-Zellen für die genotoxische Wirkung sensitiviert werden und der gemessene Effekt aufgrund des CYP 2E1-Mangels, der Unfähigkeit AA zu GA zu wandeln, eindeutig auf AA zurückgeführt werden.

---

<sup>35</sup> Entgiften durch GST-vermittelte Konjugation oder Inaktivieren durch Michael-Addukt-Bildung



**Abb. 61:** Effekt der GSH-Depletion durch BSO-Behandlung auf das DNA-strangbrechende Potential von Acrylamid an primären Rattenhepatozyten und vergleichend an V79-Zellen. Die Zellen werden für 24h mit 1mM BSO vorbehandelt und dann in Anwesenheit von BSO mit AA inkubiert. (A) 3h. (B) 24h. Als Positivkontrolle wurde MNNG: *N*-Methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (10 $\mu\text{M}$ ) eingesetzt. Die Daten präsentieren die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche. Jeder Versuch wurde als Duplikat durchgeführt (\* $p < 0,05$ ).

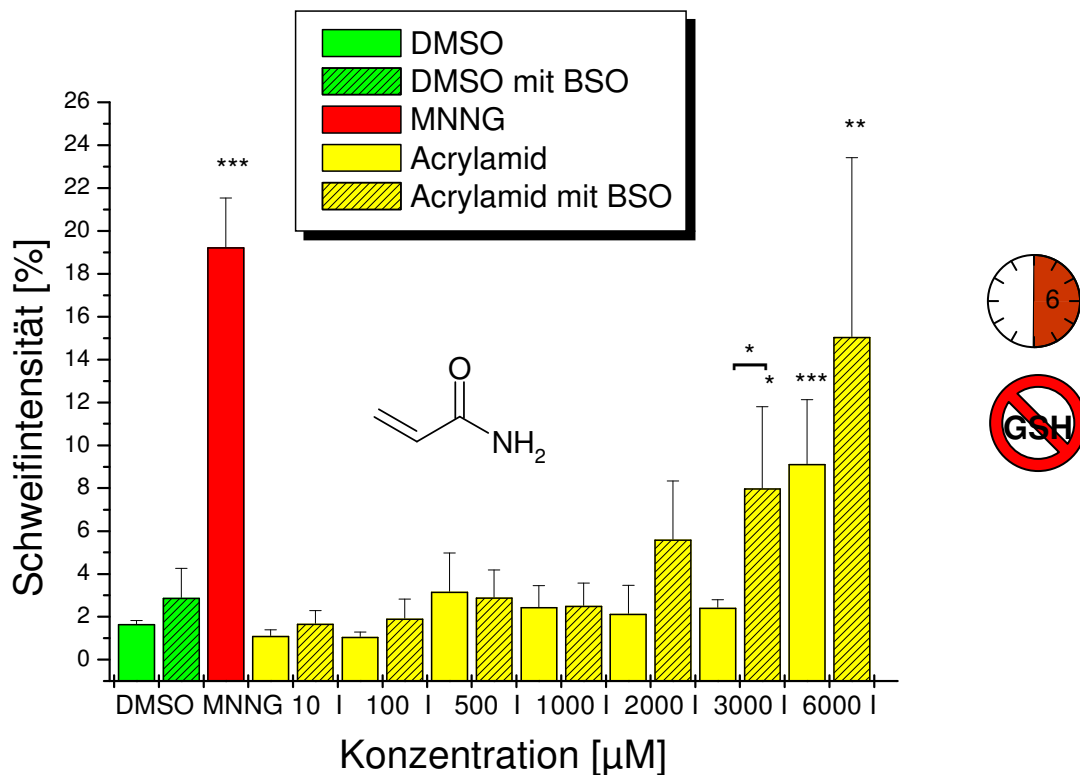


Abb. 62: Effekt der GSH-Depletion durch BSO-Behandlung auf das DNA-strangbrechende Potential von AA an V79-Zellen. Die Zellen werden für 24h mit 1mM BSO vorbehandelt und dann in Anwesenheit von BSO mit AA für 6h inkubiert. Als Positivkontrolle wurde MNNG: *N*-Methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (10µM) eingesetzt. Die Lösungsmittelkonzentration betrug 0,1% DMSO. Es wurden die Signifikanzen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle und (eckige Klammer) BSO-behandelter zu BSO-unbehandelten Zellen angegeben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ).

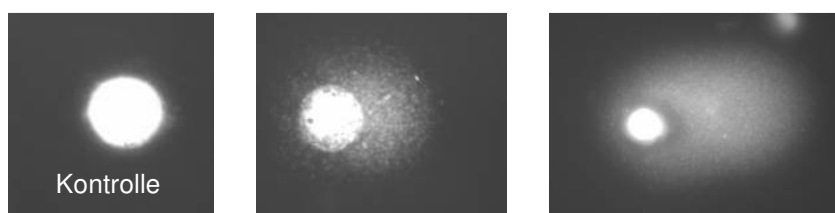


Abb. 63: Unterschiedliche Schweifintensitäten je nach Schädigung der DNA unter GSH-Depletion; von links nach rechts Lösungsmittel, mittlere und hohe Acrylamidkonzentration nach 6h an V79-Zellen.

Unter GSH-Depletion tolerieren Rattenhepatozyten AA bis 6mM und 3h ohne signifikanten Effekt auf die DNA-Integrität oder die Viabilität der Zellen (s. Abb. 61 A). Trotz des *in vitro* zugeführten Ungleichgewichts von Phase I und Phase II-Enzymen zeigt die Zelle keinen erhöhten genotoxischen Schaden. V79-Zellen reagieren sensibler bei 3h Inkubation und zeigen unter den gleichen Versuchsbedingungen in der höchsten Konzentration ab 6mM unter GSH-Depletion einen signifikanten DNA-



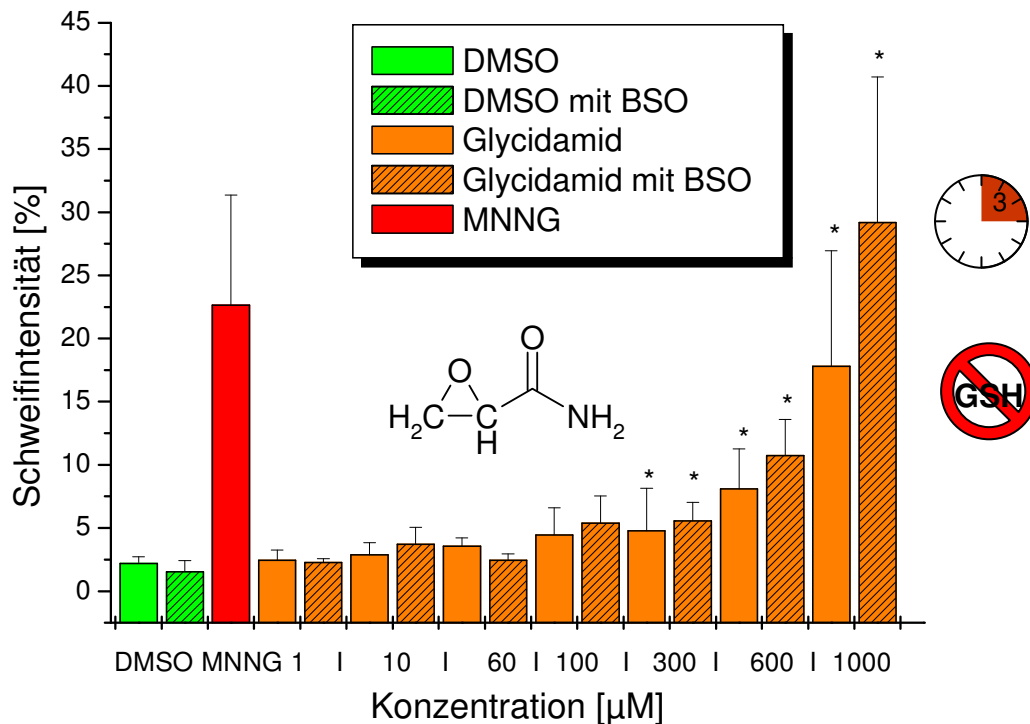
Schaden. Ab 24h induziert AA ab 1mM unter GSH-Depletion auch an den primären Rattenhepatozyten DNA-Strangbrüche, während 1mM ohne BSO toleriert wird. Allerdings kommt es unter GSH-Depletion ab 1,25mM AA nach 24h zu einem dramatischen Verlust der Zellviabilität.

Wie in Abb. 61 (B) zu sehen, führt AA nach 24h ab 500µM zu einer signifikanten leichten Erhöhung der DNA-Strangbruchrate von BSO behandelten gegenüber unbehandelten V79-Zellen. Die Ergebnisse nach 24h bezüglich der DNA-Schweifintensitäten, aber auch der Zellviabilität sind in beiden Zelltypen vergleichbar.

Abb. 62 und 63 zeigen den Effekt durch Glutathion-Depletion auf das DNA-strangbrechende Potential von AA nach 6h an V79-Zellen zum Vergleich mit a) 3h und 24h und b) mit dem Nachweis von DNA-Addukten, die nach 6h AA/GA bestimmt wurden. Der Versuch wurde entsprechend dem Mikrokerntest und DNA-Adduktversuch an V79-Zellen durchgeführt und wird im Anschluß an die DNA-Addukt-Ergebnisse des Kapitels 6.1.3 nochmals mit diesen diskutiert. 6h AA (0,1% DMSO) führt an V79-Zellen in der höchsten Konzentration ab 6mM zu einer Erhöhung der Schweifintensitäten im Comet-Assay. Unter GSH-Depletion beginnt der konzentrationsabhängige signifikante DNA-Schaden nach 6h-Inkubation ab 3mM AA; nach 3h war eine signifikante Erhöhung des DNA-Schadens ab 6mM AA unter GSH-Depletion zu detektieren.

Nicht nur BSO reduziert den GSH-Gehalt in Zellen. Auch in der Ernährung gibt es u.a. GSH-depletierende Substanzen. Zu diesen Substanzen gehört z.B. Ethanol (Vogt und Richie, 2007). Die gemeinsame Aufnahme von beispielsweise Ethanol und AA könnte die Konzentration von AA erniedrigen, die zu nachteiligen Effekten für die Zelle führt. Ethanol könnte einerseits die Entgiftung von AA durch GSH-Depletion hemmen und andererseits durch Induktion von CYP 2E1 möglicherweise die Aktivierung zum reaktiveren Metaboliten GA antreiben.

Unter GSH-Depletion zeigte sich eine leichte Erhöhung des DNA-strangbrechenden Potentials von AA. Dazu im Vergleich erhöhen sich auch durch Kombination von GA und BSO dieselben Schadwirkungen (s. Abb. 64). Der GSH-Spiegel scheint zudem Einfluss auf die Zellviabilität zu nehmen: entweder durch Erhöhung der DNA-Strangbruchrate oder durch Erhöhung zytotoxischer Effekte von AA (vgl. Kapitel 6.2).



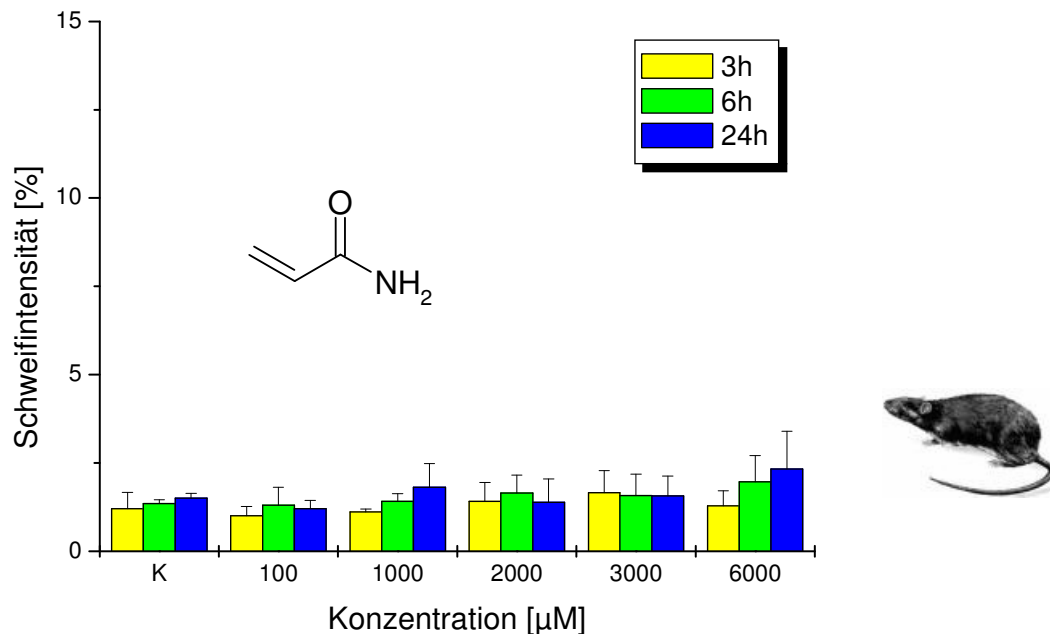
**Abb. 64:** Effekt der GSH-Depletion durch BSO-Behandlung auf das DNA-strangbrechende Potential von Glycidamid an V79-Zellen. Die Zellen werden für 24h mit 1mM BSO vorbehandelt und dann in Anwesenheit von BSO mit GA für 3h inkubiert. Als Positivkontrolle wurde MNNG: *N*-Methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (10µM) eingesetzt. Die Signifikanzen beziehen sich auf den Unterschied von Glycidamid und Lösungsmittelkontrolle mit \* $p < 0,05$ ;  $n = 3$ .

In V79-Zellen induziert der Metabolit ab 600µM und 24h signifikant erhöhte Mikrokernraten. Wie in der Abb. 63 grafisch dargestellt ist, erhöht GA (3h) an V79-Zellen ab 600µM ohne BSO-Behandlung, mit bereits ab 100µM, die DNA-Strangbruchrate.

Die Daten des Comet-Assays an V79-Zellen bestätigen die Ergebnisse des Mikrokernassays (vgl. Kapitel 6.1.1). AA induziert bis 24h an V79-Zellen weder DNA-Strangbrüche noch Mikrokernrate. GA erhöht ab 600µM und 24h signifikant die Mikrokernrate sowie ab 600µM und 6h signifikant die DNA-Strangbruchrate in V79-Zellen (bzw. ab 100µM und 24h nach Füller, 2003).

Die Untersuchung genotoxischer Effekte durch AA unter GSH-Depletion bedingt eine 24stündige Vorinkubation mit BSO. Die Ergebnisse zur CYP 2E1-Expression und Aktivität (vgl. Kapitel 5) haben ergeben, dass primäre Rattenhepatozyten besser direkt nach der Leberperfusion als zu einem späteren Zeitpunkt der Kultur Chlorzoxazon (stellvertretend für AA) umsetzen können. Daher wurden für den in Abb. 65 dargestellten DNA-strangbrechenden Effekt durch AA primäre Rattenhepatozyten unmittelbar nach ihrer Isolation verwendet. Die Verkürzung der Kultivierungsdauer vor der AA-Inkubation und damit die erhöhte CYP 2E1-Aktivität macht sich nicht in der

DNA-Strangbruchrate durch AA bemerkbar. Bis 24h und 6mM beeinflusst AA nicht die DNA-Integrität im Comet-Assay. Diese Daten implizieren, dass eine hohe CYP 2E1-Expression und -Aktivität nicht direkt mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber AA korreliert.



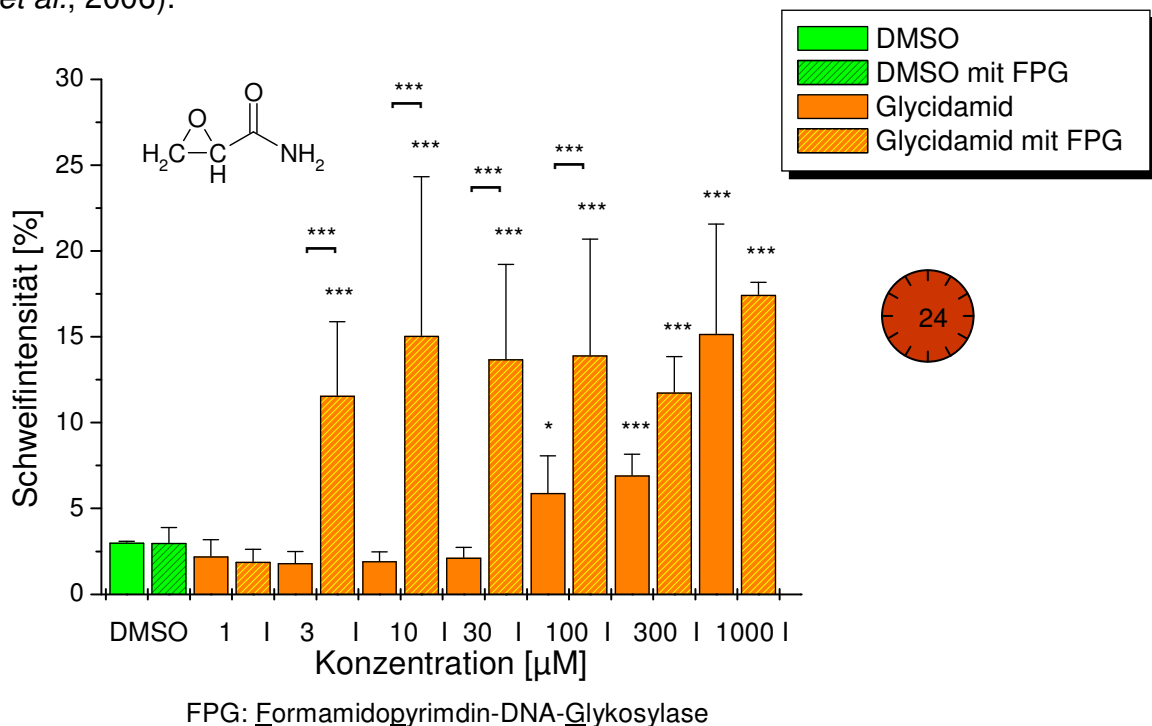
**Abb. 65:** Das zeitabhängige DNA-strangbrechende Potential von AA an primären Rattenhepatozyten. Die Zellen werden nach dem Ablegen (2h im ITS-Medium) für 3h, 6h oder 24h mit AA inkubiert; n=3.

Klauning und Kamendulis fanden 2005 mittels Comet-Assay einen Anstieg des DNA-Schadens durch AA in Ziel-Geweben, nicht aber in anderen wie z.B. der Leber von F344-Ratten. Ziel-Gewebe sind bezogen auf AA solche Gewebe, die von der Wirkung des AAs erreicht werden bzw. in denen AA im Tierversuch Tumore verursacht. Auch Maniere und Mitarbeiter (2005) bestätigen diese Wechselbeziehung. Sie folgerten, dass der DNA-Schaden, weil DNA-Migration durch AA ausschließlich in den Geweben bzw. Organen gefunden wurde, die mit der von AA bekannten Organspezifität für die Kanzerogenese in Ratten korrelieren, ein geeigneter Biomarker für Exposition und Genotoxizität von AA darstellt. Diese Beobachtungen spiegeln sich in den Ergebnissen dieser Arbeit wieder. In primären Rattenhepatozyten, einem Nicht-Ziel-Gewebe, verursacht AA keinen DNA-Schaden im Comet-Assay. Es könnte neben dem genotoxischen Effekt, der hauptsächlich von GA auszugehen scheint, möglicherweise ein hormonmodulierender Effekt von AA eine Rolle für die Kanzerogeni-

tät der endokrin sensitiven Ziel-Gewebe spielen (Tyl und Friedman, 2003; Shiver *et al.*, 1992).

### FPG-sensitive DNA-Schäden durch Glycidamid an primären Rattenhepatozyten

Bisher gibt es wenige Daten zur Abschätzung des genotoxischen Potentials von GA und dem zugrunde liegenden Mechanismus. Die Kombination von BSO-Behandlung und AA/GA könnte mit einem erhöhten oxidativen Stress für die Zelle verbunden sein und dadurch zu mehr DNA-Schäden führen, als im vorangegangenen Kapitel gezeigt. FPG ist ein DNA-Reparaturenzym, dessen Hauptfunktion das Herausschneiden oxidierter Basen wie 8-oxo-dG ist. Aber auch *N7*-Gua-Addukte des Guanins, wie sie von GA mit Guanin gebildet werden, führen zu Alkyl-FAPy-G Läsionen und stellen ebenfalls ein Substrat für FPG dar. Durch FPG für den Comet-Assay zusätzlich erkennbar gemachte DNA-Schäden könnten auf oxidative Schäden und/oder *N7*-Gua-Addukte zurückzuführen sein. Hier liegt die Möglichkeit, durch FPG die Sensitivität zur Detektion genotoxischer Aktivität von GA zu erhöhen (Thielen *et al.*, 2006).



**Abb. 66: Comet-Assay; primäre Rattenhepatozyten, Glycidamid ± FPG; (nach 2h) 24h-Inkubation; die Signifikanz sind in Bezug zur Kontrolle und zu FPG-unbehandelten Zellen angegeben mit \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,005$ .**

Wie in Abb. 66 dargestellt ist, wird durch 30minütige FPG-Behandlung ein hochsignifikanter DNA-Schaden durch GA an primären Rattenhepatozyten ab 3µM GA nach 24h-Inkubation feststellbar. Im Vergleich dazu führt GA im Comet-Assay ohne FPG

erst ab 100µM zu einem signifikanten konzentrationsabhängigen DNA-Schaden. GA scheint demnach an primären Rattenhepatozyten in wesentlich (~100x) niedrigeren Konzentrationen als bisher angenommen zu genotoxischen Effekten zu führen, vor allem zu *N7*-Gua-Addukten. Der in niedrigen GA-Konzentrationen signifikante Unterschied in der DNA-Schweifintensität FPG-behandelter und unbehandelter Zellen, nimmt ab 300µM ab. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Zellen durch höhere Konzentrationen vermehrt reparieren oder der DNA-Integritätsverlust bei etwa 20% Schweifintensität ein Maximum erreicht hat. Eine Arbeitsgruppe stellte eine erhöhte Schweifintensität ab 4h und 10µM von GA unter FPG-Behandlung im Comet-Assay an humanen Lymphozyten fest (Thielen *et al.*, 2006). Dem gegenüber detektierten sie einen signifikanten Schaden ab 4h und 300µM GA ohne FPG-Behandlung. Die Erhöhung der DNA-Schäden bei niedrigeren Konzentrationen an GA durch einen um FPG-Behandlung erweiterten Comet-Assay kann durch vorliegende Resultate auch an primären Rattenhepatozyten bestätigt werden. Thielen *et al.* (2006) zeigten, dass das FPG-Enzym die durch GA verursachten AP-Stellen und Fapy-G Läsionen erkennt und diese Läsionen in zusätzliche DNA-Strangbrüche konvertiert (vgl. Kapitel 2.6.2).

### 6.1.3 DNA-Addukte

DNA-Addukte spielen eine wesentliche Rolle in der Kanzerogenese durch AA und GA. Segerbäck und Mitarbeiter (1995) identifizierten nach Inkubation von AA mit isolierter DNA und S-9-Mix das *N7*-Gua-Addukt als Hauptaddukt. In Anlehnung an die Methode nach Segerbäck und Mitarbeitern (1995) konnte in einem Vorversuch gezeigt werden, dass durch 24h-Inkubation von Kalbsthymus-DNA mit GA konzentrationsabhängig am *N7* des Guanins Addukte gebildet werden. Ziel der folgenden Versuche war der Nachweis der konzentrationsabhängigen Adduktbildung in Säugerzellen als initiiertes Ereignis für Mikrokerninduktion und DNA-Strangbrüche. Der Versuch wurde an der gut charakterisierten V79-Zelllinie durchgeführt. Die V79-Zellen wurden für 6h mit GA inkubiert, die DNA anschließend isoliert und die Addukte mittels neutraler thermischer Hydrolyse von der DNA gelöst. Danach wurden die *N7*-Gua-Addukte über Größenausschlussfiltration abgetrennt und die Proben in Kooperation mit Frau Jun. Prof. Dr. Richling (TU Kaiserslautern) mittels HPLC/MS-MS vermessen (s. Abb. 67; Segerbäck *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 2003; Doerge *et al.*, 2005).

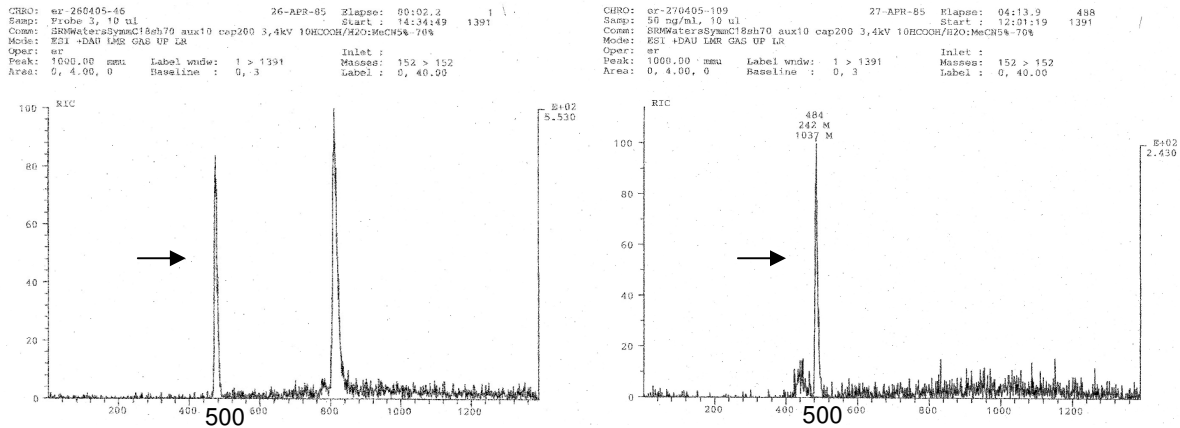


Abb. 67: Chromatogramme m/z 238,9 →151,9; links Probe von V79-Zellen, die für 6h mit 900µM GA inkubiert worden sind; rechts: Standard 50ng N7-Gua-Addukt/ml (Jun. Prof. Riechling)

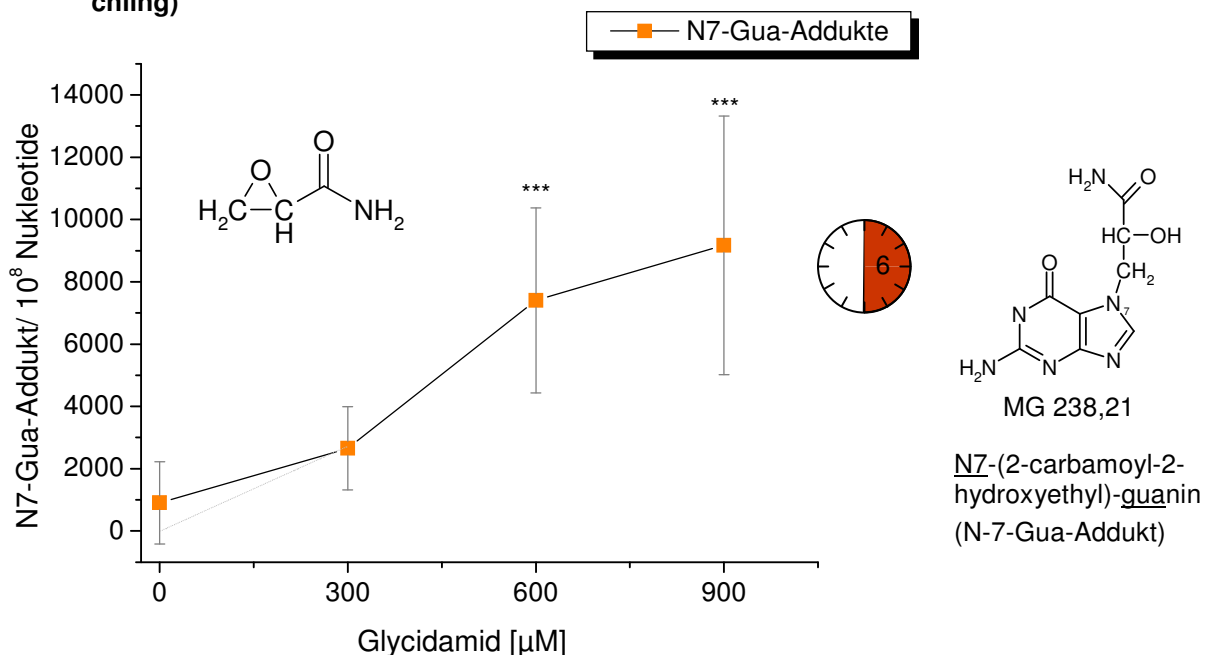


Abb. 68: N7-Gua-Addukte nach 6h-Inkubation mit GA an V79-Zellen; n=5-6  
 Der Berechnung liegen 330Da als mittleres Nukleotidgewicht zugrunde  
 Die Nachweisgrenze liegt bei ~5ng/ml; R<sup>2</sup>(Kalibriergerade)=0,9868.

GA führt nach 6h ab 600µM konzentrationsabhängig zu N7-Gua-Addukten in V79-Zellen (s. Abb. 68). Martins und Mitarbeiter (2006) stellten ebenfalls eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen GA-Konzentrationen und dem Level von N7-Gua-Addukten an V79-Zellen fest. Doerge und Mitarbeiter (2005) verabreichten Mäusen über eine Schlundsonde 50mg AA/kg KG, maßen den Serumlevel an AA/GA und bestimmten die N7-Gua-Addukte in verschiedenen Geweben. Der maximal erreichte Serumlevel nach der Gabe betrug knapp 200µM GA nach 2h. Demnach führten etwa 200µM GA zu 840-2100 N7-Gua-Addukten in 10<sup>8</sup> Nukleotiden. Im vorliegenden Testsystem lag die niedrigste Konzentration bereits höher. 300µM GA führen an V79-Zellen zu durchschnittlich 2600 N7-Gua-Addukten in 10<sup>8</sup> Nukleotiden (1300-

3900). Die Adduktlevel liegen damit in einem vergleichbaren Bereich. Doerge und Mitarbeiter (2005) detektierten *N7*-Gua-Addukte sowohl in Ziel- als auch in Nicht-Ziel-Geweben. Da die Konzentrationen in Ziel-Geweben nicht erhöht waren, spricht das dafür, dass die Adduktlevel nicht direkt mit der Organspezifität in der Kanzerogenese der Nagetiere korrelieren, wie es für die DNA-Strangbrüche entdeckt worden ist, obwohl *N7*-Gua-Addukte zu DNA-Strangbrüchen führen können. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch Maniere und Mitarbeiter (2005).

Young und Mitarbeiter (2007) schätzen, aufgrund eines physiologisch basierten pharmakokinetischen Modells für AA, dass die GA-DNA-Adduktlevel des Menschen bei Exposition mit AA über die Ernährung im Fließgleichgewicht zwischen 0,06 und 0,26 Addukten pro  $10^8$  Nukleotide liegen. Korrelationen von Hb-Addukten mit DNA-Addukten in der Leber bei AA-behandelten Nagetieren führen bei Übertragung von bekannten Hb-Addukt-Leveln im Menschen auf geschätzte 0,06-0,3 Addukte pro  $10^8$  Nukleotide in der humanen Leber (Tareke et al., 2006).

In vorliegender Arbeit ist nach Acrylamidinkubation (6h) kein *N7*-Gua-Addukt in V79-Zellen nachweisbar gewesen. Dies bestätigt die Ergebnisse aus Kapitel 5, dass V79-Zellen mangels CYP 2E1-Expression kein AA zu GA giften können.

#### **6.1.4 Diskussion und Zusammenfassung der Befunde zur Genotoxizität**

##### Acrylamid

Im Genmutationstest, dem HPRT-Test, wurden nach 24h keine Mutanten in V79-Zellen durch bis zu 10mM AA festgestellt, GA hingegen induzierte konzentrationsabhängig signifikant Mutanten ab 800 $\mu$ M und 24h (Mertes, Baum *et al.*, 2005). Ähnliche Resultate zeigte der Mikrokerntest. Während AA bis 6mM und 24h keine Mikrokerne induzierte, erhöhte GA ab 600 $\mu$ M signifikant die Mikrokernrate. AA beeinflusste bis 5mM und 23h ebenfalls nicht die Mikrokernrate in humanen Lymphozyten. 1mM GA erhöhte die Mikrokernrate in diesem Testsystem im Durchschnitt auf das 2,4fache der Kontrolle, jedoch war dieser Anstieg nicht signifikant (Zankl *et al.*, Baum *et al.*, 2005). AA induzierte keine DNA-Strangbrüche bis 6mM und 24h an primären Rattenhepatozyten. Ab 6mM (24h-Inkubation) erhöhte AA die DNA-Strangbruchrate in CaCo-2-Zellen und V79-Zellen. CaCo-2-Zellen, eine Kolonkarzinomzelllinie, wurde getestet, da der AA-haltige Nahrungsbrei physiologisch mit Darmzellen in Kontakt kommt (Füller, 2003). Im Vergleich von primären Rattenhepatozyten mit CaCo-2-

Zellen und V79-Zellen zeigten sich V79-Zellen am sensitivsten gegenüber AA und seinen Metaboliten (Puppel *et al.*, 2005). Eine hohe CYP 2E1-Expression und -Aktivität korrelierte nicht direkt mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber der DNA-strangbrechenden Kapazität von AA an primären Hepatozyten der Wistar-Ratte im Comet-Assay. Es wird dadurch nicht in Frage gestellt, dass CYP 2E1 Grundvoraussetzung für die Epoxidation von AA zu GA ist. Ergebnisse von Ghanayem und Mitarbeitern (2005) bestätigen, dass CYP 2E1 das primär verantwortliche Enzym für die Epoxidation und die Entstehung von GA-DNA-Addukten und GA-Hb-Addukten ist. Neben CYP 2E1 verfügen Zellen über Enzyme wie z.B. Glutathion-S-Transferasen und Epoxidhydrolasen, die zur Entgiftung von AA und GA effektiv beitragen können. Glutathion-Depletion mittels BSO führte nicht zu einem erhöhten genotoxischen Schaden durch AA an primären Rattenhepatozyten, jedoch zu erhöhten DNA-Schweifintensitäten an V79-Zellen im Comet-Assay. In beiden Zellsystemen führte AA nach 24h unter BSO-Behandlung zu einem massiven Verlust an Viabilität. Aufgrund des Viabilitätsverlustes unter BSO-Behandlung durch AA und Effekten in hohen Konzentrationen von AA nach 24h, können Fehlinterpretationen des Comet-Assays durch Apoptose nicht ausgeschlossen werden. In Kapitel 6.2 schließen sich daher Untersuchungen zur Zytotoxizität und Apoptose durch AA an Säugerzellen an.

### Glycidamid

Gemessen nach FPG-Behandlung im Comet-Assay, induzierte GA bereits ab 3 $\mu$ M signifikante DNA-Strangbrüche, die sich auf DNA-Addukte zurückführen lassen (vgl. Thielen *et al.*, 2006). Das N7-Gua-Addukt wurde nach 6h-Inkubation mit 600 $\mu$ M GA in signifikant erhöhten Mengen in V79-Zell-DNA nachgewiesen. Im vergleichbaren Konzentrationsbereich wurde durch GA die Induktion von Mikrokernen und Mutationen im HPRT-Gen ausgelöst sowie DNA-Strangbrüche in V79-Zellen nachgewiesen (s. Tab. 02). Auch Martins und Mitarbeiter (2007) stellten eine strenge Korrelation zwischen dem Level von N7-Gua-Addukten in GA- (und AA-) behandelten V79-Zellen und der Induktion von Schwesterchromatidaustausch fest. Eine derartige Korrelation wurde nicht für Chromosomenaberrationen gefunden, wobei AA und GA Chromosomenaberrationen (Brüche und Löcher) verursachten (Martins *et al.*, 2007). Sie nehmen an, dass daher die Induktion von Schwesterchromatidaustausch durch AA mit dem Metabolismus von AA zu GA und der folgenden Entstehung von depurinierenden GA-DNA-Addukten zusammenhängt, während andere Mechanismen bei der Induktion von Chromosomenaberrationen involviert sein müssten (Martins *et al.*,



2007). GA induzierte unter BSO-Behandlung, d.h. GSH-Erniedrigung, in V79-Zellen vergleichbare DNA-Schäden wie in unbehandelten V79-Zellen. Glutathion beeinflusste nicht die Genotoxizität von GA (bei 3h-Inkubation) bis 900 $\mu$ M (s. Abb. 64).

### Zusammenfassung

Die drei in dieser Arbeit verwendeten Testsysteme, Comet-Assay, Mikrokerntest und Bestimmung der DNA-Adduktbildung, zeigten vergleichbare Konzentrationen genotoxischer Aktivität von AA und GA an V79-Zellen. AA vermittelte in allen Testsystemen keine bis marginale Effekte (s. Abb. 69). Nach Inkubation von V79-Zellen mit dem Metabolit GA wurden genotoxische Effekte durchweg ab 100 - 600 $\mu$ M beobachtet (s. Tab. 02). Aufgrund der Korrelation zwischen der Mikrokernelinduktion und dem Auftreten von DNA-Strangbrüchen mit den N7-Gua-Addukten liegt es nahe, dass die Induktion von DNA-Strangbrüchen und Mikrokerneln mit der Bildung von depurinierenden N7-Gua-Addukten als initiiertes Ereignis assoziiert ist. Zudem schneidet das *in vitro* zugegebene Enzym FPG N7-Gua-Addukte aus der DNA von mit GA-behandelten primären Rattenhepatozyten heraus und erhöht die DNA-Strangbruchrate im Comet-Assay (s. Abb. 66). Im Vergleich zu V79-Zellen zeigten primäre Rattenhepatozyten eine geringere Sensitivität gegenüber der DNA-strangbrechenden Wirkung von AA. Die Daten deuten darauf hin, dass eine hohe CYP 2E1-Expression und -Aktivität nicht der einzige relevante Faktor für die Sensitivität gegenüber der DNA-strangbrechenden Kapazität von AA ist.

Bei der aktuell geschätzten durchschnittlichen täglichen Aufnahme von 1-4 $\mu$ g AA/kg KG und Tag (JECFA, 2005) werden über Nahrungsmittel keine Acrylamidkonzentrationen erreicht, die in den vorliegenden Testsystemen genotoxische Schäden hervorriefen. Erst ab einer Inkubation mit 6mM AA ( $\triangleq$  0,43mg/ml) und 3h wurden DNA-Strangbrüche in V79-Zellen detektiert. Jedoch wurden konzentrationsabhängig GA-DNA-Addukte, Marker, die noch keine manifestierten Schäden darstellen, detektiert. Ihre Entstehung auch durch eine niedrige GA-Konzentration wurde indirekt durch FPG-Behandlung an primären Rattenhepatozyten nachgewiesen; 3 $\mu$ M GA erhöhte unter FPG-Behandlung signifikant die DNA-Strangbruchrate. Martins und Mitarbeiter (2007) detektierten messbare Gehalte an GA-DNA-Addukten nach GA-Inkubation mit 1 $\mu$ M an V79-Zellen. Aufgrund des genotoxischen Mechanismus verbleibt ein Restrisiko für die Kanzerogenese durch AA-Exposition über Nahrungsmittel.

Tab. 02: Genotoxizität von Glycidamid an Säugerzellen; Konzentrationen, ab denen signifikante Effekte auftraten  $p < 0,05$ ; (im Comet-Assay signifikante Werte ab Schweifintensität  $\geq 5$ ); \* Füller, 2003; Puppel *et al.*, 2005; \*\* Baum *et al.*, 2005.

Glycidamid	DNA-Strangbrüche					Mikrokerne	N7-Gua-Addukte	Mutanten im HPRT-Locus
	3h	6h	24h	+BSO 3h	+FPG 24h			
V79-Zellen	600 $\mu$ M*	300 $\mu$ M*	100 $\mu$ M*	100 $\mu$ M*		24h	6h	24h
Primäre Rattenhepatozyten	600 $\mu$ M*		100 $\mu$ M		3 $\mu$ M			
CaCo-2-Zellen	300 $\mu$ M*	300 $\mu$ M*	300 $\mu$ M*					
	4h				+FPG 4h	23h		
Humane Lymphozyten	300 $\mu$ M**				10 $\mu$ M**	$\geq 1000\mu$ M**		

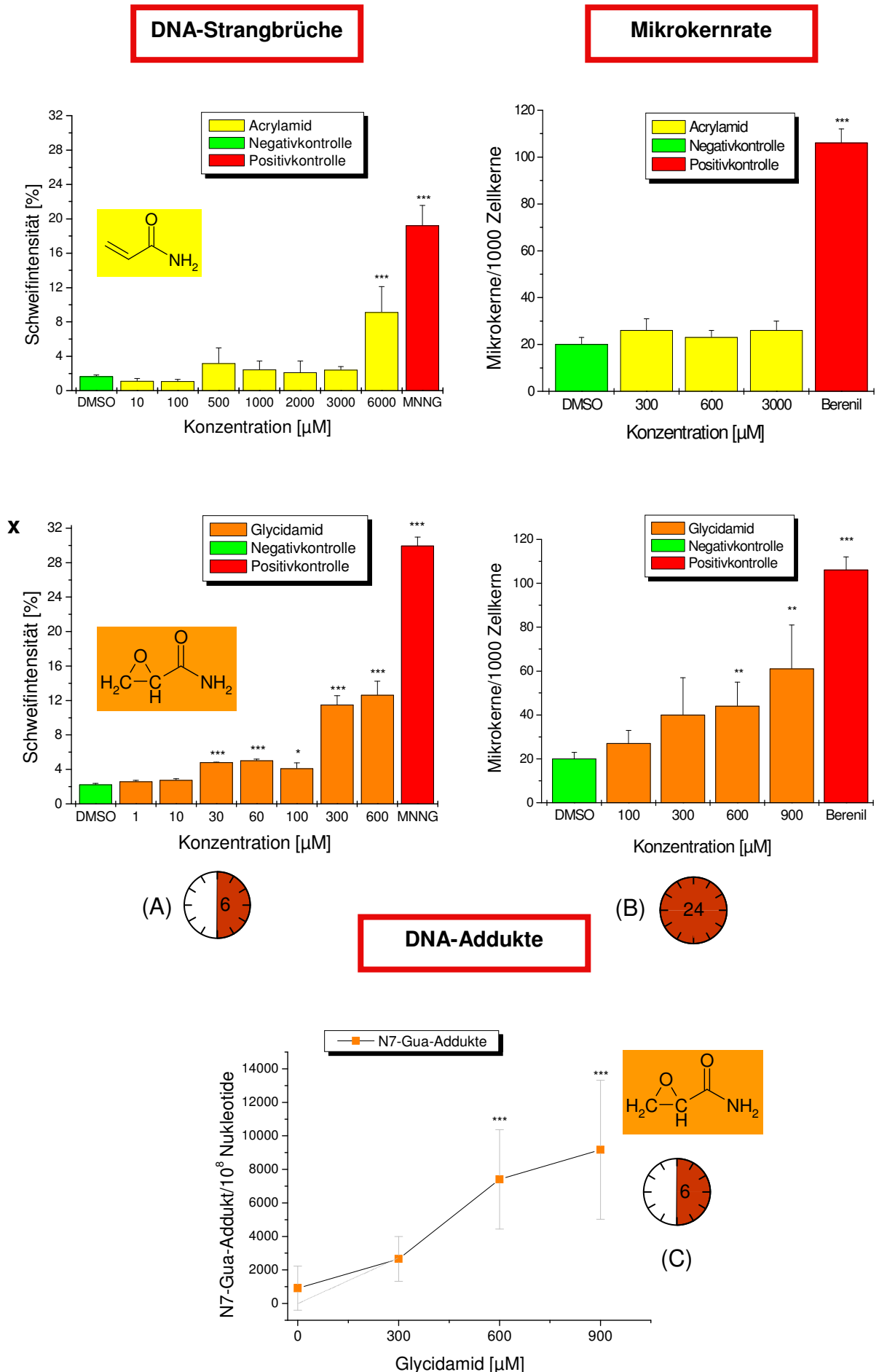


Abb. 69: Vergleich des genotoxischen Potentials von Acrylamid und Glycidamid an V79-Zellen in den Testsystemen A) Comet-Assay, B) Mikrokerntest und C) N7-Gua-Addukt-Nachweis; x : Füller, 2003; Signifikanzen \*p<0,05;\*\*p<0,01;\*\*\*p<0,005. 89

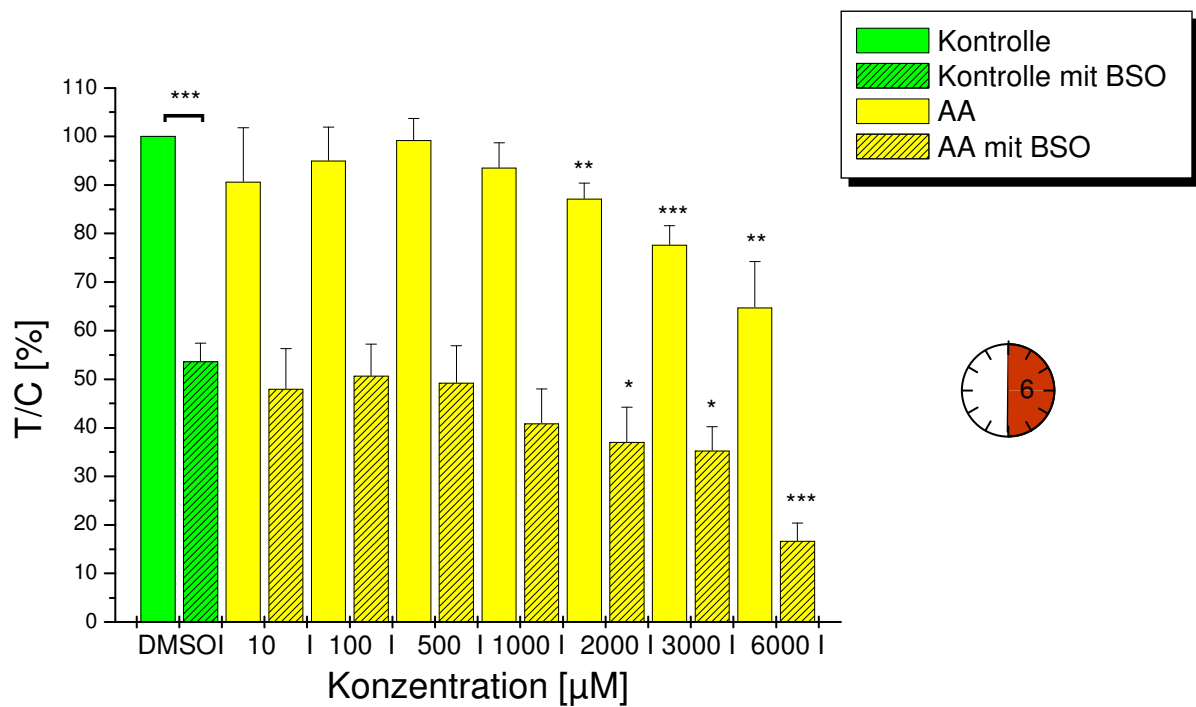
## 6.2 Beeinflussung der Zellviabilität

Im folgenden Kapitel sollte untersucht werden, ob die mittels Comet-Assay detektierten DNA-Schweifintensitäten im Hochdosis-Bereich auf DNA-Strangbrüche oder apoptotische Körperchen zurückzuführen sind. Ein weiterer Grund für die Studien zur Zytotoxizität ist die mechanistische Aufklärung für die Zytotoxizität von AA, welche die Substanz insbesondere unter GSH-Mangel an Säugerzellen gezeigt hat.

AA kann als Michael-Addukt-Bildner nicht nur mit der DNA, sondern auch mit vielen anderen Proteinen des Organismus bzw. Bestandteilen der Zelle reagieren und darüber zytotoxisch wirken. Genotoxische Substanzen sind oft auch zytotoxisch, da eine hohe DNA-Schädigung zum Zellsterben führen kann. Zudem ist die Zytotoxizität ein wichtiges Kriterium für die toxikologische Beurteilung einer Substanz. Ist beispielsweise der zytotoxische Effekt einer potentiell genotoxischen Verbindung dominierend, so resultieren aufgrund des Anteiles apoptotischer und/oder nekrotischer mutierter Zellen weniger Mutanten. Dies kann für den Gesamt-Organismus mit einem geringen Krebsrisiko verbunden sein.

### 6.2.1 Zytotoxizität und Proliferation

Auffällig hohe Zytotoxizität wurde durch Inkubation von AA und 1mM BSO für 24h (ab 1,25mM AA im Comet-Assay, s. Abb. 61 B) an V79-Zellen und primären Rattenhepatozyten festgestellt. Nach Elschenbroich (2006) führt AA unter GSH-Depletion nach 24h ab 750 $\mu$ M zu einer signifikant konzentrationsabhängigen Abnahme der mitochondrialen Aktivität gegenüber der Kontrolle. Im SRB-Test führt AA unter GSH-Depletion nach 24h ab 500 $\mu$ M zu einem Anstieg des Lebendproteingehaltes, der ab 1mM gegenüber der Kontrolle wieder aufgehoben ist und erst ab 2mM abnimmt (Elschenbroich, 2006). Ab 1,25mM AA mit BSO und 24h wurde Membranschädigung in Form einer Umsetzung, die von der intrazellulären Lactatdehydrogenasefreisetzung abhängig ist, detektiert. Da sich die Testergebnisse gegenseitig beeinflussen und auch Apoptose zu sekundärer Nekrose *in vitro* führt, konnte die Frage nach der Ursache der Zytotoxizität (Membranschädigung, Schädigung der Mitochondrien und/oder Apoptoseinduktion) durch AA im Rahmen ihrer Arbeit nicht endgültig beantwortet werden (Elschenbroich, 2006). Im Vergleich dazu wurde nun als Anhaltspunkt für die Viabilität nach 6h ein WST-1-Assay parallel zum Comet-Assay mit 6h-Inkubation durchgeführt (s. Abb. 70).

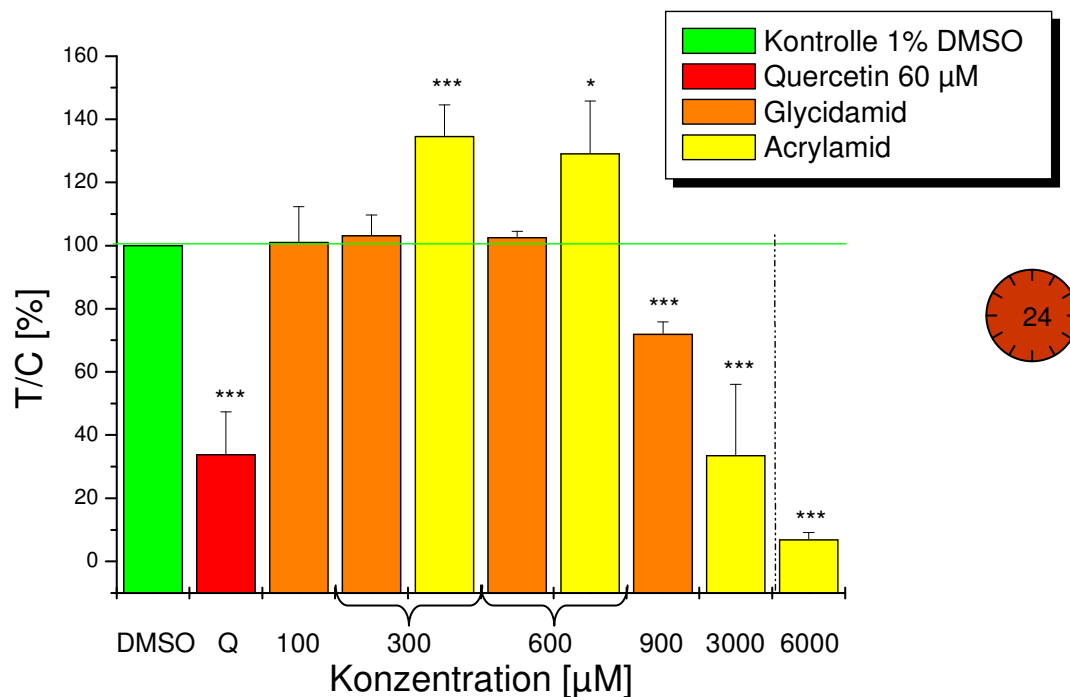


**Abb. 70: WST-1-Assay (MTT) V79-Zellen; 6h-Inkubation; Acrylamid ± BSO; n=3 (unter Comet-Assay-Bedingungen). Signifikanzen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle mit \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,005.**

6h-Inkubation mit AA führt ab 2mM signifikant und konzentrationsabhängig zur Abnahme der mitochondrialen Aktivität an V79-Zellen sowohl mit als auch ohne zusätzlicher BSO-Behandlung. AA erniedrigt nach 6h in dem Konzentrationsbereich die mitochondriale Aktivität, in dem sie die DNA-Schweifintensitäten erhöht (s. Abb. 62). Diese Konzentrationen sind für den Menschen nicht relevant, die daraus hervorgehenden Effekte können jedoch der Interpretation der Assays und dem Verständnis des Wirkmechanismus dienen. Die BSO-Behandlung selbst führt zu einem hochsignifikanten Viabilitätsverlust gegenüber der unbehandelten Kontrolle (s. Abb. 70). Das Ergebnis lässt sich durch die bekannte Sensibilität von Mitochondrien für oxidativen Stress erklären (Armstrong, 2006), da BSO durch GSH-Depletion den oxidativen Stress erhöht. Ebenfalls durch 2mM AA führt die 6h-Inkubation unter GSH-Depletion zu einem signifikanten und konzentrationsabhängigen Effekt an V79-Zellen. Vergleicht man die Ergebnisse des WST-1-Assays nach 6h mit denen nach 24h von Eischenbroich, zeigt sich, dass eine längere Inkubationsdauer nicht mit einer erhöhten Zytotoxizität einhergeht. Zwar nimmt die mitochondriale Aktivität unter GSH-Depletion nach 6h ab 2mM und nach 24h schon ab 750µM AA ab, aber ohne GSH-Depletion nimmt sie nach 6h ab 2mM und nach 24h erst ab 6mM im Vergleich zur Kontrolle ab. Es ist zu vermuten, dass proliferative und zytotoxische Effekte von AA nach 24h ohne GSH-Depletion zur Gesamtbilanz der mitochondrialen Aktivität beitragen.

Obwohl der massive Viabilitätsverlust ab 24h durch AA im Zusammenhang mit BSO steht, ist die Abnahme der mitochondrialen Aktivität nach 6h noch unabhängig von der BSO-Behandlung ab 2mM AA zur jeweiligen Kontrolle signifikant. Die Daten von Elschenbroich lassen erkennen, dass die verminderte Bildung des Formazans (WST-1) nicht direkt mit dem Gehalt des Lebendproteins (SRB-Test) korrelieren. Es zeigt sich, dass der Effekt von AA auf die Proliferation erst nach 24h auftritt, die GSH-Depletion jedoch die Proliferation hemmt (WST-1-Assay, SRB-Test, Elschenbroich). Die Vergleichbarkeit von Comet-Assay, WST-1-Assay und SRB-Test wird noch dazu erschwert, da unterschiedliche Randeffekte (z.B. Inkubation in Petrischale *versus* 96-Loch-Platte) Einfluss auf Viabilität und Wachstum nehmen können.

Als Wachstumskontrolle für den Mikrokerntest wurde ein WST-1-Assay unter „Mikrokerntest-Bedingungen“ (=mit 24h Nachkultivierung) durchgeführt. Daher wurden die im Mikrokerntest verwendeten Konzentrationen von AA und GA gewählt (s. Abb. 53).



**Abb. 71: WST-1 Assay an V79-Zellen; 24h Acrylamid und Glycidamid; n=4 unter Bedingungen des Mikrokerntests: 24h anwachsen, 24h Inkubation 0%FKS, 24h Nachkultivierung; Lösungsmittel 1 % DMSO; Positivkontrolle Quercetin (Q) 60 µM; \* p< 0,05; \*\*\* p< 0,005.**

Die Positivkontrolle Quercetin, ein Apfeinhaltsstoff mit bekannter Wachstumshemmung im SRB-Test an HT-29-Zellen (Puppel, 2003), hemmt die mitochondriale Aktivität nach 24h (60µM) zu etwa 70% im Vergleich zur Kontrolle. Es stellte sich heraus (s. Abb. 71), dass 24h AA im Konzentrationsbereich 300µM - 600µM auf V79-Zellen einen signifikanten proliferierenden Effekt hat, der auch nach 24h (Nachkultivierung) noch anhält. Auch in der Literatur wird von einem Anstieg der DNA-Synthese durch

AA berichtet (Klauning und Kamendulis, 2005). Der proliferierende Effekt wurde jedoch drastisch von Zytotoxizität in den höheren Konzentrationen überlagert: Es ist eine deutliche Abnahme der mitochondrialen Aktivität durch (3mM - 6mM) AA an V79-Zellen im WST-1-Assay festzustellen, einem Indiz für den Viabilitätsverlust durch AA. Für den Mikrokerntest (ohne Zytokineseblocker) bedeutet das Ergebnis, dass ab 3-6mM AA damit zu rechnen ist, dass aufgrund geringerer Teilungsrate (im Vergleich zur Kontrolle) die Mikrokerninduktion nicht mehr bestimmt werden kann. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die unterschiedlichen Bedingungen dazu führen, dass der WST-1-Assay nicht exakt die Viabilität der Zellen im Mikrokerntest widerspiegelt und der WST-1-Assay nur eine Aussage zur mitochondrialen Aktivität zulässt. Bei der Doppelkernmethode wird dieses Problem durch die Induktion von binuklearen Zellen umgangen (auch 6mM AA induziert keine Mikrokern, s. Abb. 57 A). Das mikroskopische Bild von V79-Zellen, die 24h mit 6mM AA behandelt worden sind, zeigen eine verminderte Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Kapitel 6.2.2).

### **Diskussion und Zusammenfassung der Befunde zur Zytotoxizität von AA, GA und BSO sowie proliferativen Effekten**

#### Glutathion

Da die Erniedrigung des Glutathionspiegels einen Nachteil für die Entgiftungsmöglichkeiten der Zelle darstellt und die Zellen z.T. mit BSO behandelt wurden, werden die Ergebnisse zur Reduktion des GSH-Spiegels und der Zytotoxizität von BSO zusammengefasst (s. Tab. 03). Der  $EC_{50}$ -Wert in Bezug auf die GSH-Depletion durch BSO nach 24h beträgt  $3,5\mu\text{M}$  an V79-Zellen und  $35\mu\text{M}$  an primären Rattenhepatozyten unter vorliegenden Kultivierungsbedingungen. Die 24stündige Inkubation mit 1mM BSO führt zu nicht mehr detektierbaren GSH-Gehalten an V79-Zellen und zu unter 10% GSH im Vergleich zur Kontrolle an primären Rattenhepatozyten (s. Abb. 43/44). 1mM BSO vermindert die mitochondriale Aktivität in V79-Zellen nach 30h (24h Vorinkubation und 6h serumfreie Inkubation) auf etwa die Hälfte im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 45). AA reduziert nach 24h ab 3mM (auf ~20%) und GA ab  $900\mu\text{M}$  (auf ~ 60%) signifikant den GSH-Spiegel in V79-Zellen (s. Abb. 46). Aufgrund der Bindung von AA an GSH ist mit einem erhöhten oxidativen Stress für die Zelle durch AA im millimolaren Konzentrationsbereich zu rechnen. Es ist bekannt, dass Ethanol ebenfalls den GSH-Spiegel senkt (Vogt und Richie, 2007). Bisher gab es noch keine Kombinations-Versuche von AA/GA mit anderen Substanzen (Rice, 2005). Wie die Ergebnisse aus den Kombinationsversuchen von AA mit BSO zeigen

(s. Tab. 03), könnten durch die gleichzeitige Aufnahme von AA und GSH-depletierenden Nahrungsbestandteilen negative zelluläre Effekte in niedrigeren Acrylamidkonzentrationen als durch AA alleine auftreten.

### Zytotoxizität

Unter GSH-Depletion reduziert AA nach 24h ab etwa 1,25mM die Viabilität der V79-Zellen und der Primärkultur aus der Rattenleber drastisch (s. Abb. 61). Die 24stündige Koinkubation von AA mit BSO erhöht ab 1,25mM signifikant die Lactatdehydrogenase-Aktivität im Überstand von V79-Zellen, einem Indiz für Membranschädigung (Elschenbroich, 2006). Die Koinkubation von AA und 1mM BSO setzt auch die mitochondriale Aktivität herab. Eine signifikante Hemmung war nach 24h ab 750µM AA zu detektieren (Elschenbroich, 2006). Die 6stündige AA-Inkubation hemmt sowohl in BSO-behandelten als auch -unbehandelten V79-Zellen ab 2mM die mitochondriale Aktivität im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (s. Abb. 70 und Tab. 03). Die Menge an Lebendprotein im SRB-Test nimmt nach 24h unter BSO-Behandlung ab 10µM AA zu und ab 2mM im Vergleich zur Kontrolle ab (Elschenbroich, 2006). Hypothetisch könnte eine Schädigung der Mitochondrien durch AA (u.a. durch GSH-Verbrauch) zur Apoptoseinduktion führen mit Folge einer sekundären Nekrose *in vitro* und damit zu einer Membranschädigung mit Lactatdehydrogenasefreisetzung.

Auch die Inkubation mit GA erniedrigt ab 900µM (24h + 24h Nachkultivierung) die mitochondriale Aktivität an V79-Zellen (auf ~70%).

### Proliferation

Im Konzentrationsbereich zwischen 300µM und 600µM hat AA-Behandlung (24h) auf V79-Zellen einen wachstumsstimulierenden Effekt, der nach 24h Nachkultivierung noch anhält (s. Abb. 71; vgl. Tab. 03). Dies ist ein Indiz dafür, dass AA nicht nur initiierende, sondern auch proliferierende, also Eigenschaften eines Komplettkanzerozens, besitzt. Tyl und Friedman (2003) diskutieren als Mechanismus für die Zellproliferation die Modulation von Hormonleveln.

Die hohen Konzentrationen, in denen AA die Zellviabilität in vorliegenden Testsystemen beeinflusst hat, sind für den über Lebensmittel mit AA exponierten Menschen nicht relevant.



**Tab. 03: Effekte von AA, GA und BSO auf Zellviabilität und GSH-Spiegel von Säugerzellen; Vergleich der Konzentrationen, ab denen Effekte auftreten mit  $p < 0,05$ .**

[ $\mu$ M]	Acrylamid	Glycid- amid	Acrylamid +BSO	BSO 1mM	BSO 1mM
Test / Zeit	V79-Zellen				Hep
WST-1					
6h ↓	2000		2000		
24h ↑	100*				
24h ↓	6000*		750*		
24h+N ↑	300				
24h+N ↓	3000	900			
EC <sub>50</sub> ↓				42 ± 6h	
SRB					
24h ↑	50*/500*		10*		
24h ↓	>6000*		2000*		
LDH					
24h ↑			1250*		
GSH					
24h ↓	3000	900			
EC <sub>50</sub> ↓				3,5 ± 0,6	35 ± 18

- ↑ „Proliferation“ Erhöhung der mitochondrialen Aktivität (WST-1-Assay) oder Lebendproteinmenge (SRB: Sulforhodamin-B-Test)
- ↓ „Zytotoxizität“ Erniedrigung der mitochondrialen Aktivität (WST-1), Lebendproteinmenge (SRB) oder des Gesamt-Glutathion-Gehaltes (GSH)
- ↑ „Zytotoxizität“ Erhöhung der Lactatdehydrogenase (LDH) im Überstand durch erhöhte Membranschädigung

Hep: Primäre Rattenhepatozyten (Wistar-Ratte); +N: mit Nachkultivierung (24h)  
 BSO: L-Buthioninsulfoximin; EC<sub>50</sub>: Effect concentration (untersuchter Parameter  $\triangle$  50% des Parameter-Wertes der Kontrolle); \* Daten von Elschenbroich, 2006.

### Ausblick

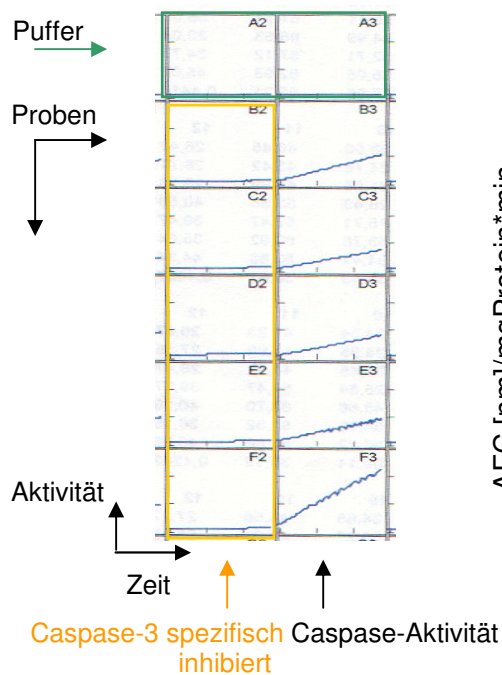
Weiteren Aufschluss über den kanzerogenen Mechanismus könnten Untersuchungen an Ziel-Gewebe und Ziel-Zellen geben. Besondere Relevanz hätten Untersuchungen an humanen Probanden.

## 6.2.2 Apoptoseinduktion

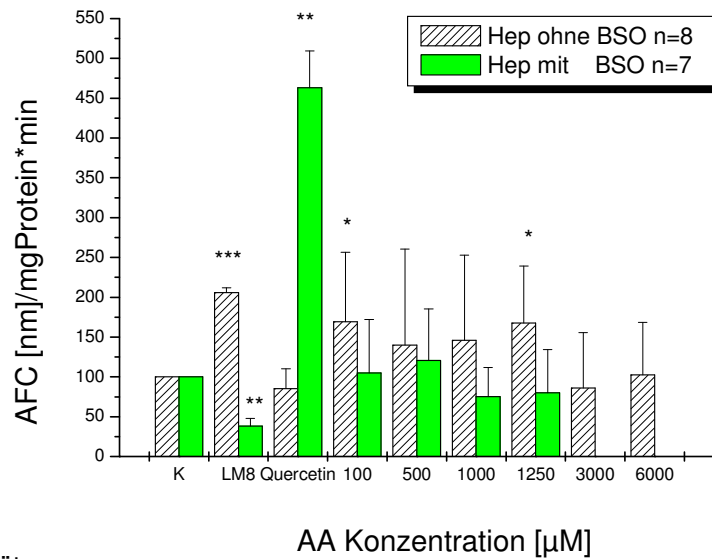
Nachdem ein zytotoxischer Effekt durch AA, massiv unter gleichzeitiger GSH-Depletion, aufgetreten ist, stellt sich die Frage, ob AA unter diesen Bedingungen Apoptose induziert.

Ein kritischer Punkt in der Bewertung der Comet-Assays ist, ob erhöhte DNA-Schweifintensitäten auf DNA-Strangbrüche oder apoptotische Körperchen zurückzuführen sind. Bei einer 24h-Inkubation (vgl. Kapitel 6.1.2 Abb. 61 B) könnte es zur Induktion von Apoptose kommen. Nach 24h Koinkubation von AA mit BSO wurden erhöhte DNA-Schweifintensitäten ab 1mM an Rattenhepatozyten und ab 500µM an V79-Zellen detektiert. Zur Detektion der Apoptose wurde die Caspase-3-Aktivität als Marker verwendet. Eine erhöhte Aktivität ist Signal einer angestoßenen Caspase-Kaskade, die unwiderruflich zur Apoptose führt (Kroemer *et al.*, 1997). An Rattenhepatozyten ist kein Effekt durch BSO und/oder AA auf die Caspase-Aktivität, als T/C [%] angegeben (s. Abb. 73), zu erkennen. Dagegen lässt die Darstellung auf die Aktivität bezogen, durch AA eine Tendenz erkennen (s. Abb. 74) sowie einen signifikanten Unterschied von BSO behandelten zu unbehandelten Zellen in der Caspase-3-Aktivität (s. Abb. 74 D).

Der Ausschnitt einer graphischen Darstellung der Ascent Fluorocan Software (s. Abb. 72) zeigt die lineare Substratspaltung von Caspase-3 in Abhängigkeit von der Zeit; die unspezifische Aktivität (mittels spezifischen Caspase-3-Inhibitor ermittelt) wird von der ungehemmten Aktivität abgezogen. Unabhängig von den eingesetzten Konzentrationen an AA soll die Abb. 72 einen Einblick in die Rohdaten vermitteln: Das Resultat spricht dafür, dass Caspase-3-Aktivität vorhanden, mit verwendetem Substrat messbar ist und sich bereits Kontrollzellen in Apoptose befinden. Da primäre Rattenhepatozyten bisher nicht länger als ein bis drei Tage in Kultur überleben und sich auch nicht mehr teilen, ist mit einem apoptotischen Prozess außerhalb des Organismus zu rechnen. Mit der Abnahme von CYP 2E1-Aktivität (vgl. Kapitel 5.2) könnte auch eine zeitlich zunehmende Caspase-3-Aktivität einhergehen.



**Abb. 72:** Repräsentativer Caspase-3-Assay (Ausschnitt); graphische Darstellung der zeitabhängigen Fluoreszenzbildung (Substratspaltung) durch Caspase-3-Aktivität.



**Abb. 73:** Caspase-3-Aktivität T/C [%] nach 24h AA-Inkubation an primären Rattenhepatocyten (Hep) Forschungsarbeit Fütterer, 2005; K:Kontrolle; LM8: (3-Hydroxy-4-[(E)-(2-furyl)methyliden]methyl-3-cyclopenten-1,2-dion).

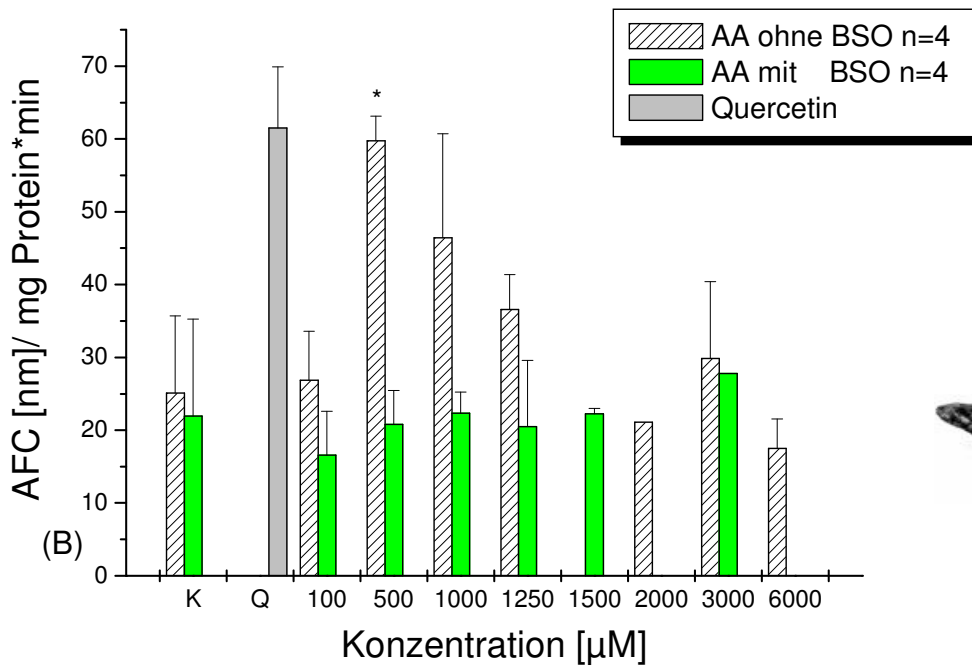
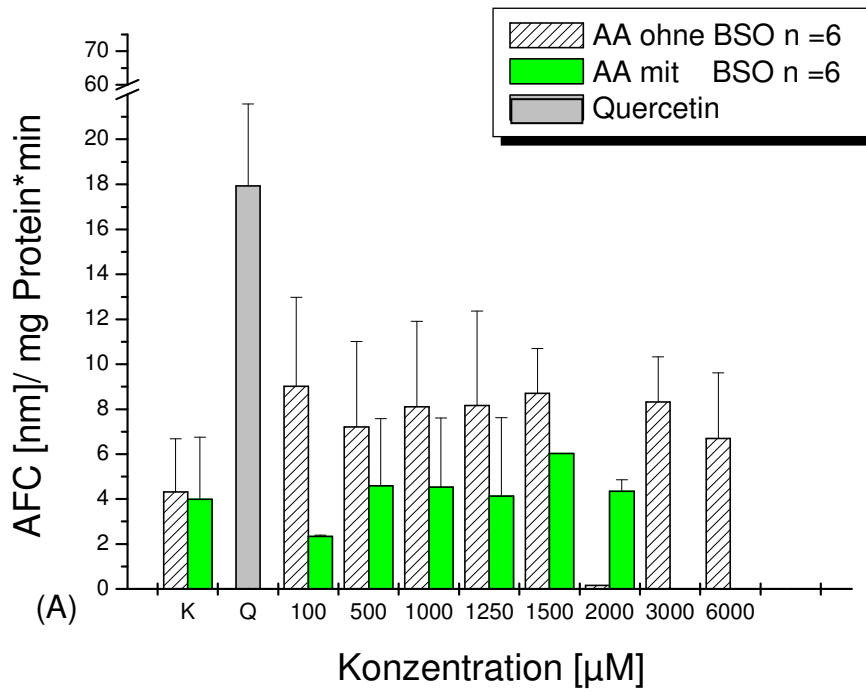
Es deutet sich in einigen der durchgeführten Versuche nach 24h eine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität durch 500µM AA an, die mit weiterer Zunahme der Konzentration wieder abnimmt (s. Abb. 74 B/C). Es ist zu berücksichtigen, dass AA nach 24h auch zu proliferativen Effekten führt. Apoptotische Effekte könnten mit proliferierenden verknüpft sein. Proliferierende Zellen könnten die durchschnittliche Caspase-3-Aktivität in den Zellen erniedrigen. Betrachtet man die Ergebnisse der Caspase-3-Aktivität nach 24h AA mit und ohne gleichzeitiger GSH-Depletion pro Ratte oder berechnet die Ergebnisse getrennt nach Rattenhepatocyten mit niedriger Caspase-3-Aktivität (<10 AFC [nm]/mg Protein \* min) und hoher (~20 AFC [nm]/mg Protein \* min), erhält man anschaulich eine geringere Caspase-3-Aktivität durch AA unter GSH-Depletion (s. Abb. 74 A-C). Die durchschnittliche Caspase-3-Aktivität mit AA im Bereich von 100-1250µM liegt etwa 2x über der durchschnittlichen Caspase-3-Aktivität durch 100-1250µM AA unter GSH-Depletion mit BSO. 24h-Inkubation mit AA beeinflusst bis 2mM unter GSH-Depletion und bis 6mM ohne GSH-Depletion die Caspase-3-Aktivität in primären Rattenhepatocyten nicht. Daraus lässt sich jedoch

nicht schließen, dass AA und/oder BSO nicht zu Apoptose führen. In der Regel führt BSO zur Apoptose wie z.B. in einer Studie von Chi und Mitarbeitern (2007), die Versuche zur Degeneration von Motoneuronen mit einem Motoneuron-ähnlichen Zellkultursystem und an einem transgenen Mausmodell durchführten. BSO reduzierte drastisch den GSH-Spiegel verbunden mit einer ansteigenden Produktion von ROS, erhöhter Anzahl an Marker für oxidativen Stress, herabgesetzter mitochondrialer Funktion, erleichterter Translokation des Apoptose induzierenden Faktors (AIF), Cytochrome c-Freisetzung und Caspase-3-Aktivierung. Der Signalweg endet schließlich mit der Apoptose Motoneuron-ähnlicher Zellen.

Auch AA als  $\alpha/\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindung bindet u.a. an GSH und induziert oxidativen Stress (Pennathur *et al.*, 2005). Nach Janzowski und Mitarbeitern (2003) führten  $\alpha/\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindungen unserer Nahrungsmittel (z.B. Alkenale) zu erhöhtem oxidativen Stress und trugen zu zytotoxischem/genotoxischen Zellschaden an Säugerzellen bei.

Hinweise auf eine Caspase-3-unabhängige Apoptose bei nachhaltigem oxidativen Stress, wovon im vorliegenden System nach insgesamt 48h BSO-Inkubation auszugehen ist, geben folgende Studien. Ishihara und Mitarbeiter haben 2005 veröffentlicht, dass die Apoptose primärer Rattenhepatozyten unter nachhaltigem endogenem oxidativen Stress unabhängig von der Caspase-3-Aktivität ist. Der spezifische Caspase-3-Inhibitor (DEVD-CHO) hat bis 1mM keinen Effekt auf die Apoptose an primären Rattenhepatozyten (Ishihara *et al.*, 2005). Nach Ogata und Mitarbeitern (2003) aktiviert eine Funktionsstörung des Golgiapparates z.B. über eine  $Ca^{2+}$ -abhängige und Caspase-3 unabhängige Nuklease (DNase) einen Caspase-3 unabhängigen apoptotischen Signalweg. Ishihara und Shimamoto identifizierten Endonuklease G als Caspase-3-unabhängig (2006).

Das würde erklären, dass AA unter GSH-Depletion, also nachhaltigem endogenem Stress, vermutlich zur Apoptose (s. auch mikroskopische Aufnahmen Abb. 75-79), aber unabhängig von der Caspase-3 – und damit verminderter Caspase-3-Aktivität im Vergleich zur Inkubation mit AA alleine an primären Rattenhepatozyten –, führt.



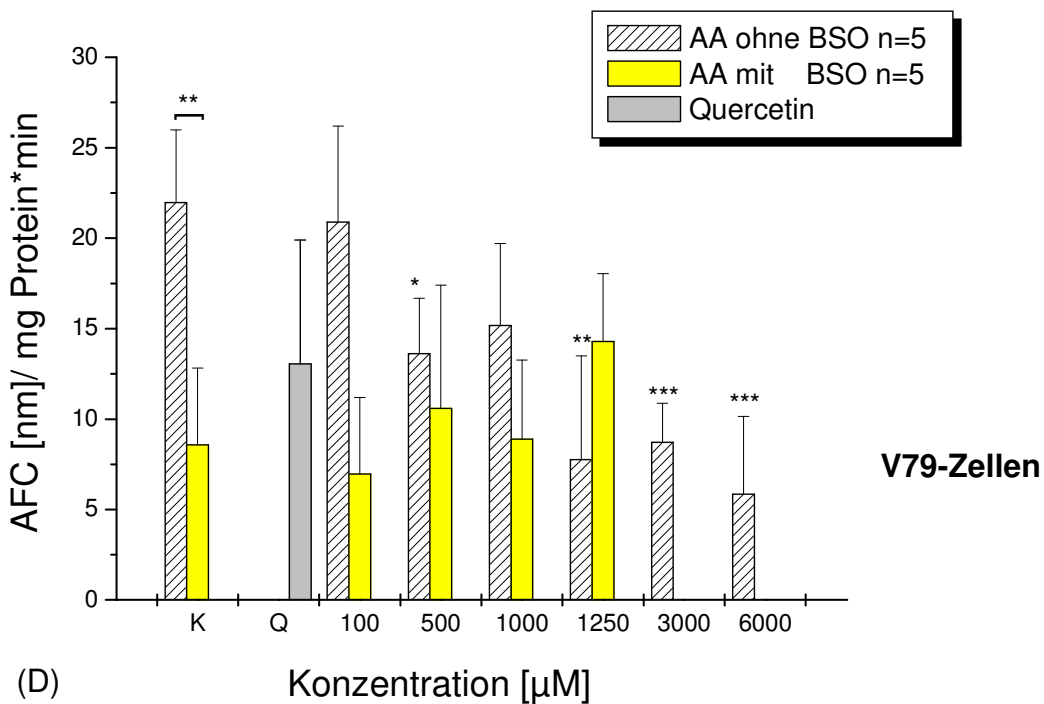
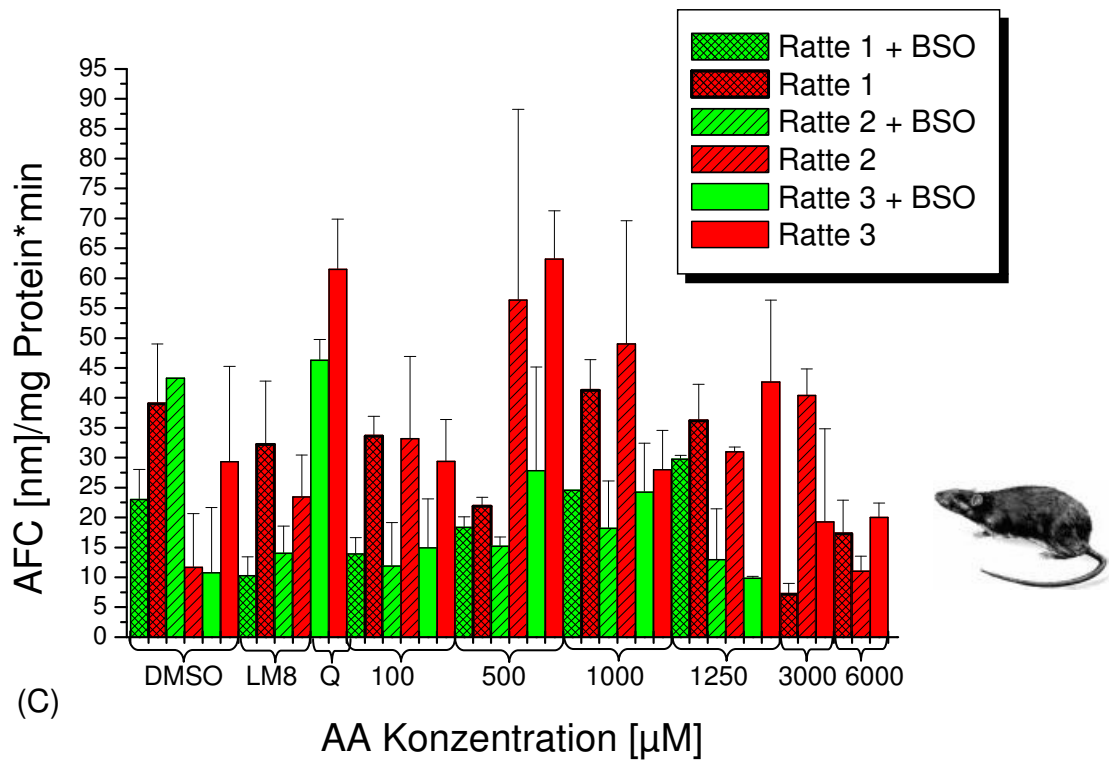


Abb. 74: A-C: Caspase-3-Assay; primäre Rattenhepatozyten; 24h ±BSO +24h AA ±BSO  
 A: Zusammenfassung der Assays mit Kontrollwerten im Bereich ~4nm AFC/mg \* min  
 und B: ~20nm AFC/mg\*min C: Darstellung pro Ratte D: V79-Zellen. K: Kontrolle; Q:  
 Quercetin; LM8: (3-Hydroxy-4-[(E)-(2-furyl)methyliden]methyl-3-cyclopenten-1,2-dion).

Sen und Mitarbeiter (2005) haben V79-Zellen wiederholt mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestresst und gezeigt, dass diese Zellen signifikant resistent gegenüber Apoptose durch akuten Stress einer einmaligen UV-Bestrahlung sind. Ähnlich den Ergebnissen an Rattenhepatozyten beeinflussen 100-1250µM AA für 24h unter GSH-Depletion nicht die Caspase-3-Aktivität in V79-Zellen. Es ist jedoch anzunehmen, dass Ac-DEVD-AFC Substrat der Caspase-3 in V79-Zellen ist, da in der Literatur ebenfalls DEVD (z.B. DEVD-pNA von Jorquera und Tanguay, 1999 und Ac-DEVD von Sen *et al.*, 2005) an V79-Zellen zur Caspase-3-Aktivitätsbestimmung verwendet wird. AA scheint nach 24h konzentrationsabhängig die Caspase-3-Aktivität zu hemmen. Es ist möglich, dass Untersuchungen zur Caspase-3 im Bereich weniger Stunden nach Substanzinkubation zu erhöhter Aktivität führen würden. Nach Jorquera und Tanguay (1999) führt beispielsweise Fumarylacetoacetat nach 3h zur Caspase-1-Aktivität, nach 1-12h zu Procaspase-3-Expression, nach 24-32h zu Cytochrom c-Freisetzung und nach 32h zu maximaler Caspase-3-Aktivität an V79-Zellen. Wenn nach 24h und 6mM AA bereits apoptotische Körperchen vorhanden sind, wäre die Caspase-3-Aktivität zu einem früheren Zeitpunkt aktiv gewesen. In Abhängigkeit der Konzentration könnten auch nekrotische Vorgänge ablaufen. Aufgrund der hohen Aktivität in den Kontrollzellen wurde die Apoptoseinduktion mithilfe einer Anfärbung untersucht.

Im Folgenden zeigen mikroskopische Aufnahmen angefärbter V79-Zellen die morphologischen Veränderungen als Indiz für Apoptose in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration (AA ± BSO, GA) und der Zeit zwischen 6h und 24h Inkubation.

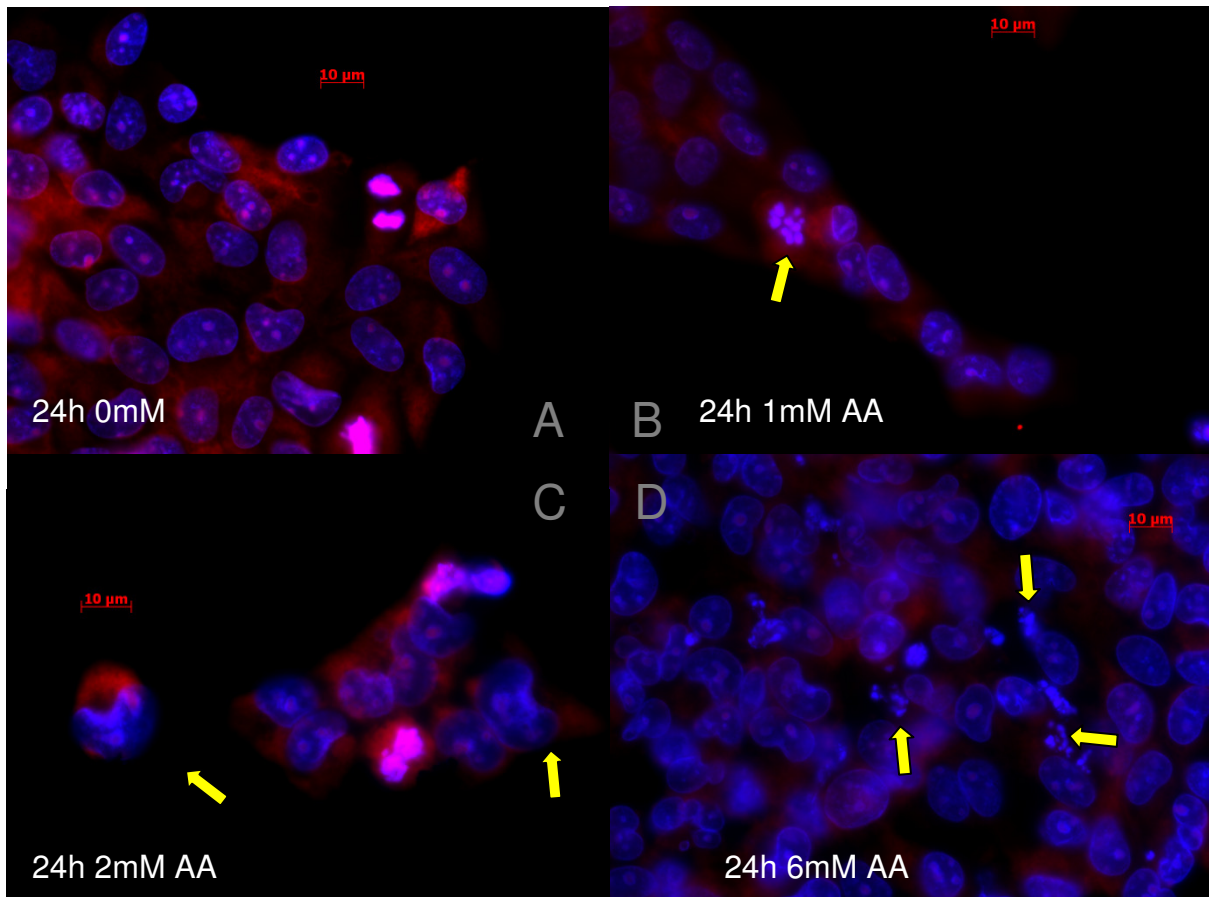


Abb. 75: V79-Zellen (1%DMSO), 24h, Acrylamid: A) 0mM; B) 1mM; C) 2mM; D) 6mM; DAPI+Propidiumjodid-Färbung.

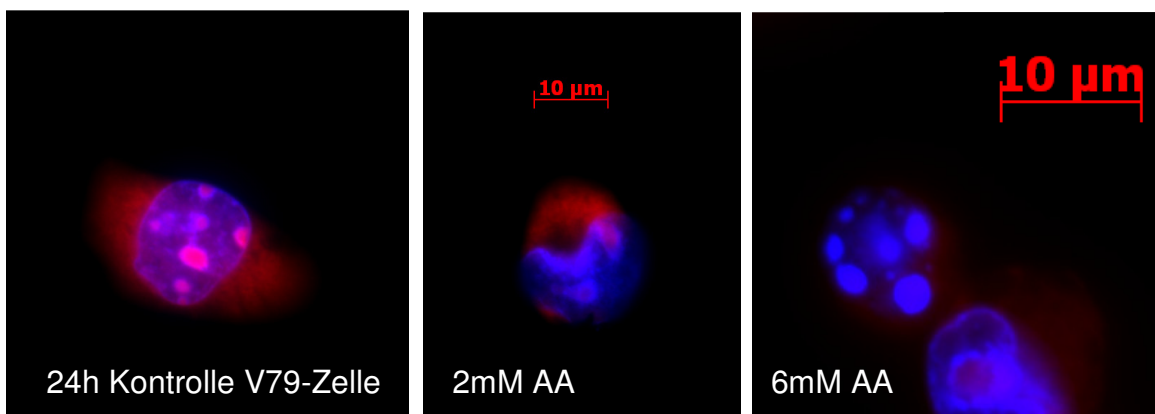


Abb. 76: gesunde Zelle (Kontrolle)  
V79-Lungenfibroblast  
1% DMSO

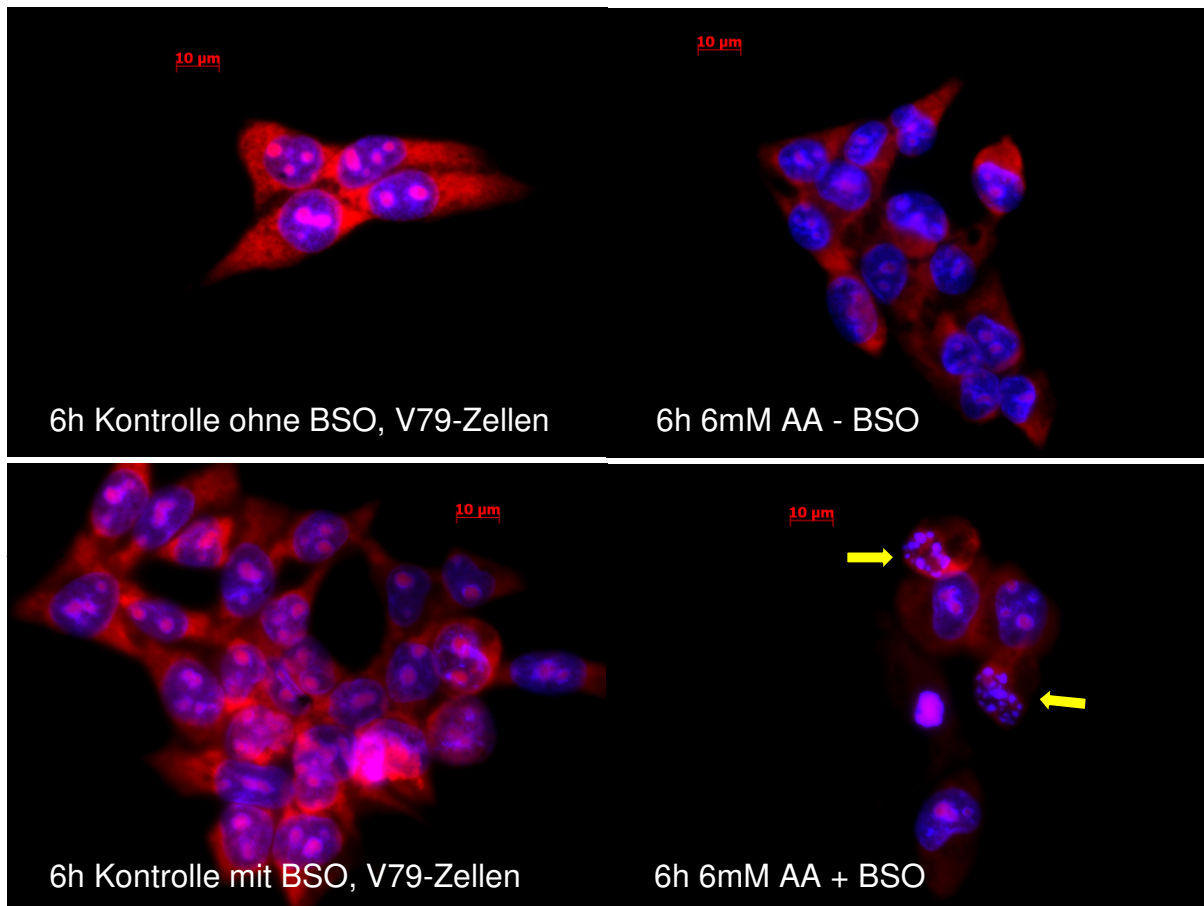
apoptotische Vorstufe  
nierenförmiger Kern  
2mM AA, 24h

apoptotische Körperchen  
6mM AA, 24h

Nach 24h bildet sich in einer Vielzahl der mit 2mM AA behandelten V79-Zellen die für Fibroblasten typische Struktur zurück, die Zellen runden sich ab und der DNA-Kern



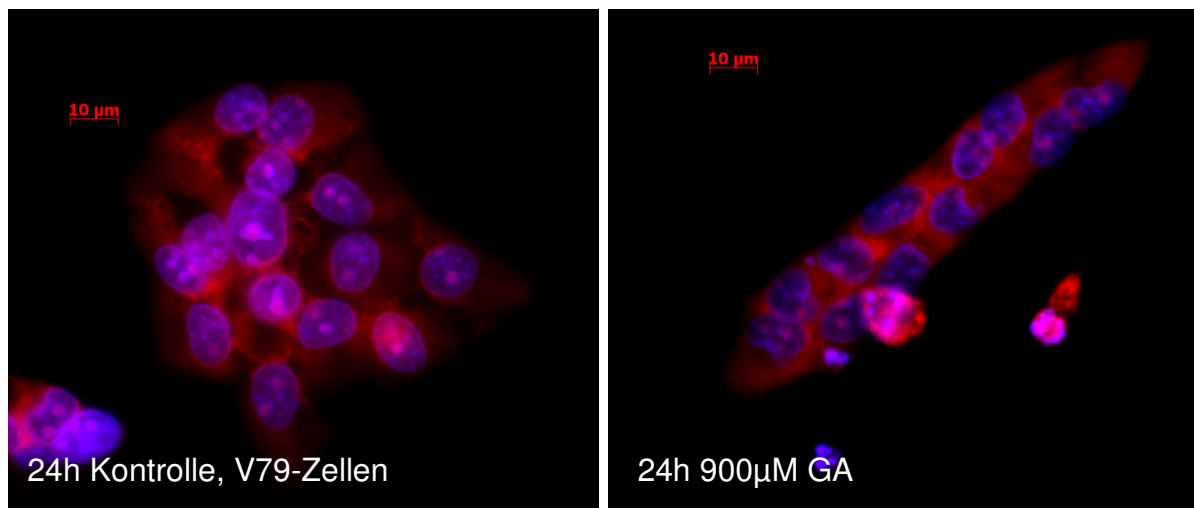
schrumpft nierenförmig zusammen (s. Abb. 75 und 76). 6mM AA führt nach 24h zu apoptotischen Körperchen. Die für Apoptose typischen apoptotischen Körperchen sind in Abb. 76 nach 24h mit 6mM AA an V79-Zellen in einem repräsentativen Beispiel zu sehen. Verglichen mit dem Comet-Assay nach 24h an V79-Zellen ist es wahrscheinlich, dass ab 6mM detektierte DNA-Schweifintensitäten auf apoptotische Körperchen zurückzuführen sind.



**Abb. 77: 6h-Inkubation, V79-Zellen, Vergleich von 6mM AA mit und ohne GSH-Depletion.**

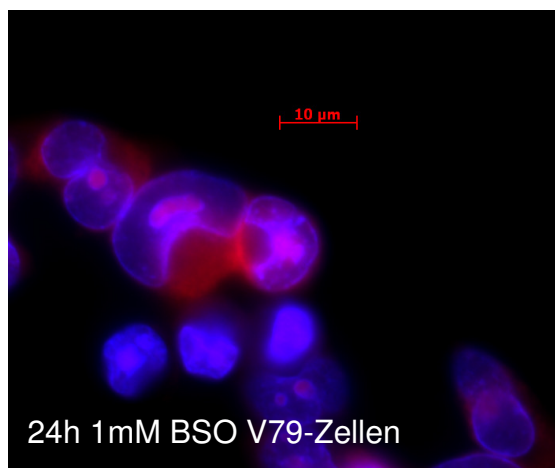
Abb. 77 zeigt mit DAPI angefärbte DNA und mit Propidiumjodid gefärbte V79-Zellen nach 6stündiger Inkubation. 6mM AA tolerieren V79-Zellen bis 6h sehr gut; die Zellen bleiben in Ihrer Morphologie unverändert. BSO wird bis 6h (+ 24h Vorinkubation) ebenfalls gut toleriert. Dagegen sind nach 6mM AA in Gegenwart von BSO apoptotisch zerfallene Zellen auf dem Objektträger zu finden (s. Abb. 77). Im Comet-Assay treten nach 6h ab 6mM AA erhöhte DNA-Strangbrüche auf und ab 3mM AA unter GSH-Depletion. Ein Zusammenhang von DNA-Schweifintensität mit dem Auftreten apoptotischer Körperchen bei hohen AA-Konzentrationen in Gegenwart von BSO ist daher wahrscheinlich. In BSO-unbehandelten Zellen kommt es zu keiner

Ausbildung von apoptotischen Körperchen nach 6h. Folglich sind apoptotische Prozesse wahrscheinlich nicht für die, bei den nach ausschließlich mit 6mM AA (6h) behandelten Zellen, beobachteten DNA-Strangbrüche verantwortlich. 900µM GA beeinflussen kaum die Zellmorphologie (Abb. 78). Das Wachstum der Zellen in „Klumpen“ ist für diese Zelllinie typisch. Neben Mikrokernen treten in dieser maximal eingesetzten Konzentration sehr vereinzelt auch apoptotische Kernkörperchen auf.



**Abb. 78:** 24h-Inkubation, V79-Zellen, 900µM Glycidamid (GA) im Vergleich zur Kontrolle 1%DMSO.

Unter mit 1mM BSO-behandelten Zellen (24h Vorinkubation mit Serum + 24h Inkubation serumfrei) ohne AA sind Vorstufen der Apoptose zu finden. In Abb. 79 sind in der Mitte des Bildes zwei abgerundete Zellen mit deutlich gekrümmten DNA-Kernen dargestellt, deren DNA sich aufkondensiert. GSH-depletierte Zellen sind schutzloser gegen endogene Stressoren, die mit der Zeit beispielsweise bei der Atmung anfallen. Daher könnte BSO zu programmiertem Zelltod führen.



**Abb.79:** 24h-Inkubation, V79-Zellen, 1mM BSO (24h Vorinkubation + FKS + 24h Inkubation serumfrei).

Die mikroskopischen Bilder haben eine hohe Aussagekraft als Indiz für Apoptoseinduktion durch AA. Jedoch kann aufgrund der Bildausschnitte keine quantitative Aussage über das apoptoseinduzierende Potential von AA getroffen werden. Es konnte auch eine geringe Anzahl von in Apoptose befindlichen Zellen in der Kontrolle vorkommen, doch wurden in mit AA behandelten Gruppen eine größere Anzahl apoptotischer Zellen gefunden.

Apoptoseinduktion durch AA wird auch in der Neuro- und Reproduktionstoxikologie diskutiert. Subchronische Exposition von männlichen adulten Wistar-Ratten mit 20mg und 40mg AA/kg KG i.p. an drei Tagen der Woche beeinflusste die Expression von Proteinen des zentralen und peripheren Nervensystems, die in Verbindung mit Apoptose stehen (Li *et al.*, 2006). Nach Li und Mitarbeitern (2006) ist der Anstieg ein Indiz für frühe molekulare Regulationsmechanismen apoptotischer Prozesse in der Neuropathie durch AA.

In einer 8 Wochen-Studie zur Reproduktionstoxizität von AA wurde männlichen Ratten 5mg und 10mg AA/kg KG und Tag über das Trinkwasser verabreicht (oral). In den mit AA behandelten Ratten wurde bei der histologischen Untersuchung eine erhöhte Anzahl an Leydig-Zellen<sup>36</sup> um apoptotische *Tubuli seminiferi*, Kanälchen der Hoden-Läppchen, festgestellt (Wang *et al.*, 2007).

### **Zusammenfassung der Daten zur Apoptose**

Morphologischen Veränderungen zufolge induziert AA an V79-Zellen innerhalb von 24h im millimolaren Bereich Apoptose (s. apoptotische Vorstufen und Körperchen in Abb. 76). Es gibt morphologische Befunde als Hinweis darauf, dass dieser Effekt in Gegenwart von BSO bereits nach 6h eintritt. BSO führt nach insgesamt 48h selbst zu einem leichten Apoptose induzierenden Effekt. Es besteht unter nachhaltigem oxidativen Stress, wie er durch BSO ausgelöst wird, die Möglichkeit, dass AA an primären Hepatozyten der Wistar-Ratte als auch an V79-Zellen nach 24h Caspase-3-unabhängig Apoptose induziert (Ishihara *et al.*, 2005).

Es ist wahrscheinlich, dass nach 24h Inkubation mit 6mM AA bzw. 6h unter gleichzeitiger GSH-Depletion erhöhte DNA-Schweifintensitäten auf apoptotische Körperchen zurückzuführen sind.

---

<sup>36</sup> Leydig-Zellen produzieren Testosteron

## 7. Zusammenfassung

Acrylamid (AA) ist im Tierversuch krebserregend und als beim Menschen wahrscheinlich kanzerogen eingestuft (IARC, 1994). Bisher ist der Mechanismus noch nicht vollständig bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das genotoxische Potential von AA und dem *in vivo* gebildeten Metabolit GA an verschiedenen biologischen Endpunkten *in vitro* zu messen und damit die Datenbasis zur Risikoabschätzung für den Menschen zu verbessern. Desweiteren sollte der Einfluss von GSH und CYP 2E1 des Fremdstoffmetabolismus auf die Wirkung von AA in Säugerzellen untersucht werden.

AA und GA wurden in ihren DNA-strangbrechenden Kapazitäten, in den durch sie induzierten Mikrokernraten und der Bildung von DNA-Addukten miteinander verglichen. Dazu wurden zwei Zellsysteme unterschiedlicher Enzymausstattung verwendet und die GSH-Synthese mittels BSO inhibiert. AA vermittelt bis 6mM und 24h an primären Rattenhepatozyten und V79-Zellen nur marginale Effekte auf die DNA-Integrität. AA induziert weder Mikrokerne noch führt AA zu N7-Gua-Addukten in V79-Zellen. Im Gegensatz dazu zeigt GA durchweg in allen Testsystemen ab 100-600µM genotoxische Effekte. Dabei erwiesen sich die durch GA induzierten Mikrokerne in der CREST-Färbung als überwiegend klastogen. Im Comet-Assay ließ sich durch zusätzliche FPG-Behandlung eine DNA-Schädigung durch GA bereits ab 3µM an Rattenhepatozyten nachweisen. Eine wesentliche Rolle spielen dabei die N7-Gua-Addukte, die von FPG erkannt werden und auch nach 6h-Inkubation aus V79-Zell-DNA isoliert werden konnten. Unter GSH-Depletion reduziert AA die Viabilität beider Säugerzellsysteme und führt zu leicht erhöhten DNA-Schäden. Darauf hin durchgeführte Untersuchungen zur Zytotoxizität und Apoptoseinduktion geben Hinweise darauf, dass AA Caspase-3-unabhängig unter GSH-Depletion in Rattenhepatozyten Apoptose induziert und neben zytotoxischen (3-6mM, 24h) auch proliferative Effekte (300-600µM) an V79-Zellen zeigt. Der Vergleich der Zellsysteme führt zu dem Schluss, dass eine hohe CYP-2E1-Expression und -Aktivität nicht der einzige relevante Faktor für die Sensitivität gegenüber der DNA-strangbrechenden Kapazität von AA ist; Entgiftungsmöglichkeiten werden diskutiert.

Nach den Ergebnissen wird über AA-Exposition aus Lebensmitteln keine Dosis erreicht, die zu erhöhten Mikrokernfrequenzen oder DNA-Strangbruchraten an Säugerzellen geführt hat. GA zeigte sich genotoxischer als AA. Die Daten sind mit in die Riskobewertung von AA eingegangen.

## 8. Methoden

### 8.1 Zellkultur

#### 8.1.1 Zelllinien

##### a) Primäre Rattenhepatozyten

Für die Versuche wurden ausschließlich junge, gesunde und männliche Wistar-Ratten, welche ein Gewicht zwischen etwa 120-200g erreicht hatten, verwendet. Männliche Ratten können etwa 200-500g schwer und bis zu 4 Jahre alt werden.



Abb. 80: Wistar-Ratte (Albino)  
(<http://www.nlac.mahidol.ac.th/nlacwwwtha/rat.jpg>)

##### Gewinnung primärer Rattenhepatozyten

Die Leber ist der Hauptort des Fremdstoffmetabolismus. Ein Nachteil primärer Rattenhepatozyten ist die rasche Abnahme des Differenzierungsstatus. Primäre Rattenhepatozyten können bislang nur bis zu zwei/drei Tagen in Kultur gehalten werden. Die Leberzellen männlicher Wistar-Ratten wurden im Rahmen einer Studie des Arbeitskreises von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Schrenk (TU Kaiserslautern) gewonnen. Die Ratten erhielten eine Betäubungsdosis, die sicherstellte, dass die Tiere nicht wieder aus der Narkose erwachen.

### Durchführung

- Die Ratte betäuben und die Betäubung anhand der Reflexe überprüfen
- Ratte an den vorderen und hinteren Extremitäten mit Klebeband fixieren
- Bauchdecke öffnen
- Fäden einnähen (zum Verschließen des Blutgefäßes und Befestigen der Kanüle später)
- Schnitt ansetzen und ausbluten lassen
- Blutvolumen durch erste Ersatzflüssigkeit kompensieren (Gefäß zur Leber)
- wenn heraustropfende Flüssigkeit rosa gefärbt ist, Kreislauf mit externer Pumpe und Flüssigkeitsreservoir mit Kollagenase enthaltender 2. Ersatzflüssigkeit durch Zuziehen der Nähte am blutabführenden Gefäß schließen
- Wärmelampe dicht über Leber positionieren
- Nach 6-10min mit Pinzette Leber sanft andrücken (wenn Druckstellen kurz verbleiben, sind Zellen vereinzelt)
- Leber entnehmen
- Leber durch Nylonnetz pressen
- Suspension mit Waschpuffer spülen
- Zellsuspension durch ein dichteres zweites Netz geben
- Leberzellen zentrifugieren und mit Puffer waschen

Anschließend wird die Vitalität der Zellen mittels Trypan Blau-Ausschlusstest bestimmt (vgl. Kapitel 8.10.2).

Die Leberzellen werden auf mit Kollagen beschichteten Petrischalen in Williams E Medium (Sigma-Aldrich), versetzt mit 10% fötalem Kälberserum (Gibco), 1% L-Glutamin (Gibco) und 1% Penicillin/Streptomycin (10000 I.U./ml; 10mg/ml, Gibco), ausgestreut (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchte).

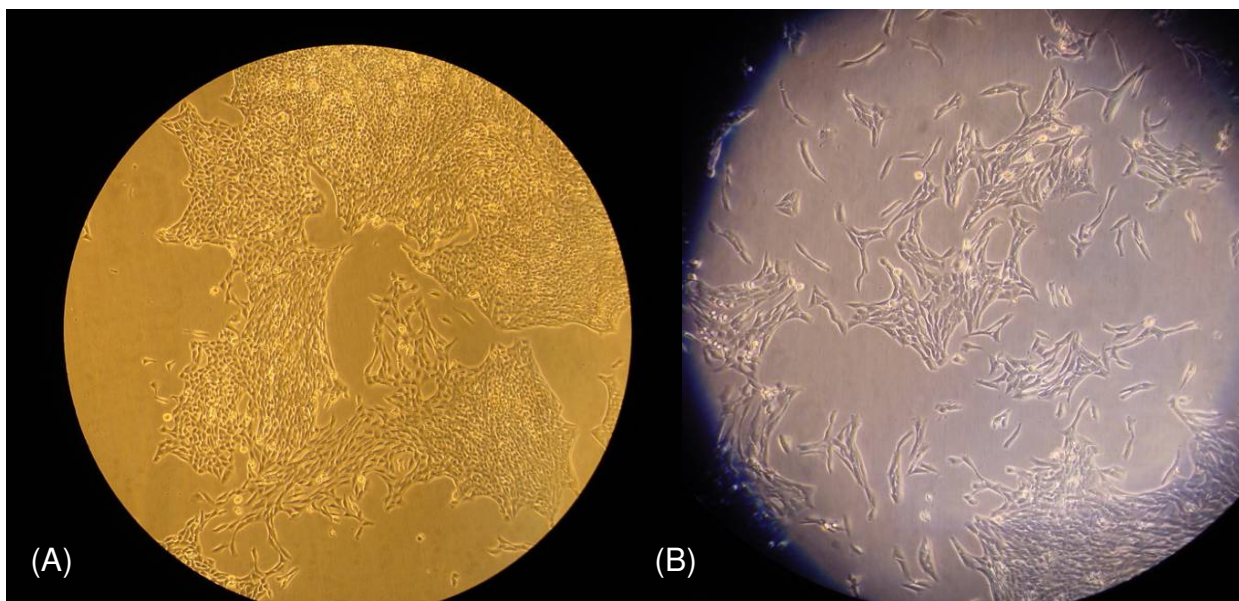
### **Beschichtung von Petrischalen für Primärkultur**

Die primären Hepatozyten benötigen eine besondere Beschichtung am Boden einer Kulturschale, um anhaften zu können. Dazu wird Kollagen aus dem Rattenschwanz gewonnen und bei 4 °C in 50ml-Tubes aufbewahrt (Kunz, 2004). Der Bodensatz darf nicht aufgeschüttelt werden. Für die vorliegende Arbeit wurden Restbestände von Herrn Kamp verwendet (Kamp, 2004). Etwas klare Kollagenlösung wird in eine Petrischale überführt, diese geschwenkt bis der Boden bedeckt ist und der flüssige Über-

stand möglichst vollständig in die nächste Petrischale überführt (leichtes Ausklopfen), bis alle Schalenböden bedeckt sind. Anschließend werden die Böden bei Raumtemperatur getrocknet und unter einer UV-Lampe für mindestens 30-60min sterilisiert (Lagerung <1 Woche).

### b) V79-Zellen

V79-Zellen sind Lungenfibroblasten eines chinesischen Hamsters. Die immortalisierten Zellen wurden bereits 1958 einem Hamster-Lungengewebe entnommen und sind inzwischen toxikologisch etabliert. Sie wachsen adherent und in Klumpen. Ihre Morphologie ist gemäß ihrer Herkunft fibroblastenähnlich. Ihre Verdopplungszeit beträgt ca. 16h (DSMZ, 2006). Kultiviert wurden sie in Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM, Gibco) bei 37°C, 5 CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit %. Das Medium wurde zusätzlich mit zehn Prozent (v/v) fötalem Kälberserum (FKS, Gibco) versetzt.



**Abb. 81: V79-Zellen, eigene Arbeit, Durchlichtmikroskop (A) Blick in die Kulturflasche; Klumpenbildung (B) Petrischale**

Prophylaktisch erfolgte die Supplementierung des Mediums mit einem Prozent eines Antibiotika-Gemisches aus Penicillin und Streptomycin. In Abb. 81 sind unbehandelte V79-Zellen zu sehen. Sie sind angewachsen und haben ihre Fibroblastenstruktur ausgebildet. Kugelige Zellen sind gerade in Teilung befindlich. Deutlich zu erkennen ist auch das Wachstum in Klumpen (s. Abb. 81 A).

### 8.1.2 Auftauen von Zellen

Bei -80 °C kryokonservierte Zellen werden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und die darin befindliche DMSO-Konzentration direkt durch Zugabe von 10ml Medium verdünnt. Die Zellsuspension wird bei 200 x g für 4 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in frischem 20% FKS-haltigen Medium (37 °C) aufgenommen. Die Suspension wird in eine Kulturflasche überführt und die Zellen bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert (Lindl, 2000). Vor der ersten Verwendung werden den Zellen mind. 14 Tage Zeit zum Anwachsen, Regenerieren und Proliferieren in Kultur gegeben. Zudem werden sie mikroskopisch betrachtet und auf Mykoplasmen getestet (vgl. Kapitel 8.1.6).

### 8.1.3 Mediumwechsel

**a)** Die primären Rattenhepatozyten erhalten nach 2h in FKS-haltigem Medium (10% FKS) einen Mediumwechsel auf Insulin-Transferrin-Selenium (ITS, Gibco Invitrogen)-haltiges Medium (1% v/v). ITS-Medium ist das verwendete serumfreie Inkubationsmedium: Die Primärkultur wird 2h nach Entnahme aus dem Tier und Ablegen der Zellen für den Versuch verwendet. Das Medium mit nicht abgelegten toten Zellen wird vom Rand her abgesaugt. Man lässt HEPES-haltige phosphatgepufferte Kochsalzlösung (HPBS) aufgrund der Empfindlichkeit dieser Zellen nur eintropfen. Dies gilt auch für die Zellsuspension und Mediumzugabe. Der Puffer wird abgesaugt und anschließend das Inkubationsmedium zugetropft.

**b)** Bei V79-Zellen wird ein Mediumwechsel alle drei bis vier Tage, aber spätestens, wenn die Nährstoffe des Mediums verbraucht sind, durchgeführt. Mit dem Verbrauch der Nährstoffe nehmen auch die Stoffwechselprodukte der Zellen zu. Das Medium enthält einen Indikator, der eine pH-Wert-Änderung durch Umschlag von rot nach gelb anzeigt. Das Medium wird in diesem Fall abgesaugt und die abgestorbenen Zellen mit etwa 5ml PBS entfernt. Anschließend wird das verbrauchte Medium durch neues vortemperiertes Medium ersetzt (Lindl, 2000). Bei Auftreten einer Kombination aus Nährstoff- und Platzmangel wird direkt passagiert (8.1.4), was bei V79-Zellen aufgrund der hohen Zellteilungsrate häufig eintritt.



a) HPBS		(10x)	b) PBS	
2,383g	HEPES			
100g	NaCl		171mM	NaCl
14g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		10mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2,5g	KCl		3,4mM	KCl
2,5g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		1,8mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> <sup>37</sup> auf 1l auffüllen, pH 7,4			mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen, pH 7,4	

### 8.1.4 Passagieren

Bei Zellen in Kultur handelt es sich um immortalisierte oder entartete Krebszellen, welche sich ungehemmt teilen. Daher müssen sie aktiv immer wieder ausgedünnt werden. Viele Zellen, darunter die V79-Zellen, wachsen als Monolayer und bedecken den Kulturflaschenboden innerhalb einer Woche. Benachbarte Zellen können Zell-Zell-Interaktionen eingehen und Stress bei zu hoher Zelldichte auslösen. Zum Ausdünnen werden die am Boden anhaftenden (adherenten) Zellen mithilfe des Enzyms Trypsin angedaut, damit sie vom Boden ablösbar sind. Um weiteren Stress/ Schaden durch Trypsin zu vermeiden, wird nach einigen Sekunden dieses mittels FKS inaktiviert. Die „Abtrypsinierzeit“ beträgt bei V79-Zellen etwa 30sec bis 1min und ist von Zell- zu Zelllinie unterschiedlich. Wenige Zellen werden in die Kulturflasche zurückgegeben oder in eine neue überführt. Bei diesen Zellen handelt es sich nun um eine um eins erhöhte Passage. Die Zellen werden meist mit einer niedrigen Passage und Angabe ihrer Eigenschaften geliefert. Mit zunehmender Anzahl an Zellteilungen können natürliche Fehler auftreten: es besteht die Gefahr von Mutationen und veränderten Zelleigenschaften wie beispielsweise eine veränderte Rezeptordichte bei A431-Zellen. Zur Vermeidung dieser unerwünschten Effekte werden junge Zellpassagen eingefroren und die Zellen zelllinienabhängig nach ca. 30 Passagen verworfen (Lindl, 2000).

<sup>37</sup> bidest: bidestilliert (zweifach destilliert)

### Durchführung

- Medium absaugen
- Zellen mit PBS von abgestorbenen Zellen sowie Mediumresten befreien
- Zellen mit 2,5ml Trypsinlösung überschichten (30sec bis 1min)
- 40ml vorgewärmtes Medium zugeben
- bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchte weiterkultivieren

### Trypsin

0,05g (3,6 Units/ mg) Trypsin

0,86mM EDTA

mit PBS auf 100 ml auffüllen, auf Eis über Nacht rühren, durch einen Ø 0,2µm Filter sterilfiltrieren, aliquotieren und bei -20 °C lagern

## **8.1.5 Einfrieren und Lagern von Zellen**

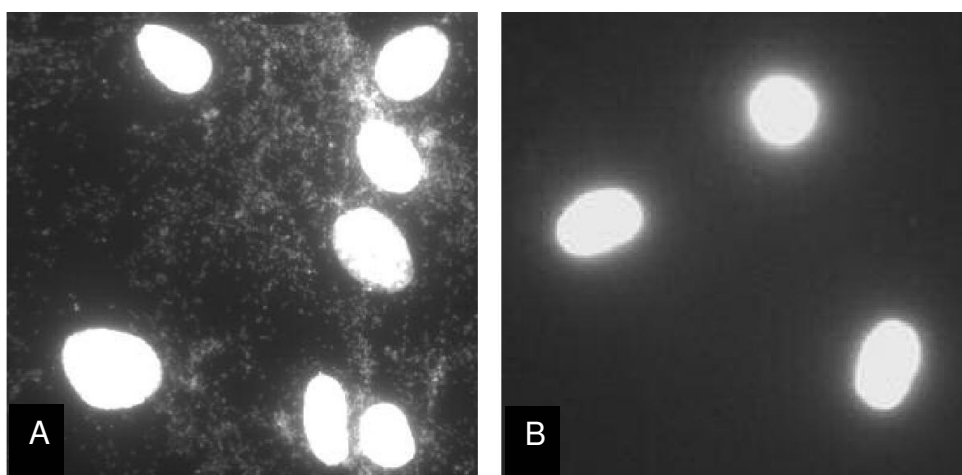
Nach dem Passagieren wird die trypsinhaltige Zellsuspension 5min bei 200 x g zentrifugiert. Das Medium wird verworfen und das Zellpellet in 10ml serumhaltigem Medium resuspendiert. Zum Einfrieren versetzt man die Zellsuspension mit 10% DMSO, damit Kristallbildung verhindert wird, was die Zellen zerstören würde. Da DMSO jedoch in dieser Konzentration zelltoxisch wirkt, ist darauf zu achten, dass die Zellsuspension innerhalb etwa einer Minute zu je 1ml aliquotiert und in -80 °C Umgebung herunter gekühlt wird. Es werden Kryoröhrchen mit Barcode von Greinerbioone verwendet. Die Lagerung kann mehrere Monate bei -80 °C oder langfristig in flüssigem Stickstoff erfolgen. Für die Aufbewahrung in Stickstoff sollten die Zellen zunächst im Biofreezer Sanyo Fisher „langsam“ eingefroren werden (Lindl, 2000).

## **8.1.6 Mykoplasmentest**

Allgemein werden Zellen unter möglichst sterilen Bedingungen kultiviert, um Kontaminationen mit Bakterien und Pilzen zu vermeiden. Mykoplasmen sind eine Gruppe sehr kleiner (0,8µm) pleomorpher Bakterien, die gegen Penicillin und seine Derivate resistent sind, denn sie weisen statt einer Zellwand nur eine dreischichtige Zytoplasmamembran auf (Falbe und Regitz (Hrsg.), 1999). Die Folge einer Kontamination können schwerwiegende Veränderungen wie veränderte Stoffwechsellagen in den infizierten Zellkulturen sein.

Ein Nachweis kann mit einem DNA-Fluorochrom wie DAPI<sup>38</sup> durchgeführt werden. Für einen Mykoplasmentest wird ein Objektträger in eine passende Petrischale gelegt und mit ein paar Tropfen Zellsuspension beschichtet. Die Petrischale wird mit 10ml entsprechendem Kulturmedium aufgefüllt. Nach einem Tag wird der bewachsene Objektträger aus dem Medium herausgehoben, mit -20 °C vorgekühltem Methanol übergossen und die Zellen für mindestens 60min in -20 °C kaltem Methanol fixiert. Mit einigen Tropfen DAPI/Sulfo $\rho$ rhodamin (SR) 101-Lösung färbt man an. Nach Auflegen eines Deckglases und Auftragen eines Öltropfens werden die Zellen im Ölimmersionssystem unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. DAPI bindet selektiv an DNA und bildet fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe hoher Spezifität. Die DNA-DAPI-Komplexe erscheinen blau-weißlich, während das Plasmaprotein rot (SR 101) eingefärbt ist. Wenn im roten Plasmabereich außerhalb der Zellkerne kleine weißlich-blaue Punkte, meist um den Zellkern herum, zu sehen sind, liegt eine Mykoplasmenkontamination vor (Lindl, 2000). Die Abwesenheit von Mykoplasmen wurde in routinemäßig alle 14 Tage kontrolliert.

DAPI/SR 101-Lösung      50,2M Tris-HCl, pH 7,6  
                                 0,2M NaCl  
                                 8 $\mu$ M DAPI  
                                 50 $\mu$ M SR 101  
                                 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auffüllen



**Abb. 82: A) Mykoplasmeninfektion**  
(Roche, 1999)

**B) Mykoplasmenfrei**

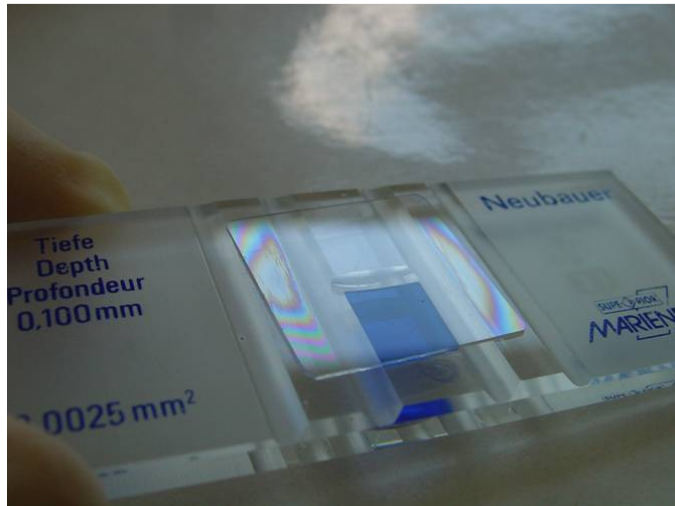
<sup>38</sup> DAPI: 4'-6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid

### **Eliminierung von Mykoplasmen**

Eine Eliminierung von Mykoplasmen (s. Abb. 82 A) ist über eine mehrzyklische Behandlung mit einer Antibiotika-Kombination von BM-Cyclin 1 und 2 möglich. Bei BM-Cyclin 1 handelt es sich um ein Pleuromutilin-Derivat, bei BM-Cyclin 2 um ein Tetracyclin-Derivat. Die BM-Cycline wirken u.a. gegen *Acholesplasma laidlawii*, *Mycoplasma argini*, *Mycoplasma hyorhinis* und *Mycoplasma orale*. Dabei handelt es sich um Stämme, welche für mehr als 85% der Kontaminationen in tierischen Zellkulturen verantwortlich sind (Produktinformation, Roche, 1999). Die infizierten Zellen erhalten in ihrer Kulturflasche nach Mediumwechsel 40ml Medium mit 10µg/ml BM-Cyclin 1. Nach drei Tagen wird das Medium gegen BM-Cyclin 2-haltiges (5µg/ml) ausgetauscht und bei Bedarf passagiert. Nach vier Tagen werden die Zellen wiederum für drei Tage mit BM-Cyclin 1 inkubiert. Der Behandlungszyklus wird noch einmal vollständig durchgeführt, nachdem keine Mykoplasmen mehr optisch nachweisbar sind.

### 8.1.7 Zellzahlbestimmung

Für reproduzierbare Experimente müssen definierte Zellzahlen ausgestreut werden. Für die Bestimmung der Zellzahl ist es erforderlich, dass man eine Zellsuspension mit gut vereinzelt Zellen vorliegen hat. Die Neubauer Zählkammer (Marienfeld)

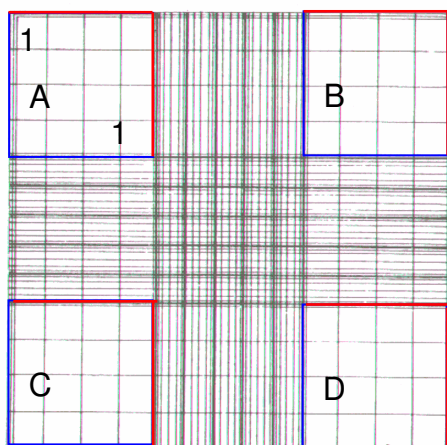


**Abb. 83: Neubauer Zählkammer: Newton'sche Ringe garantieren den richtigen Abstand.**

besteht aus einer Glasplatte mit exakt definierter Vertiefung und unter dem Mikroskop erkennbarem Zählgitter. Ein Deckglas wird angehaucht und auf die Zählkammer angedrückt. Newton'sche Ringe garantieren den richtigen Abstand. Ein Aliquot Zellsuspension wird an den Rand der Neubauer Zählkammer gegeben, so dass sich die Zählkammer voll saugt. Es werden die Zellen von vier Quad-

ranten (s. Abb. 84) ausgezählt. Bei den Zellen, die auf dem Rand der Quadrantenmarkierungen liegen, verfährt man folgenderweise: bei zwei von vier Seitenbegrenzungen werden die Zellen mitgezählt, die auf dem Rand liegen.

Die durchschnittliche Zellzahl je Quadrant wird mit dem Volumenfaktor der Zählkammer (10.000) multipliziert. Man erhält somit die Zellzahl pro ml (Lindl, 2000).



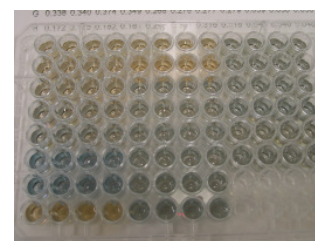
**Abb. 84: Neubauer Zählkammer; Lindl (2000), modifiziert.**

## 8.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wird nach Bradford (1976) durchgeführt. Sie beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des freien Farbstoffes von 465nm auf 595nm, wobei der Anstieg der Absorption bei 595nm detektierbar und zur Menge an Protein proportional ist. Innerhalb von 2min findet die Bindung ans Protein statt und ist für 1h stabil. Nur wenige Pufferkomponenten wie Triton-X-100 (abhängig von der Menge) können zur Farbveränderung führen. Der Einfluss geringer Detergenzmengen auf die Absorption wird durch eine mitgeführte Pufferkontrolle eliminiert.

### Durchführung

Zunächst wird eine Eichreihe mit Konzentrationen zwischen 0,1 und 1mg Protein/ml durch Verdünnung des Proteinstandards BSA [2mg/ml] mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  erstellt. Die Probe wird je nach zu erwartendem Proteingehalt entsprechend verdünnt. Der Probenpuffer wird ebenfalls als Blindwert im gleichen Verhältnis wie die Probe verdünnt. Zu jeweils 10 $\mu\text{l}$  der so erhaltenen Messreihe wird 1ml Bradford-Reagenz mit der Multipipette zugegeben und die Mischung gevortext, bevor man der Bindungsreaktion 5 Minuten Zeit lässt. Zur Messung werden je 200 $\mu\text{l}$  Testlösung in ein Loch einer 96-Loch-Platte in Doppelbestimmung überführt. Die Platte wird im Microplate Reader (450 Biorad oder GENios Tecan) bei 595nm vermessen. Die Proteinbestimmung erfolgt nach Abzug des Blindwertes von der Probe über lineare Regression mit Hilfe der Eichgeraden.



**Abb. 85: Proteinbestimmung, Bradford**

### Bradford-Reagenz

Coomassie Brilliant Blue G-250	100mg
EtOH (100%)	50ml
$\text{H}_3\text{PO}_4$ (85%)	100ml
mit $\text{Aqua}_{\text{bidest}}$ auf 1l auffüllen	(850ml)
filtriert etwa 1 Monat im Dunkeln vor Verwendung stehen lassen	

## 8.3 Glycidamid

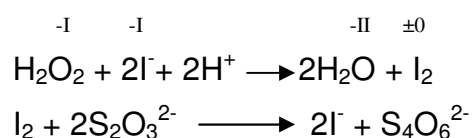
### 8.3.1 Synthese von Glycidamid

Die Synthese wurde mithilfe von Dr. Karlheinz Merz und Peter Mertes der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Eisenbrand an der Technischen Universität Kaiserslautern durchgeführt (Payne und Williams, 1961; Stephanie, 2003).

Wie in der Abb. 38 (Kapitel 4.1) dargestellt ist, reagiert Acrylnitril ( $M_r$  53.06) mit Wasserstoffperoxid ( $M_r$  34.01) im basischen Milieu zum Epoxid GA ( $M_r$  87.08).

Es werden 500ml Wasser und 1mol Wasserstoffperoxidlösung (30%) in einem 1000ml-Kolben vorgelegt und 1,22mol Acrylnitril hinzugefügt. Man hält die Temperatur während der Reaktionszeit mithilfe eines Wasserbades und Eis auf 35 °-37 °C. Die Reaktion wird durch siebenstündiges Zutropfen von 60ml 1M Natronlauge durchgeführt, wobei der pH-Wert konstant zwischen pH 7,3 und pH 7,5 gehalten wird.

Es folgt eine jodometrische Bestimmung des nicht umgesetzten Wasserstoffperoxides, um sicher zu stellen, dass sich kein explosives Acetonperoxid bildet. Dazu titriert man ein Gemisch aus Reaktionslösung und NaI-Lösung mit 0,1M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gegen Stärke.



Das Reaktionsgemisch wird entweder direkt oder nach Abfiltrieren von über Nacht gebildetem Niederschlag eingeeengt. Durch Zugabe von Aceton (400ml) geht GA in Lösung, welche filtriert und dann am Rotationsverdampfer und im Ölpumpenvakuum getrocknet wird. Unter Argon-Schutzatmosphäre lässt man das hygroskopische GA aus trockenem Aceton bei -20 °C langsam auskristallisieren.

### 8.3.2 Einwaage des Glycidamid unter Argon

Da GA naszierend und hygroskopisch ist, wird GA unter Schutzatmosphäre wasserfrei eingewogen und aufbewahrt (-20 °C). Dazu wird ein leerer Kolben ausgeheizt, Vakuum darauf gezogen und dann mit Argon befüllt und gewogen. Dann wird von einem Vorratskolben in den leeren Kolben unter Argonstrom GA umgefüllt und anschließend der Kolben mit der frisch abgefüllten Menge abgewogen und gegen das

Leergewicht verrechnet. Das GA wird in DMSO aufgenommen und kann dann an der Luft weiter verwendet werden (Vorgehensweise an TU Kaiserslautern).

Möglich ist auch die Einwaage im Vakuumsystem mittels Schleuse. Dazu müssen Klebestreifen vom Kolben entfernt werden, um sicher zu stellen, dass darunter keine Luft eingeschlossen sein kann. Nach etwa einer halben Stunde in der Schleuse kann der geöffnete Kolben ins Innere des Systems eingebracht werden. Über integrierte Handschuhe kann man von außen ins Innere der Vakuumbbox greifen und das GA abfüllen. Eine elektronische Feinwaage im System ist mit einem Drucker im Außenraum verbunden und übermittelt die Einwaage (AK Feldmann, TH Karlsruhe).

## **8.4 Glutathion**

### **8.4.1 Glutathion-Depletion in Zellen**

Die  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase katalysiert den ersten und limitierenden Schritt der GSH-Synthese. Er kann durch BSO effektiv inhibiert werden (Kelly *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005).

GSH-Synthese:  $L\text{-}\gamma\text{-Glutamyl-L-cystein} + \text{Glycin} + \text{ATP} \rightarrow \text{GSH} + \text{ADP} + \text{P}_i$

#### **BSO-Behandlung**

Eine Reihe von Versuchen sollte unter GSH-Defizit durchgeführt werden. Dazu wurde die GSH-Neusynthese bereits 24h zuvor mittels BSO (Sigma-Aldrich) gehemmt. Um einen Anstieg während der Inkubation zu verhindern, wird neben der Testsubstanz wiederholt BSO zugefügt. Die BSO-Behandlung besteht daher aus einer Vor- und Koinkubation.

Zur GSH-Depletion werden die Zellen 24h mit 1mM BSO in a) HPBS und b) PBS mit Lösungsmittelkonzentration von 1% in a) ITS- und b) FKS-haltigem Medium vorinkubiert. BSO wird vor Gebrauch frisch angesetzt, zum Lösen auf 37°C erwärmt, und mittels Membranfilter (Rotilabo-Spritzenfilter, steril, Carl-Roth) über 0.2 $\mu$ m steril filtriert. Die Koinkubation erfolgt für die Dauer der Inkubation mit der Testsubstanz mit 1mM BSO in a) HPBS und b) PBS (1% v/v) in a) ITS- und b) serumfreiem Medium. Eine Lösungsmittelkontrolle enthält zusätzlich zum Lösungsmittel DMSO, in der die Testsubstanz gelöst ist, 1% a) HPBS oder b) PBS (Lösungsmittel des BSO).



Der  $EC_{50}$ -Wert (effect concentration) ist die Konzentration, bei der der GSH-Gehalt um 50% erniedrigt ist und wird über eine lineare Regression berechnet.

Berechnung des  $EC_{50}$  mit Achsenabschnitt A und Steigung B der linearen Regressionsgeraden aus  $y = A + B \cdot x$

$$EC_{50} = \frac{50 - A}{B}$$

$$\text{Fehler des } EC_{50} : \Delta EC_{50} = \sqrt{\left(-\frac{1}{B}\right)^2 \times (m_A)^2 + \left(\frac{A-50}{B^2}\right)^2 \times (m_B)^2}$$

mit  $m_A, m_B$ : Fehler von A und B.

### 8.4.2 Bestimmung des Glutathiongehaltes

Die Glutathionbestimmung wird mit Hilfe eines kinetischen Assays nach Gallagher und Mitarbeitern (1994) durchgeführt.

Als erstes werden in Petrischalen mit 92mm Durchmesser je nach Zelllinie a) 6 Mio primäre Rattenhepatozyten oder b) 1Mio V79-Zellen in 10ml Medium ausgestreut. Wie bei allen Versuchen mit der Primärkultur wird nach 2h das Medium mit FKS gegen Medium mit ITS nach einem HPBS-Waschschritt ausgetauscht. Im Folgenden handelt es sich beim verwendeten Puffer bei der Primärkultur um HPBS, bei V79-Zellen um PBS. Je nach Fragestellung wurden die Zellen entweder direkt nach der Ablegephase von a) 2h bzw. b) 24h für 24h mit BSO oder nach 24stündiger Vorinkubation mit AA oder GA inkubiert. Als Negativkontrolle dient das entsprechende Lösungsmittel: Puffer (BSO) oder DMSO (AA/GA). Da BSO selbst ein potenter Inhibitor der  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase ist (Kelly *et al.*, 2002), dessen Wirkung und Wirkkonzentration im vorliegenden Zellsystem nachgewiesen werden soll, benötigt es keiner weiteren Positivkontrolle. Zur Reduktion des Substanzverbrauches wurde das Volumen des Inkubationsmediums auf 6ml gesenkt.

Nach der Inkubation wird der Mediumüberstand abdekantiert, die Zellen mit 5ml Puffer mediumfrei gewaschen und unter ca. 30 sekundiger Einwirkung von 1ml Trypsin vom Boden gelöst. Zum Lösen der Leberzellen von der beschichteten Platte werden Zellschaber (Wheaton Science) eingesetzt. Für die weiteren Schritte erfolgt die Aufarbeitung auf Eis. Die Zellen werden mit 3x 1ml Medium in ein 15ml-Röhrchen überführt, wobei der erste Milliliter zum Deaktivieren des Trypsins 10% Serum enthält, die zwei darauf folgenden nicht. Die Zellsuspension wird bei 1500rpm und 4°C für 10min in der Zytofuge zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert. Das Zellpellet wird in 1ml A+B-Puffer aufgenommen, resuspendiert und in ein 2ml-Reaktionsgefäß über-

führt. Nachgespült wird mit 2x 300µl A+B-Puffer. Die Suspension wird anschließend in der Eppendorf-Zentrifuge bei 4°C und 2000rpm für 10min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Zellpellet in 370µl A+B-Puffer aufgenommen, gut resuspendiert und 20µl für eine Proteinbestimmung nach Bradford (vgl. Kapitel 8.2) eingesetzt. Zu den übrigen 350µl werden 350µl 10%ige Sulfosalicylsäure (sulfosalicylic acid, SSA) zugegeben (Endkonzentration 5% SSA), das Reaktionsgefäß mit einer zusätzlichen Verschlusskappe abgedichtet und direkt in flüssigen Stickstoff getaucht. Die Proben werden bis zur Messung bei -80°C gelagert.

Zur Messung werden die Proben zunächst auf Eis erwärmt und dann bei RT aufgetaut. Nach dem Auftauen werden sie bei 4°C und 13.000rpm 15min lang zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt, gevortext und im Assay verwendet.

### **Derivatisierung zur Bestimmung des oxidierten Glutathion-Gehaltes: GS-SG**

Zunächst muss reduziertes GSH derivatisiert werden, um bei der photometrischen Reaktion ausschließlich GSSG messen zu können. 250µl der jeweiligen Probe, GS-SG-Standard und der Blank (Hintergrund) werden parallel behandelt, mit 100µl 50% Triethanolamin (wässrig; w/v) versetzt und 10µl monomeres 2-Vinylpyridin unter dem Abzug zugefügt. Ein Thermomixer (Modell 5436, Eppendorf) sorgt für konstante 26°C und stetes Durchmischen des Reaktionsgemisches bei 600rpm. Nach 1h ist die Reaktion abgeschlossen. Je nach zu erwartendem GS-SG-Gehalt werden 20-40µl für die Bestimmung eingesetzt. Das Messprinzip entspricht der Bestimmung des Gesamt-GSH-Gehaltes. Nur das Volumen des A+B-Puffers ist dem eingesetzten Probenvolumen anzupassen, so dass das Gesamtvolumen je Probe 200µl beträgt.

### **Bestimmung des Glutathion-Gehaltes**

Auf eisgekühlter Unterlage werden in Doppelbestimmung 10µl der jeweiligen Probe pro Well in eine 96-Lochplatte vorgelegt. Derivatisierte Proben werden zur Vermeidung von Geruchsbelästigung und Verätzung der Atemwege unter einem Abzug pipettiert. Eine Standardreihe (6 bekannte Konzentrationen GSH zw. 5µM und 160µM bzw. bei GS-SG zwischen 1,25µM und 40µM; GSH und GS-SG von Sigma-Aldrich) sowie ein Blank für die Hintergrundabsorption werden mitgeführt. In einem Flüssigkeitsreservoir werden frische Lösungen A+B-Puffer, NADPH-Lösung, Glutathion-S-Reduktase und DTNB-Lösung im abgedunkelten Raum vermischt.

Endkonzentrationen im Well bei einem Gesamtvolumen von 200 $\mu$ l:

400 $\mu$ M NADPH

$\frac{1}{2}$  Unit/ml Glutathion-S-Reduktase

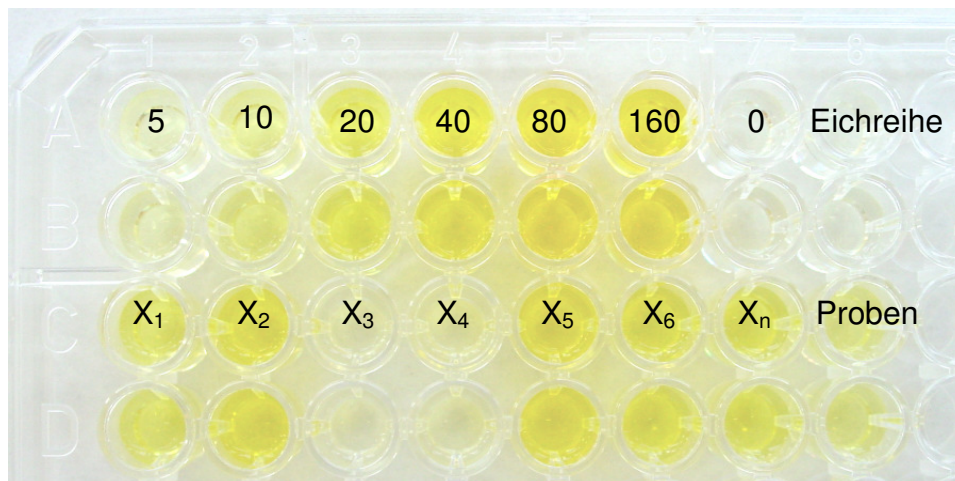
600 $\mu$ M DTNB

(in A+B-Puffer)

Die Reagenzienmischung wird mit einer Mehrkanalpipette zügig zugegeben.

Die Platte wird lichtgeschützt in das Mult-Plattenlesegerät „Victor<sup>3</sup>V“ (Perkin Elmer) verbracht und vermessen. Nach 30 Sekunden sollen die Proben 30 Sekunden geschüttelt und dann bei 405nm (0,1sec/Loch) gemessen werden. Die Messung ist nach der 10. Wiederholung abgeschlossen. Ausreichend hohe Absorptionswerte für GSH sind nach 2min; für GS-SG nach 10min erreicht.

Die Absorptionswerte werden gemittelt, über lineare Regression der Eichreihe die Konzentration [ $\mu$ M] Gesamt-GSH oder GS-SG ermittelt und auf die eingesetzte Proteinmenge bezogen.



**Abb. 86: GSH-Assay: Bild einer 96-Loch-Platte nach der Messung**

Gebrauchslösungen:

1mM GSH in Aqua<sub>bidest.</sub> mit 5% SSA; Aliquots bei -80 °C lagern

1mM GS-SG in Aqua<sub>bidest.</sub> mit 5% SSA; Aliquots bei -80 °C lagern

6mM 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) in A+B-Puffer (1:10 im Assay)

dunkel aufbewahren

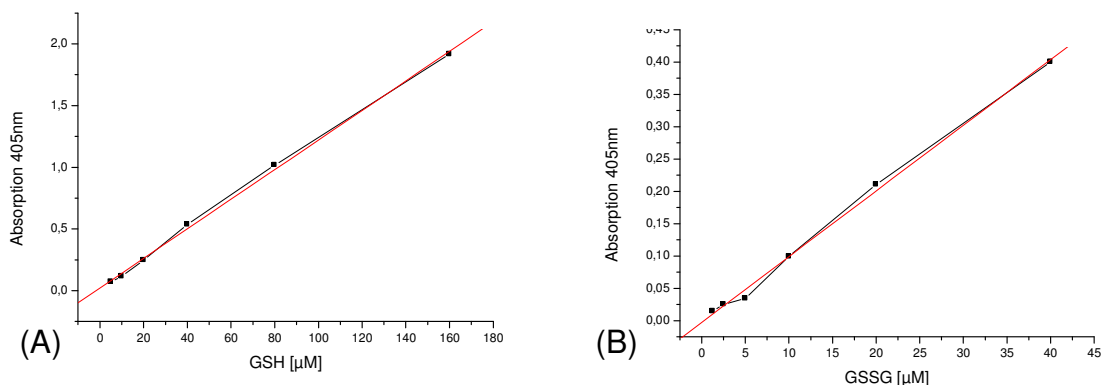
50U/ml Glutathion-S-Reduktase (1:100 im Assay)

20mM NADPH in 0,5% wässrigem NaHCO<sub>3</sub> (1:50 im Assay)

5% (w/v) SSA in Aqua<sub>bidest.</sub>

10% (w/v) SSA in Aqua<sub>bidest.</sub>

- Puffer A     4,25g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
               0,585g  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$   
               in 250ml  $\text{Aqua}_{\text{bidest.}}$ ; bei 4 °C aufbewahren
- Puffer B     10,875g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (14,264g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )  
               1,17g  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$   
               in 500ml  $\text{Aqua}_{\text{bidest.}}$ ; bei 4 °C aufbewahren
- A+B-Puffer  15% (v/v) Puffer A  
               85% (v/v) Puffer B



**Abb. 87: Repräsentative Eichreihen (A) GSH (B) GSSG**

## 8.5 Nachweis von CYP-450 2E1

Mittels WesternBlot wurde nachgewiesen, ob CYP 2E1 in den verwendeten Zellen exprimiert wurde. Der Nachweis der Aktivität erfolgte mit Hilfe einer enzyspezifischen Umsetzung eines Substrates.

### 8.5.1 Nachweis des CYP-450-2E1-Gehaltes mittels SDS-PAGE und Western-Blot

Bei der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine ausschließlich nach ihrer Molekülgröße, welches mit ihrem Molekulargewicht (MG [kDa]) korreliert, aufgetrennt. Hierzu werden die unterschiedlichen Ladungen von Aminosäuren durch das Detergenz SDS negativ überdeckt. Zusätzlich gehen eine Hitze-Denaturierung und Aufspaltung der Disulfidbrückenbindungen der eigentlichen Protein-Auftrennung voraus. Sie erfolgt nach Proteinaufgabe auf ein Polyacrylamidgel mit wählbarer Porengröße und Anlegen eines elektrischen Feldes.

Es werden Zellsuspensionen von 6Mio Zellen (V79-Zellen, CaCo-2-Zellen, primäre Rattenhepatozyten) 5min bei 800rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und die Zellen mit 500µl entsprechendem Puffer (PBS oder HPBS) gewaschen. Der Zentrifugationsschritt wird wiederholt, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200µl RIPA-Puffer aufgenommen. Für die Untersuchung der Proteinexpression an primären Rattenhepatozyten in Abhängigkeit ihrer Kultivierungsdauer werden 6Mio Zellen pro Petrischale ausgestreut. Der Versuch wird in Doppelbestimmung durchgeführt, d.h. zwei Petrischalen/Probe(nentnahmezeitpunkt) und Beladung zweier Geltaschen im späteren Gellauf. Die Zellen werden mit 200µl RIPA-Puffer/PS abgeschabt und gepottert.

Auf Eis werden zunächst 40 Hübe auf die Zellen im Handpotter (Glas, Wheaton Science) ausgeübt. Dann lässt man 10min auf Eis lysieren und pottert wiederum mit 40 Hüben. Die Proben werden 20sec gevortext. Abschließend werden die Proben bei 4°C für 10min bei 14.000rpm zentrifugiert. Nun wird 20µl für eine Proteinbestimmung nach Bradford entnommen (vgl. Kapitel 8.2). Die Proben können bei -80°C eingefroren werden.

#### RIPA-Puffer

50mM Tris/HCl, pH 7,4  
150mM NaCl  
1% (v/v) Igepal  
1mM EDTA

direkt vor Gebrauch zusetzen (zu 1ml):

5µl Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (200mM Stocklösung)  
2µl NaF (500mM Stocklösung)  
1µl Leupeptin  
1µl Pepstatin  
10µl PMSF (100mM Stocklösung)

#### 200mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

pH 10 einstellen

mehrfach aufkochen und abkühlen lassen, bei -20°C lagern.

Durchführung der Diskontinuierlichen SDS-PAGE

Um schmale Proteinbanden zu erhalten, werden sowohl ein Trenngel, als auch ein Sammelgel unterschiedlicher Dichten und pH-Werte übereinander gegossen. Im 4%igen Sammelgel werden mithilfe eines Kammes die Beladungstaschen ausgebildet.

Zunächst wird ein 12%iges Polyacrylamid-Trenngel gegossen.

**Tab. 04: Zusammensetzung eines Trenngels (pro Gel)**

1,72ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
1,23ml	1,5M Tris, pH 8,8
1,97ml	Acrylamid (30%)
49,2µl	SDS (10%)
24,6µl	Ammoniumperoxodisulfat (10%)
2,46µl	Tetramethylethylendiamin

Die Reagenzien werden vorgemischt und zügig in eine vorbereitete Gelkammer eines entfetteten Gießstandes gegeben. Monomeres AA geht hier eine radikalische Kettenreaktion ein. Man sollte das AA stets vollständig auspolymerisieren lassen (vgl. Kapitel 1). Das Gel wird zwecks Sauerstoffausschluss und Grenzschichtbildung mit n-Butanol überschichtet und kann bei 4 °C über Nacht aufbewahrt werden. Direkt vor dem Gießen des Sammelgeles wird das Butanol wieder entfernt und ein Kamm mit der gewünschten Anzahl an Geltaschen eingesetzt.

**Tab. 05: Zusammensetzung eines Sammelgels (pro Gel)**

1,2ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
0,5ml	0,5M Tris, pH 6,8
0,25ml	Acrylamid (30%)
20µl	SDS (10%)
20µl	Ammoniumperoxodisulfat (10%)
2µl	Tetramethylethylendiamin

Das Sammelgel wird möglichst luftblasenfrei und zügig gegossen. Nach 45min kann der Kamm gezogen werden. Die Beladungstaschen werden mit einer Kanüle gesäubert, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist.

Probenaufgabe und Gellauf

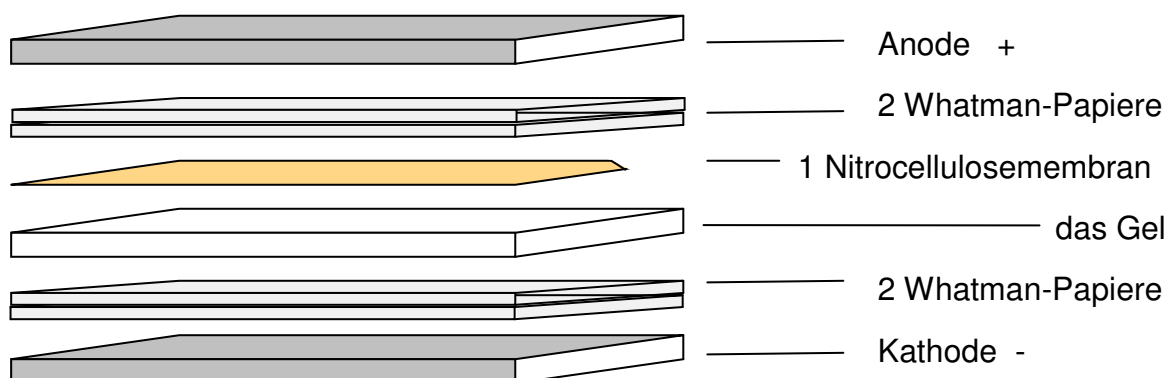
Das Gel wird vom Gießstand in die Elektrophoresekammer (Peqlab Biotechnologie GmbH) überführt und diese mit Laufpuffer aufgefüllt. 2mg/ml Protein werden mit (6x konzentriertem) SDS-Probenpuffer versetzt und für 5min bei 95 °C erhitzt.

Nun werden 40µg Protein je Probe und Tasche aufgetragen und mit Laufpuffer überschichtet. Die Proben werden bei einer konstanten Spannung von 100-110V getrennt. Mindestens ein Größenmarker SeeBluePlus (Invitrogen) wird zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Banden mit aufgetragen.

10x konzentrierter Laufpuffer	2M Glycin 250mM Tris/HCl pH 8,3 1% (w/v) SDS
6x konzentrierter SDS-Probenpuffer	50ml 0,5M Tris, pH 6,8 40ml Glycerin 1,24g SDS 0,16g Bromphenolblau auf 95ml auffüllen 5% (v/v) β-Mercapto-EtOH direkt vorm Gebrauch zusetzen

Blotten

Es folgt der WesternBlot. Die aufgetrennten Proteine werden nun vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Protan Bio Science Schleicher & Schuell) übertragen bzw. geblottet, damit sie für die anschließende Detektion mit Antikörpern zugänglich werden.



**Abb. 88: Aufbau eines Semi-Dry-Blots**

Insgesamt 4 Whatman-Papiere, Gel und Nitrocellulosemembran (zur Orientierung markiert) werden in Blotting-Puffer äquilibriert und anschließend wie in der Abb. 88 dargestellt übereinander geschichtet. Luftblasen werden herausgestrichen. Die Proteine werden mit konstanten 50mA/Gel innerhalb von 90min auf die Membran transferiert.

2x konzentrierter Blotting Puffer

78mM Glycin

96mM Tris/HCl

0,074% (w/v) SDS

40% (v/v) MeOH

### Detektion

Nach dem „semi-dry-blot“ auf die Nitrocellulosemembran werden die unspezifischen Bindungen auf der Membran durch einstündiges Schwenken in einem Gemisch von 2% BSA<sup>39</sup> und 3% Milchpulver blockiert. Anschließend wird die Membran dreimal in TBS-T gewaschen. Über Nacht erfolgt die Inkubation mit dem Erstantikörper gegen Cytochrom P450 2E1 (von Ratte und Mensch, BioTrend Chemikalien) aus dem Kaninchen bei 4°C (1:1000 in TBS-T (0,1%) mit 1% BSA). Dazu wird die Membran in eine Folie zusammen mit 1ml Antikörperlösung verschweißt und auf einem Überkopf-Inkubator (Heto Lab Equipment oder Roto-Shake Genie, Scientific Industries) befestigt. Anschließend wird dreimal in TBS-T gewaschen. Nun erfolgt die Zweitantikörper-Inkubation für mindestens 1,5h bei Raumtemperatur mit einem Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörper gegen den hasenspezifischen Fc-Teil von Antikörpern (1:2000 in TBS-T mit 5% BSA) gegen den ersten Antikörper. Der Waschschritt wird dreimal wiederholt und die Membran dann für exakt 1min in einer die Lumi-Glo-Reagenzien A und B-haltigen Lösung (New England BioLab, Cell Signaling) geschwenkt. Die Auswertung erfolgt sofort mittels Lumi-Imager (Boehringer Ingelheim). Die Boehringer Light Units (BLU) der Proben werden als Test over Control in [%] aufgetragen.

---

<sup>39</sup> BSA: Bovines Serum Albumin (Rinderserumalbumin)



20x konzentriertes TBS

2,6M NaCl

0,4M Tris/HCl pH 7,6

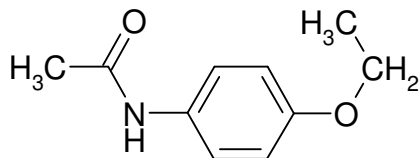
TBS-T (Waschpuffer)

Tween-20 0,3% in 1x TBS

## 8.5.2 Zeitabhängige CYP450 2E1-Aktivitätsuntersuchung an primären Rattenhepatozyten mittels HPLC<sup>40</sup>

Zur Bestimmung der Aktivität des Isoenzym Cytochrom P450 2E1 wird die Umsetzung des Substrates Chlorzoxazon (CLZ) zu 6-Hydroxy-Chlorzoxazon (6-OH-CLZ) gemessen (modifiziert nach Lucas *et al.*, 1993). Bei CLZ handelt es sich um ein Muskelrelaxans mit der chemischen Bezeichnung 5-Chloro-1,3-benzoxazol-2(3H)-on, welches als selektives CYP 2E1-Substrat bekannt ist und als solches zu CYP 2E1-Aktivitätsbestimmungen auch in Wistar-Ratten in der Literatur verwendet wird (Zerilli *et al.*, 1995; Wauthier *et al.*, 2006). Die Zellen werden inkubiert und der Zellkultur-Überstand auf nicht umgesetztes Substrat und Menge an Metabolit untersucht.

Als interner Standard wird *N*-(4-Ethoxyphenyl)acetamid (Phenacetin) verwendet. Es wurde seit 1887 als Antipyretikum und Analgetikum verwendet, ist heute jedoch aufgrund insbesondere nierentoxischer Nebenwirkungen nicht mehr zulässig. Das Absorptionsmaximum liegt bei 245nm, kann von den Analyten auf der HPLC getrennt werden, und ist aufgrund ähnlicher Eigenschaften (z.B. MG; Hydrophilie) zur gemeinsamen Aufarbeitung mit CLZ und 6-OH-CLZ geeignet.



**Abb. 89: Struktur von Phenacetin**

Nach Präparation, Vereinzelung und Viabilitätsbestimmung werden 6Mio primäre Rattenhepatozyten in einer Petrischale von 92mm Durchmesser mit 10ml serumhaltigem Medium ausgestreut. Die Petrischalen werden mindestens einen Tag zuvor mit

<sup>40</sup> HPLC: High Pressure (or Performance) Liquid Chromatography

flüssigem Kollagen aus Rattenschwänzen beschichtet und unter UV-Bestrahlung trocknen gelassen und sterilisiert. Nach 2h haben sich die Zellen abgelegt. Die toten Zellen werden mit dem Medium abgesaugt, während die übrigen vorsichtig mit HPBS serumfrei gewaschen werden. Anschließend erfolgt die Inkubation der Zellen, deren CYP450-2E1-Aktivität im ersten Zeitfenster (2-26h) getestet werden soll, mit ITS-Medium und Chlorzoxazon. Es wird eine Lösungsmittelkontrolle mit 1% DMSO mitgeführt. Die Zellen, die zur Untersuchung eines anderen Zeitfensters bestimmt sind, werden zunächst parallel, aber ohne Substrat behandelt und ebenfalls bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchte kultiviert. Nach 26h bzw. 50h werden auch diese Zellen mit CLZ (1% DMSO) für 24h inkubiert.

Nach (jeweils) 24stündiger Inkubation mit dem CLZ wird der Zellkultur-Überstand (das Medium) in 15ml-Röhrchen gesammelt und bei -20°C bis zur Messung eingefroren.

Der erste Versuch wurde in Doppelbestimmung am Bundesinstitut für Riskobewertung (BfR) nach im Folgenden als Methode (1) bezeichneter Methode durchgeführt. Alle weiteren Proben wurden nach einer weiter optimierten Methode (2) aufgearbeitet und gemessen.

## Aufreinigung und Aufkonzentration

**Tab. 06: Aufarbeitung nach den Methoden (1) und (2)**

Methode (1)	Methode (2)
- 1ml Probe	
Reagenzglas	2ml-Eppendorfreaktionsgefäß
50µl 43%ige Phosphorsäure hinzugeben	
- 5µl Phenacetin (0,15mg/ml) als internen Standard zufügen	
Festphasenextraktion	Ausschütteln / Extraktion
- Konditionieren der Säule	+ 1ml Ethylacetat
1 x 1ml MeOH	- Vortexen (ca. 20sec)
2 x 1ml Acetonitril	- Zentrifugieren
2 x 1ml Reinstwasser	5min bei RT und 800rpm
2 x 1ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- obere Phase abnehmen
- Probenaufgabe	(Ethylacetatphase)
- Waschen der Säule	1,5ml-Eppendorfreaktionsgefäß
3 x 100µl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	- Einengen
2 x 250µl Reinstwasser	ca. 45min in Evaporator
- Trocknen der Säule	(unter Vakuum)
5-10min N <sub>2</sub> -Strom	
- Elution	
3 x 200µl Acetonitril	
- Eindampfen	
ca. 30min N <sub>2</sub> -Strom, RT	
-Rückstand in 100µl aufnehmen	
in Solvens (90% H <sub>2</sub> O + 10% Acetonitril)	in MeOH

## HPLC-Bedingungen

Tab. 07: HPLC-Bedingungen der Methoden (1) und (2)

	Methode (1)	Methode (2)								
Säule	C18	C18								
Vor-	Hypersil ODS-C18, 30 x 2,0mm, 5µm	manuell gefüllt C18								
Haupt-	Hypersil ODS-C18, 100 x 2,1mm, 5µm	Phenomenex Luna 5u C18(2) 100Å ; 250 x 4,60mm								
Temp.	40 °C	RT								
Injektionsvolumen	10µl	10µl								
Injektion	Autosampler (2x)	manuell (1x)								
Lauf	Isokratisch	mit Gradient:								
		<table border="1"> <tr> <td>0-2min</td> <td>10% Acetonitril 90% H<sub>2</sub>O (pH 3)</td> </tr> <tr> <td>in 15min</td> <td>auf 100% Acetonitril</td> </tr> <tr> <td>4min</td> <td>100% Acetonitril</td> </tr> <tr> <td><u>in 2min</u></td> <td>auf 10% Acetonitril</td> </tr> <tr> <td>23min</td> <td>Gesamtlaufzeit</td> </tr> </table>	0-2min	10% Acetonitril 90% H <sub>2</sub> O (pH 3)	in 15min	auf 100% Acetonitril	4min	100% Acetonitril	<u>in 2min</u>	auf 10% Acetonitril
0-2min	10% Acetonitril 90% H <sub>2</sub> O (pH 3)									
in 15min	auf 100% Acetonitril									
4min	100% Acetonitril									
<u>in 2min</u>	auf 10% Acetonitril									
23min	Gesamtlaufzeit									
Eluent	90% wässrige H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (w/v)  +10% Acetonitril	90% Aqua <sub>bidest.</sub> pH 3,0 mit Ameisensäure +10% Acetonitril								
Flow	0,45ml/min	1ml/min								
UV [λ]	200nm, 297nm, 304nm	297nm								

Nachweisgrenze 3:1 (Peak : Rauschsignal) für 6-OH-CLZ der Methode (1) beträgt c= 0,001ng/µl.

Nachweisgrenze 3:1 liegt nach Methode (2) für 6-OH-CLZ bei c= 0,01ng/µl.

Die erstellten Eichgeraden der Reinsubstanzen in DMSO zeigten eine sehr gute lineare Korrelation im gewählten Konzentrationsbereich (Korrelationskoeffizienten >0,99) (s. Abb. 90).

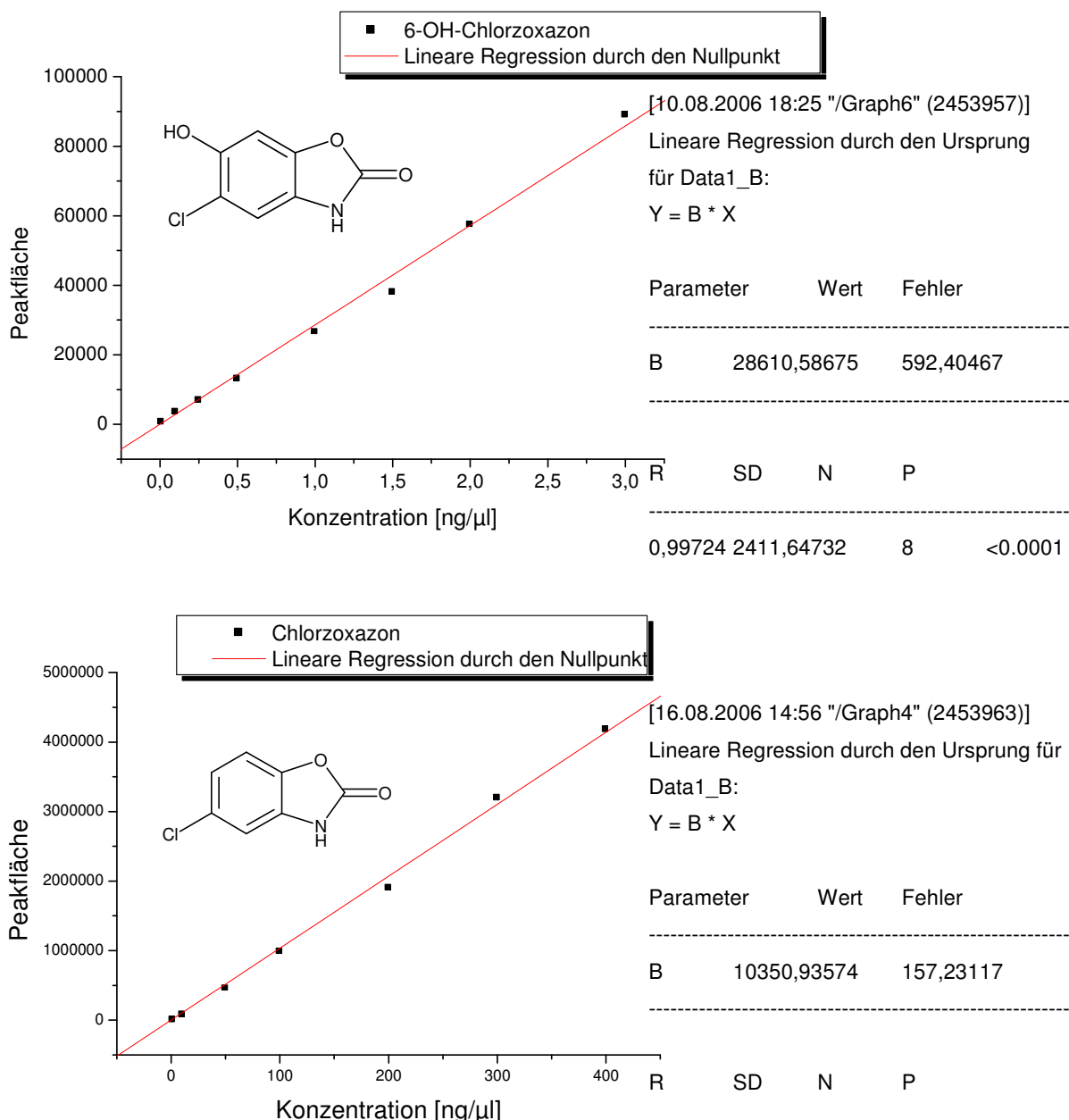


Abb. 90: Lineare Regression der Eichgeraden von CLZ und 6-OH-CLZ; n=1.

### Auswertung

Die Berechnung der 6-OH-CLZ Konzentration/Menge erfolgt über den internen Standard, wodurch Verluste bei der Aufarbeitung mitberücksichtigt/ausgeglichen werden. Bei Methode (1) wird die Berechnung automatisch vom Software-Programm ChemStation (Agilent) durchgeführt; die Peakgrenzen und -erkennung (Minimalflä-

chen) werden jedoch zuvor manuell festgelegt. Für die Berechnungen werden Eichgeraden zu (1) 6-OH-CLZ und Phenacetin bzw. (2) 6-OH-CLZ, CLZ und die Wiederfindungsrate von Phenacetin bestimmt. Die Auswertung wird bei Methode (2) mit dem Programm 32Karat 7,0 (Beckman) durchgeführt und die Peakflächen/-grenzen ebenfalls manuell ausgewertet.

Probenauswertung (1):

1. Berechnung der Peakflächenverhältnisse

$$\text{Response Ratio Probe} = \frac{\text{Response 6-OH-CLZ}}{\text{Response Phenacetin}}$$

2. Berechnung des Mengenverhältnisses der Probe

Nach bekannter Ausgleichsgeradengleichung der Eichgeraden zu 6-OH-CLZ

$$x(\text{Amount Ratio der Probe}) = \frac{y(\text{Response Ratio der Probe}) - b(\text{Achsenabschnitt})}{m(\text{Steigung})}$$

Probenauswertung (2):

3. Berechnung des Korrekturfaktors  $F_K$  für den Verlust bei der Aufarbeitung

$$\text{Wiederfindungsrate (Rec)} = \frac{100}{\text{Area Phenacetin}_{\text{extern}}} * \text{Area Phenacetin}_{\text{ISTD}}$$

$$F_K = \frac{1}{\text{Rec}} * 100$$

4. Berechnung der Probenmenge  $x$  mittels Regressionsgeradengleichung (der Eichgeraden) und Korrekturfaktor (mit  $b$ : Achsenabschnitt;  $m$ : Steigung)

$$x = \frac{y - b}{m} * F_K$$

Die Aktivität [nmol/(min x mg Protein)] wurde nicht berechnet. Ziel war das Erhalten einer qualitativen Aussage zu zeitabhängigen Aktivität: die Menge an umgesetzten Substrat in Abhängigkeit von Substratangebot und der Kultivierungsdauer der Hepatozyten zum Zeitpunkt der Umsetzung (d.h. abhängig von eingesetzter Enzymmenge und -Aktivität). Bei (2) wurde zusätzlich die Umsatzrate von CLZ zu 6-OH-CLZ [%] berechnet:

$$\text{Umsatz } x \text{ [%]} = \frac{100}{(6\text{-OH-CLZ} + \text{CLZ})} * 6\text{-OH-CLZ}$$

## 8.6 Mikrokerninduktion

Die Mikrokerninduktion einer mutagenen Substanz kann in allen sich teilenden oder zur Teilung anregbaren Zellen nach Färbung mikroskopisch untersucht werden. Die Durchführung eines Tests auf Mikrokerne kann mit oder ohne Zytokineseblocker erfolgen (vgl. Kapitel 8.6.1. und 8.6.2).

### 8.6.1 Mikrokerntest

Durch Mutagene können in Zellen Mikronuklei (=Mikrokerne) induziert werden, deren Rate sich mittels Mikrokerntest bestimmen lässt (modifiziert nach Kulling *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2002; Perez *et al.*, 2002). Die toxikologisch gut etablierte V79-Zelllinie mit einer kurzen Verdopplungszeit von 16h wird häufig als Zellsystem zur Bestimmung von Mikrokernen verwendet (Perry, 2003).

Ausgestreut wird in Quadripermschalen mit 4 Fächern (Vivascience), in dessen Fächern je ein steriler Superfrost-Objektträger (Menzel-Gläser) und 5 ml Zellsuspension eingebracht werden. Man lässt 15.000 V79-Zellen pro ml Medium für einen Tag auf den Objektträgern anwachsen. Danach wird jede Kammer dreimal mit 3ml PBS für die anschließende serumfreie Inkubation gespült. Die Inkubation erfolgt für 24h, wobei eine 1%ige DMSO-Lösungsmittelkontrolle und eine Positivkontrolle mit zusätzlich 300µg/ml Berenil [1,3-bis(4'-amidino-phenyl)triazin] (in Ampuwa<sup>41</sup> gelöst) mitgeführt wird. Berenil interkaliert in die RNA und DNA. Nach erfolgter Inkubation bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchte erhalten die Zellen einen Mediumwechsel. Dazu wird wiederum zunächst mit Puffer gewaschen und dann gleiches Volumen serumhaltiges Medium zugegeben. Die Nachkultivierungszeit beträgt 24h und soll den Zellen die Möglichkeit zum Durchlaufen eines vollständigen Zellzyklus geben, da Mikrokerne am Ende der Zellteilung gebildet werden (s. Theorie). Eine mögliche Beeinflussung des Zellwachstums durch die Testsubstanzen im Vergleich zur Kontrolle wird mittels WST-1-Assay<sup>42</sup> überprüft (vgl. Kapitel 8.10.3). Dieser wird jedoch unter den Bedingungen des Mikrokerntests durchgeführt.

Auf die Nachkultivierung folgt das Überführen der zellbewachsenen Objektträger in eine Kammer mit auf -20°C vortemperiertem MeOH zur Fixierung der Zellen. Dazu wird der Objektträger zunächst kurz mit Methanol mediumfrei gespült und dann ohne Kontakt zu Wänden oder anderen Objektträgern in der Kammer positioniert. Nach

---

<sup>41</sup> Ampuwa: Steriles wässriges Lösungsmittel, zur Infusion bestimmt

<sup>42</sup> WST: water soluble tetrazolium salt

mindestens 1h kann der so vorbereitete Objektträger kurz luftgetrocknet werden. Anschließend werden die Zellen dann mit ein paar Tropfen DAPI-Propidiumjodid-Antifade-Lösung angefärbt. Der Objektträger wird mit einem Deckglas und einem Tropfen Öl versehen. Die Zellen werden dann im Ölimmersionssystem unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Bestimmung der Mikrokerne erfolgt nach Kriterien von Fenech und Mitarbeitern (2003). Gezählt wird die Mikrokernrate pro 1000 Zellen und Konzentration.

#### Bestimmungskriterien

- Größe des Mikronukleus darf max. 1/3 des Kerndurchmessers betragen
- Farbintensität Mikronukleus  $\leq$  Farbintensität Kern
- Lage im Zytoplasma einem Nukleus zugehörig
- keine Verbindung (DNA-Brücke) zum Kern
- Lage in etwa derselben Fokussierungsebene wie die Kerne
- äußere Form: glatt, rund oder oval

#### Antifade-Lösung

100mg p-Phenylendiamindihydrochlorid in 10ml PBS lösen  
mit 0,5M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (pH 9,0 mit NaOH) auf pH 8,0 einstellen  
mit Glycerin auf 100ml auffüllen  
bei -20 °C lichtgeschützt aufbewahren

DAPI-Lösung 1mg DAPI auf 1ml Aqua<sub>bidest.</sub>

Propidiumjodid-Lösung 1mg Propidiumjodid auf 1ml Aqua<sub>bidest.</sub>

#### DAPI-Propidiumjodid-Antifade-Lösung

10µl DAPI-Lösung

10µl Propidiumjodid-Lösung

10ml Antifade-Lösung



PBS	171mM NaCl
	10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	3,4mM KCl
	1,8mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auffüllen; pH 7,4 einstellen und autoklavieren

### 8.6.2 Doppelkernmethode

Der Mikrokerntest wird analog zur Einzelkernmethode durchgeführt. Wesentlicher Unterschied ist die Induktion von Doppelkernen durch 3µg/ml Cytochalasin B (Serva Electrophoresis), welches während der Inkubationszeit von 24h dem Medium zusätzlich zugefügt wird.

Auf eine Nachkultivierung wurde verzichtet (s. Kapitel 6.1.1). Die Methode beinhaltet bereits eine Teilungskontrolle, da sich das Zytoplasma nicht teilt und aus einer Teilung hervorgegangene Kerne dadurch erkennbar und zählbar sind. Die Anzahl an Einzelkernen und multiplen Kernen wird mit dem Nuclear Division Index (NDI) erfasst und ist Indiz für die Zytotoxizität einer Substanz.

$$\text{NDI: } \frac{(N_1 + 2N_2 + 3N_3 + 4N_4)}{N}$$

mit N: Nuklei; Tiefgestellte Zahl: Anzahl Kerne pro Zelle

### 8.6.3 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung (CREST-Färbung)

Die so genannte CREST-Färbung leitet sich vom CREST-Syndrom ab, einer seltenen immunologischen Erkrankung, einer progressiven systemischen Sklerose, bei der die Patienten Antikörper gegen Zentromere im Blut aufweisen. Das führt bei den Betroffenen zu verschiedenen Symptomen (Calcinosis cutis, Raynaud-Symptomatik, Esophagus, Sklerodaktylie und Teleangiektasie) Diese Antikörper kann man in Verbindung mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern nutzen, um Kinetochorproteine (Zentromere) *in vitro* zu markieren und sichtbar zu machen. Diese Immunfluoreszenzfärbung erlaubt die Unterscheidung von klastogenen und aneugen Substanzen, je nachdem ob die Mikrokerne Zentromere enthalten (s. Kapitel 2.4.2.2.2).

Zunächst werden die V79-Zellen analog zum Mikrokerntest ausgestreut, behandelt und in Methanol fixiert. Anschließend wird die Zellmembran mittels exakt 4½ minütiger Aceton-Behandlung bei -20°C perfundiert, wozu die Objektträger waagrecht in einem passenden Schälchen getränkt werden. Die Zellen werden dreimal für 5min

mit PBS gewaschen. Man lässt die Objektträger kurz abtropfen und lufttrocknen. Danach werden pro Objektträger je 100µl Ziegenserum zum Abblocken der unspezifischen Bindungen aufgebracht, mit einem Deckglas versehen und in einer Feuchtkammer bei 37°C für 1h inkubiert. Die Feuchtkammer wird durch eine geschlossene Petrischale mit einem Durchmesser von 144mm realisiert, in welcher der Boden mit Aqua<sub>bidest.</sub> ausreichend bedeckt wird. Eine Schicht von 13ml-Röhrchen bietet eine gerade Auflagefläche für die Objektträger und Abstand zum Wasser. Darauf folgend wird der Objektträger in einen mit PBS gefüllten Behälter gehalten bis das Deckglas von alleine abfällt, kurz durchgeschwenkt und kurz antrocknen gelassen. Nun erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper. 100µl der humanen Anti-Zentromer-(=Anti-Kinetochor)Lösung (1:10 in PBS mit 1% BSA) werden aufgebracht, mit einem Deckglas versehen und für eine Stunde in der Feuchtkammer bei 37°C belassen. Wiederholt wird das Deckglas mit PBS entfernt und die Zellen kurz luftgetrocknet, um dann den Sekundärantikörper auftragen zu können. Der Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-gekoppelte Anti-human IgG aus der Ziege wird 1:100 in PBS mit 1% BSA verdünnt. 100µl davon werden aufgetragen und die Zellen damit für 1h bei 37°C in der Feuchtkammer inkubiert. Als nächstes werden die Deckgläser wie oben beschrieben mittels PBS abgetrennt und dreimal für 5min in PBS gewaschen. Bis zur mikroskopischen Betrachtung werden die Zellen in Sörensen-Phosphat-Puffer bei 4°C gelagert (Schuler, 1994). Für die Auswertung wird kurz vor der Fluoreszenzmikroskopie noch eine Gegenfärbung mit der DAPI-Propidiumjodid-Antifadelösung wie unter 8.6.1 durchgeführt.

#### Sörensen-Phosphat-Puffer

Lösung A: 4,95g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 500ml Aqua<sub>bidest.</sub>

Lösung B: 5,94g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 500ml Aqua<sub>bidest.</sub>

Lösung A mit Lösung B auf pH 8,0 einstellen

Es wird gereinigtes, humanes Anti-Centromer Protein (0,7mg/ml) von Antibodies Incorporated (Davis, USA) verwendet. Der FITC-konjugierte Sekundärantikörper Anti-human IgG (Fab-specific) wurde von Sigma-Aldrich GmbH (München) bezogen.

## 8.7 DNA-Strangbrüche

### 8.7.1 Comet-Assay

Beim Comet-Assay werden mittels Einzelzellgelelektrophorese DNA-Schäden detektierbar gemacht (Ostling und Johanson, 1984). Die Methode wird alkalisch und leicht modifiziert nach Singh *et al.* (1988) und Tice *et al.* (2000) durchgeführt. Unter alkalischen Bedingungen wird vor der Elektrophorese die DNA entwunden und ihre Einzelstränge getrennt. Intakte Zellkerne liegen auch nach der Elektrophorese kugelförmig im Gel eingebettet. DNA-strangbrechende Reagenzien führen jedoch zu im elektrischen Feld schneller wandernden DNA-Bruchstücken. Vor der Detektion wird DNA mit interkalierendem Ethidiumbromid angefärbt. Bruchstücke entfernen sich vom Kern und wirken wie leuchtende Kometenschweife auf schwarzem Hintergrund.

#### Zellinkubation

Die Zellen werden in Petrischalen mit einem Durchmesser von 60mm mit 5ml Medium ausgestreut. Adherente immortalisierte Zelllinien werden 24h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte anwachsen gelassen. Bei Substanzinkubation ohne FKS werden die Zellen nach Erreichen subkonfluentem Bewuchses inkubiert. Mitgeführt wird jeweils eine Lösungsmittelkontrolle und das Alkylanz *N*-Methyl-*N'*-Nitro-*N*-Nitrosoguanidin (MNNG) 10µM als Positivkontrolle.

#### *a) Primäre Rattenhepatozyten [♂ Wistar-Ratten, vgl. Kapitel 8.1.1a]*

500.000 Zellen werden in 5ml Williams E Medium mit 1% L-Glutamin, 1% Penicillin /Streptomycin und 10% FKS auf mit Kollagen beschichteten Petrischalen ausgestreut. Zur Beschichtung werden die Petrischalenböden zuvor mit flüssigem Kollagen gerade bedeckt, trocknen gelassen und unter UV-Licht steril bestrahlt. Nach 2h im FKS-haltigen Medium werden die Zellen mit HPBS gewaschen und in Williams E Medium mit 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/ Streptomycin und 5ml Insulin Transferrin Selenium (ITS) inkubiert. Auch bei nachfolgenden Spülschritten wird bei dieser Zelllinie statt PBS HPBS mit HEPES verwendet.

*b) V79-Zellen [Chinesische Hamsterlungenfibroblasten; vgl. Kapitel 8.1.1 b)]*

250.000 V79-Zellen werden in 5ml DMEM mit 10% FKS, 1% Natriumpyruvat und 1% Penicillin/Streptomycin ausgestreut. Nach 24h sind die Zellen angewachsen, werden mit PBS gewaschen und anschließend serumfrei mit 0,1% DMSO als Lösungsmittel inkubiert, dazu werden die Inkubationslösungen 1000x höher konzentriert angesetzt und 5µl zu 5ml Medium zugegeben.

## Substanzen

AA MG 71,08 (VWR, Darmstadt; für Molekularbiologie

≥ 99,5% Sigma-Aldrich, München)

GA MG 87,08 (vgl. Kapitel 8.3)

Beschichten von Objektträgern

Normal melting Agarose (NMA, BioRad Laboratories) wird bei 125-150°C unter Rühren verflüssigt. 40µl NMA werden auf einen Objektträger aufgebracht und mit der kurzen Kante eines zweiten Objektträgers dünn verstrichen. Durch kurzes Auflegen der behandelten Objektträger auf die Heizplatte wird das Trocknen beschleunigt.

Anschließend trägt man nacheinander zweimal 65µl NMA so auf den Objektträger auf, dass ein einseitig breiter Rand verbleibt, und positioniert darüber luftblasenfrei 24x24mm große Deckgläser (schräg ansetzen). Die Objektträger härten bei 4°C innerhalb von 10-15min aus und können bis zum Gebrauch in einer Box bei ~4°C drei bis vier Tage gelagert werden. Zum Schutz vor dem Austrocknen wird eine Lage Papier in der Aufbewahrungsbox ausgelegt und mit destilliertem Wasser gut befeuchtet.

Puffer	PBS	PBS	HPBS
<u>Chemikalie</u>	<u>Konz.</u>	<u>für 1l</u>	<u>1l [g]</u>
NaCl	137mM	8,0g	10,0g
KCl	2,7mM	0,2g	0,25g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5mM	0,2g	0,25g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1mM	1,15g	1,4g
HEPES	-	-	0,2383g

mit Aqua bidest auf 1l auffüllen und mit (1mol/l) NaOH auf pH 7,4 einstellen  
bei Bedarf als 10x Konzentrat ansetzen und autoklavieren

NMA (normal melting agarose)[Biorad] 0,5% in PBS – 250mg in 50ml

### Aufarbeitung (auf Eis)

Das Medium wird verworfen. Dann wäscht man die Petrischalen zweimal mit einem Milliliter Pufferlösung mediumfrei und gibt 500µl Trypsin hinzu bis sich die Zellen leicht ablösen lassen. Die abgeernteten Zellen werden in 2ml-Eppendorfreaktionsgefäßen auf Eis gesammelt. Mit zweimal 500µl FKS-haltigem Medium zum Inaktivieren des Trypsins werden die Zellen überführt. Die weiteren Schritte erfolgen unter Codierung, um größere Objektivität zu erzielen.

### Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung

Die Zellsuspension wird gevortext, ein Aliquot (20µl) mit (20µl) Trypanblau-Lösung vermischt und mittels Neubauer Zählkammer ausgezählt. Über das Trypanblau-Ausschlussverfahren werden auch die abgestorbenen Zellen erfasst, da in die toten Zellen mit defekter Membran der Farbstoff eindringt und diese blau färbt. Die aus dem Verhältnis von lebenden zu toten Zellen ermittelte Viabilität wird zur Interpretation der Auswertung mit herangezogen. Bei V79-Zellen sollte diese > 90% betragen. Bei primären Hepatozyten ist bei einer Viabilität <75% eine Auswertung erschwert oder aufgrund zu hoher Zytotoxizität nicht möglich.

### Einbetten der Zellen in Agarosegele

Die Zellsuspension wird in zwei Aliquots zu je ca. 65.000 Zellen auf zwei 1,5ml-Reaktionsgefäße gesplittet - überzählige Zellen werden verworfen. Die Zellsuspensionen werden bei 4°C und 800g für 10min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417 R oder 5415). Die Überstände werden verworfen.

Die Deckgläser der vorbereiteten Objektträger werden seitlich abgezogen. In das Glas der Objektträgerrückseite wird der Code mit einem Diamantstift eingeritzt. Das Zellpellet wird in 65µl flüssig erhitzter 1%iger Low melting agarose (LMA) aufgenommen und sofort auf eine 24x24mm beschichtete Fläche aufgebracht und mit entsprechend großem Deckglas abgedeckt. Es ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen auf das Deckglas pipettiert werden.

Nach 10minütigem Aushärten (auf Eis) können die Deckgläser wieder entfernt werden.

Lyse

Die Objektträger werden ohne Kontakt der Gelflächen untereinander in Lysekammern gestellt, in denen eisgekühlter Lysepuffer die Gele bedeckt und für mindestens 1h oder für einen zusätzlichen FPG-Behandlungsschritt über Nacht bei 4°C darin belassen.

Lysepuffer

<u>Stammlösung</u>		<u>Gebrauchslösung [%]</u>	<u>(v/v)</u>
2,5M NaCl	(46,1g)	89% Lysepuffer Stammlösung	
100mM EDTA	(3,7g)	1% Triton X-100	
100mM Tris	(1,2g)	10% DMSO	
in 1l Aqua <sub>bidest.</sub> lösen			
(mit NaOH) pH 10 einstellen			
erst dann 1% (10g) <i>N</i> -Laurylsarcosin-Na-Salz zufügen (über Nacht rühren)			

Elektrophorese

Die Elektrophoresekammer (Peqlab Biotechnologie) wird auf Eis gestellt, mittels Wasserwaage austariert und etwas Elektrophoresepuffer vorgelegt. Die Objektträger werden mit der Gelschicht nach oben auf die Plattform der Elektrophoresekammer in einer Orientierung gelegt und durch Einklemmen mit Objektträgern befestigt. Man füllt die Kammer mit eiskaltem alkalischem Puffer soweit auf, bis die Gele etwa 0,2-0,5cm bedeckt sind. Nun lässt man die DNA zum Entwinden und Äquilibrieren für 20min darin abgedunkelt stehen. Die DNA liegt unter alkalischen Bedingungen in Einzelsträngen vor und ermöglicht auch die Detektion von Einzelstrangbrüchen.

Dann wird die Spannung auf 25V (0,89V/cm) und 300mA (+/-5mA) durch Zugabe oder Entnahme von Puffer eingestellt. Die Stromstärke kann während der Elektrophorese leicht absinken und durch Pufferlösung ausgeglichen werden. Die DNA-Fragmente wandern zur Anode. Nach 20min erfolgt der Neutralisationsschritt. Die Objektträger werden für 3x 5min mit je 100ml 4°C-kaltem Neutralisationspuffer in einer Färbekammer bei 4°C neutralisiert. Für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind das Einhalten der 20min zur DNA-Denaturierung und der exakten Elektrophoresezeit von Bedeutung. Durch eine erhöhte Feldstärke kann die Sensitivität des Assays erhöht werden.

## Elektrophoresepuffer

StammlösungenGebrauchslösung (1l)10M NaOH: 200g in 500ml Aqua<sub>bidest.</sub>

30ml 10M NaOH -&gt; 300µM NaOH

200mM EDTA: 14,9g in 200ml Aqua<sub>bidest.</sub>

5ml 200mM EDTA -&gt; 1mM EDTA

(pH 10) auf 1l mit Aqua<sub>bidest.</sub> auffüllen

## Neutralisationspuffer

0,4M Tris in Aqua<sub>bidest.</sub> (48,5g + 1l)

mit HCl auf pH 7,5 einstellen

Anfärben

40µl einer Ethidiumbromidlösung werden pro Gel aufgetragen und mit einem Deckglas versehen. Eine Aufbewahrung kann wiederum in einer Box, die mit befeuchtem Papier ausgelegt ist, bei 4 °C für einige Tage erfolgen.

## Ethidiumbromid-Färbelösung

2mg/ml Ethidiumbromid in Aqua<sub>bidest.</sub>Auswertung

Je 50 Zellen pro Gel und 2 Gele pro Objektträger und Konzentration werden fluoreszenzmikroskopisch mit einem CY-3-Filter ausgezählt. Für die Auswertung werden die Objektträger mäanderförmig abgefahren und einzelne, sich nicht überschneidende Zellen herangezogen. Als Maß für die DNA-Strangbruchrate wird die Fluoreszenzintensität im Schweif als prozentualer Anteil („tail intensity“ TI[%]) der DNA (im Kometenkopf) über das Bildanalyse-System Comet assay III-System (Perceptive Instruments, Suffolk, Great Britain) berechnet. Zur Erfassung über das Auswertesystem muss der Schweif einheitlich nach rechts zeigen und die Zellkernmitte nicht kreisrunder Zellen oft manuell vorgegeben werden. Das Programm spiegelt dann an der Zellkernmitte die DNA-Fluoreszenzintensitäten. Der rechts liegende Fluoreszenzanteil nach Abzug der Intensität der linken Kernhälfte entspricht dem Anteil der herausgewanderten DNA, der Schweifintensität. Die Schweifintensitäten von 50 Zellen werden gemittelt und die mittleren TIs zweier Gele pro Konzentration berechnet. Der Assay sollte mindestens dreimal wiederholt werden. Entscheidend für die Objektivität und Qualität der Ergebnisse ist eine ausreichende Verschlüsselung der Proben bei der

Auswertung. Es ist von Vorteil, wenn die auswertende Person innerhalb einer Versuchsreihe nicht wechselt. Die TI der Negativkontrolle von V79-Zellen betrug etwa 2%. Die Postivkontrolle lag zwischen 15-30%. Eine nach Auswertung deutlich signifikante Erhöhung der DNA-Schäden ist meist erst ab einer festgestellten TI von  $\geq 5\%$  zu erwarten. Der Grund für hohes Untergrundrauschen könnte der Einfluss von mechanisch geschädigten Zellkernen (auch unbehandelter Kontrollen) auf die Durchschnittsschweifintensitäten sein.

### 8.7.2 Comet-Assay mit FPG-Behandlung

FPG ist auch als 8-Oxo-guanin-DNA-Glykosylase bekannt, weil sie u.a. 8-Oxo-guanin erkennt und herauszuschneiden vermag. 8-Oxo-guanin gilt als ein Stressmarker und stellt in der Regel kein Problem für die Zelle dar. Das Herausschneiden führt zunächst zu AP-Stellen und Lücken. Erst das Einwirken weiterer Reparaturenzyme führt zur vollständigen Wiederherstellung. Behandelt man Zellen mit einem oxidativen Stressor und anschließend mit FPG *in vitro*, erhält man vermehrt AP-Stellen und Lücken, die man als erhöhte Schweifintensitäten im Comet-Assay detektieren kann. In der Regel wird daher eine FPG-Behandlung im Comet-Assay zur Erfassung von oxidativem Stress durchgeführt. FPG besitzt jedoch ein hohes Substratspektrum (vgl. Kapitel 2.6.2).

Die FPG-Behandlung kann direkt nach der Lyse (vgl. Kapitel 8.7.2) durchgeführt werden. Dazu werden alle Proben als Duplets vorbereitet, um die Proben mit und ohne FPG-Behandlung direkt miteinander im gleichen Assay vergleichen zu können.

Nach der Lyse werden die Zellen dreimal 5min in kalter Enzympufferlösung (4°C) gewaschen. Die Hälfte der Objektträger dienen als Vergleichswerte ohne FPG-Behandlung und werden mit je 2x 50µl Enzympuffer betropft und zügig mit je zwei Deckgläsern darüber versehen. Je 50µl der FPG-haltigen Enzympufferlösung wird dann auf die zweite dafür vorgesehene Hälfte an Objektträgern (die Duplikate) aufgebracht. Auch diese werden mit Deckgläsern versehen. Gemeinsam werden die Objektträger für 30min bei 37°C mit hoher Luftfeuchtigkeit im geschlossenen Wasserbad (Köttermann Labortechnik) inkubiert.



Die FPG-Lösung wurde freundlicherweise von A.R. Collins (Oslo, Norwegen) zur Verfügung gestellt. Sie enthielt 10.000 oder 100.000Units/ml und wurde bei -80°C gelagert. Direkt vor Gebrauch wurde diese im Verhältnis 1:30 mit Enzympuffer verdünnt.

10x Enzympuffer

40mM (9,5g) HEPES

0,1M (7,46g) KCl

0,5mM (0,146g) EDTA

0,2mg/ml (0,2g) BSA

auf 1l mit Aqua<sub>bidest.</sub> auffüllen

pH 8 (mit KOH) einstellen

vor Gebrauch 1:10 mit 4°C-kaltem Aqua<sub>bidest.</sub> verdünnen

## 8.8 Synthese des N7-Gua-Adduktes

### 8.8.1 Synthese von N-7-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)Guanin

Die Synthese wurde mithilfe von Herrn Dr. Karlheinz Merz in Anlehnung an Citti *et al.* (1984), Brockus und Lawley (1961), Latif *et al.* (1988) und Tretyakova (1996) durchgeführt. Guanosin und ein 8x molarer Überschuss an GA werden in Eisessig für 2,5h bei 75°C erhitzt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch etwas eingengt und 3h unter Rückfluss sauer hydrolysiert. Das Addukt fällt nach Neutralisation auf Eis als feinkristalliner Niederschlag aus.

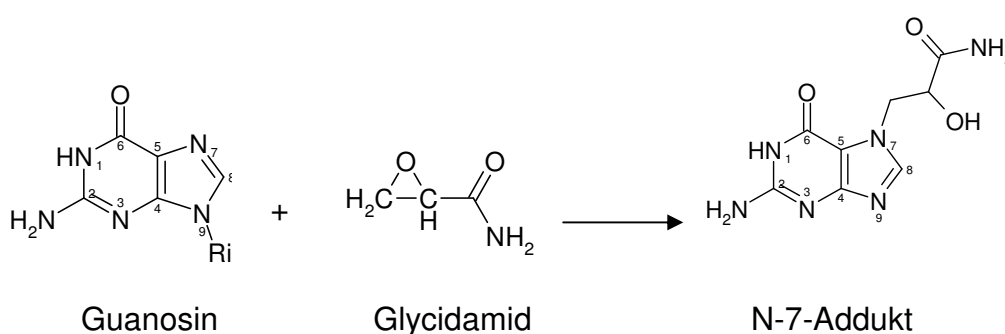


Abb. 91: Strukturen Edukte/ Produkt

Zunächst wird das stark hygroskopische GA unter Argonatmosphäre eingewogen und in einem Dreihalskolben vorgelegt. 60mmol des Epoxids werden mit insgesamt 45ml Eisessig versetzt. Nach Erreichen einer Temperatur von 75°C wird darin portionsweise 7,5mmol Guanosin gelöst. Der Reaktionsverlauf wird über das Verhältnis Edukt/Produkt dünnschichtchromatographisch (Kieselgelplatte, Fließmittel 85/15 Acetonitril/H<sub>2</sub>O; Fluoreszenzlösung) mitverfolgt und überprüft. Nach 2,5h wird die klare, orangefarbene Lösung auf 8ml braune hochviskose Masse eingengt und kann über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen werden. Das Gemisch wird bei 80°C mit 30ml 1N Salzsäure versetzt und nach 1h bei 80°C für 2h bei etwa 120°C (mit Rückflußkühler) erhitzt. Für reaktionsbegleitende dünnschichtchromatographische Proben wird ein Äquivalent (eq) Probe mit 2 eq 2N NaOH und 1 eq Ethanol versetzt aufgetragen.

Das Reaktionsgemisch wird dann auf Eis mit 16ml 2,5N NaOH leicht alkalisch gemacht (pH 7-8). Der gebildete hellbraune feinkristalline Niederschlag wird nach 1,5h über eine Nutsche gewaschen und bei 4°C gelagert.

Zur Überprüfung der Reinheit des Produktes wurden 4,5mg des Niederschlages in DMSO aufgenommen und im  $^1\text{H-NMR}$  vermessen (s. Ergebnisteil). Die Interpretation des  $^1\text{H-NMR}$  erfolgte mithilfe der Zuordnung nach Oe und Mitarbeitern (1999).

### 8.8.2 Synthese mit stabilem Isotop-markiertem Guanosin

Als interner Standard sollte ein mit stabilem Isotop markiertes *N7-Gua-Addukt* synthetisiert werden, welches sich nur marginal in der Masse, nicht aber in den chemischen Eigenschaften, unterscheidet. Erhältlich war als Edukt Guanosin ( $\text{U-}^{15}\text{N}_5$ , 96-98%, Cambridge Isotope Laboratories, USA) über Eurisotop (Saarbrücken, Deutschland), dessen N-Atome aus Stickstoff der Massenzahl 15 bestehen. In der Regel wird die Herstellung markierter Moleküle mithilfe von *E.coli* oder Hefe durchgeführt, indem als Nährlösung ein Minimalmedium verwendet wird, das als einzige Stickstoffquelle  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid enthält. Guanosin mit fünf  $^{15}\text{N}$ -Atomen hat ein Molekulargewicht von 288,1 g/mol. Die von Eurisotop gelieferten 93mg (0,3228mmol) wurden im Verhältnis 1+3 mit  $^{14}\text{N}$ -Guanosin vermischt, damit eine handhabbare Menge für die Synthese zur Verfügung steht und eine ausreichende Ausbeute zu erwarten ist. Aufgrund der identischen Eigenschaften sollte das Produktgemisch gleichmäßig im Verhältnis 1:4 vorliegen. Die Menge des als internen Standards verwendeten Gemisches sollte im Massenspektrum aufgrund des isotopenmarkierten Adduktes leicht berechnet werden können. Die Durchführung erfolgt parallel zur Synthese des nicht markierten *N7-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)Guanin* (vgl. Kapitel 8.8.1). Das resultierende  $^1\text{H-NMR}$  ist identisch mit dem des nicht markierten.

## 8.9 Nachweis von N7-Gua-Addukten in vitro

### Vorversuch: Inkubation von Kalbsthymus-DNA mit GA

Für Vorversuche wurde GA mit Kalbsthymus-DNA (Sigma-Aldrich, Ort, Land) in den Konzentrationen 1ng/mg, 1µg/mg und 1mg/mg (nach Segerbäck *et al.*, 1995; da Costa *et al.*, 2005) für 24h inkubiert. DNA-Lösung (2mg/ml in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>) wird 1:1 mit GA in BIS-TRIS-Puffer (s. Hauptversuch) in entsprechender Konzentration im Eppendorfreaktionsgefäß bei 37 °C für 24h im Thermomixer geschüttelt.

Zellkultur: V79-Zellen	Kalbsthymus-DNA
Inkubation mit Glycidamid 6h	Inkubation mit Glycidamid 24h
DNA-Isolierung Blood & Cell Culture Maxi Kit Qiagen, modifiziert ~100 Mio Zellen	
Bestimmung der DNA-Reinheit und des DNA-Gehaltes	
Neutrale thermische Hydrolyse (Herauslösen des Adduktes) (modifiziert nach Segerbäck <i>et al.</i> 1995, Da Costa <i>et al.</i> 2003, Doerge <i>et al.</i> , 2005)	
	Zugabe von internem Standard
	DNA präzipitieren
Größenausschluss mittels AmiconCentricon (3kD) Filtereinheiten	Ultrafiltration Millipore
Volumenbestimmung	Einengen mittels SpeedVac
Auftrennung und Detektion mittels HPLC-ESIpos-MS/MS Würzburg; Frau Dr. Richling	Auftrennung und Detektion mit HPLC/ Triple MS (API 2000 LC/MS-MS) Kaiserslautern

**Abb. 92: Übersicht über die Aufarbeitungsmethoden zum Nachweis des N7-Gua-Adduktes**  
Die Spalte links zeigt die Aufarbeitung nach Zellinkubation (im Hauptversuch beschrieben). Die rechte Spalte stellt eine Übersicht der Aufarbeitung nach Inkubation von Kalbsthymus-DNA mit GA (im Vorversuch) dar.

Die DNA wurde nach neutraler thermischer Hydrolyse (s. Hauptversuch) mittels 1 Volumenteil 10% 5M NaCl-Lösung und 3 Volumenteil Ethanol präzipitiert.

#### Festphasenextraktion [solid phase extraction (SPE)]

Verwendete Geräte: SPE-Röhrchen, Nadel (mit Hahn), Zwischenstück mit Septum, Kolben, Schlauch mit Klemme zur Regulierung des Vakuums, Wasserstrahlpumpe.

Auf die Säule werden nacheinander 2ml Aqua<sub>bidest.</sub>, 1ml MeOH und 2ml Aqua<sub>bidest.</sub> gegeben. Anschließend erfolgt die Probenaufgabe und ca. 30minütiges trocknen unter Wasserstrahlvakuum. Der Auffangbehälter wird ausgetauscht und das Addukt mit 2ml Acetonitril eluiert. Die SPE kann durch Ultrafiltration ersetzt werden (s. Hauptversuch).

Acetonitril lässt sich leicht mittels Rotationsverdampfer oder SpeedVac (unter Vakuum) bis zur Trockene einengen. Die Proben werden in definiertem Volumen BIS-TRIS-Puffer aufgenommen, gegebenenfalls im Ultraschallbad behandelt und bis zur Vermessung bei -20°C aufbewahrt.

#### HPLC-MS/MS-Bedingungen

Säule	Lichrolut RP18 (40-63µm) (Merck, Darmstadt) [2003, alt] LiChroCART 250-4 LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) [2003 ff.]
Fließmittel	2,5% Acetonitril, 10mM Ammoniumformiat [2003] 70/30 Acetonitril/Aqua <sub>bidest.</sub> mit 0,2 % Ameisensäure [2004]
Flussrate	500µl/min
Einspritzvolumen	10µl
Triple MS	API 2000
Polarität	positiv

#### Multiple reaction

mode (MRM) 239→194; 239→152

Die erreichte Nachweisgrenze betrug 2,2 pmol absolut in 25 µl Einspritzvolumen.

Das N7-Gua-Addukt bzw. der Standard ist in 5mM BIS-TRIS mit 0,1mM EDTA (pH 7,1) gelöst.

Zur Optimierung wurde das API 2000 eigene Programm zur quantitativen Optimierung genutzt. Die Apparatur wurde regelmäßig mit Methanol gereinigt und Koffein als Standard zur regelmäßigen Überprüfung des Gerätezustandes eingeführt.

### **Hauptversuch: Nachweis von N7-Gua-Addukten nach V79-Zellinkubation mit Glycidamid**

#### Ausstreuen von V79-Zellen

Für den Nachweis des N7-Gua-Adduktes wird die DNA von 100Mio V79-Zellen/ Probe benötigt. Auf einer Säule zur DNA-Gewinnung des verwendeten Blood & Cell Culture Maxi Kit (QIAGEN) können maximal 100.000.000 Zellen/ Säule aufgebracht werden. Es werden neunmal 3Mio V79-Zellen pro Konzentration in jeweils 20ml Medium ausgestreut (3Mio/Petrischale, Ø144mm). Bei 27Mio ausgestreuten V79-Zellen stehen nach 2,5 Tagen etwa 100Mio V79-Zellen zur Verfügung.

#### Zellinkubation

Nach 2,5 Tagen bei 37°C sind die Petrischalen dicht, aber noch subkonfluent bewachsen. Das Medium wird abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült, 15ml serumfreies Medium mit GA hinzugefügt und für 6 Stunden inkubiert. Eine Kontrolle mit 1% des Lösungsmittels DMSO wird mitgeführt.

#### Zellernte

Das Abernten der Zellen erfolgt nach Anleitung des QIAGEN Blood & Cell Culture Maxi Kit [Qiagen Genomic DNA Handbook 08/2001], jedoch unter Trypsinverzicht.

Als erstes wird das Medium entfernt. Die Petrischalen werden zweimal mit 2ml (eiskühlem) PBS gespült. Die Zellen werden zunächst mit 2ml PBS abgeschabt und in einem 50ml-Tube gesammelt. Mit 2ml Puffer wird nachgespült und die Zellsuspension dem Röhrchen zugefügt. Jeweils die Zellen von 4,5 Petrischalen (einer Konzentration) werden in einem Tube zusammengeführt. Die Zellsuspensionen werden im Anschluß 10min bei 4°C und 1500 x g zentrifugiert (Zytofuge, Heraeus). Der Überstand wird verworfen, die Zellpellets in je 5ml PBS resuspendiert und je 2x 5ml (9 PS bzw. eine Konzentration) vereint. Wiederholt wird für 10min bei 4°C und 1500 x g zentrifugiert. Nun werden die Zellpellets in 10ml PBS aufgenommen.

Die maximale Zellzahl soll 100Mio/10ml nicht überschreiten. Zu jeder Probe wird 10ml kalter C1-Lyse-Puffer zugegeben. Anschließend wird 30ml kaltes bidestilliertes Wasser zugefügt. Die Proben werden geschüttelt, während die Zellen lysieren. Die

Nuklei sind dabei durch die Pufferzusammensetzung stabilisiert und bleiben erhalten. Es schließt sich eine 10 minütige Inkubation auf Eis an. Dann werden die Proben 15min bei 4°C und 1300 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Zum Pellet werden 2ml C1-Puffer zugegeben und 6ml Aqua<sub>bidest.</sub> Und kurz vermischt. Dieser Schritt dient der Reinigung von Zelltrümmern. Wiederholt wird 15min bei 4°C und 1300 x g zentrifugiert und der Überstand danach verworfen.

Die gewonnenen Pellets werden bei -20°C bis zur Aufarbeitung eingefroren.

### DNA-Isolierung

Die Pellets werden auf Eis aufgetaut. Dann fügt man 10ml G2-Lyse-Puffer zu und vortext gründlich 10sec bei maximal einstellbarer Geschwindigkeit (MS1, IKA). Je Probe werden 200µl Protease-Lösung zugeben und damit statt bei 50°C 1h (KIT) bei 37°C für 2h inkubiert, da die Addukte temperaturempfindlich sind (Doerge *et al.*, 2005).

Die Säulen zur DNA-Isolierung werden zunächst mit 10ml QBT-Puffer equilibriert.

Wenn die Proben nicht mehr trüb sind, werden sie 10sec gevortext und zügig warm auf die Säule aufgetragen. Mit insgesamt 2x 15ml QC-Puffer wird die auf der Säule befindliche DNA gewaschen.

Wenn notwendig, wird leichter Unterdruck mittels Wasserstrahlvakuum ausgeübt oder über Nacht durchtropfen gelassen. Nun wird der Abfallbehälter durch ein Auffangbehälter ersetzt. Der pH-Wert der original QF-Puffer-Lösung wird auf pH 7,4 abgesenkt. Diese QF-Pufferlösung wird auf 40°C vorgewärmt und damit die DNA eluiert.

Das Eluat wird auf Eis gekühlt bis die Elution vollständig ist.

### DNA präzipitieren

Dem Eluat werden 0,7 Vol Isopropanol (4°C) zum Fällen der DNA zugegeben. Das Eluat-Isopropanol-Gemisch wird bei -20°C über Nacht eingefroren (Doerge *et al.*, 2005). Die Proben werden bei Bedarf auf Eis aufgetaut und etwa 60min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Wenn ein glasiges Pellet sichtbar ist, Überstand abnehmen und diesen wiederholt zentrifugieren. Die DNA wird mit Ethanol gewaschen. Das Umfällen erfolgt durch Zugabe von 2-4ml 70%igem Ethanol. Es entsteht ein weißliches und besser sichtbares, gereinigtes DNA-Pellet. Der Überstand wird mit Ethanol auf DNA geprüft, ggf. wiederholt zentrifugiert und die Pellets miteinander

vereint. Der Zentrifugationsschritt wird wiederholt, der Überstand abpipettiert und das Pellet lufttrocknen gelassen. Das DNA-Pellet wird in 0,5-2ml BIS-TRIS-Puffer (pH 7,1) je nach DNA-Ausbeute aufgenommen.

#### BIS-TRIS-Puffer (100ml)

Bis-(2-hydroxyethyl)imino-tris(hydroxymethyl)methan

5mM BIS-TRIS                    104,6mg/ 100ml

0,1mM EDTA (Titriplex)    3,72mg/ 100ml

mit HCl auf pH 7,1 einstellen

Die DNA-Lösung wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Da sich die DNA besser unter alkalischen Bedingungen löst, wird zusätzlich etwa 20min. bei 26 °C in BIS-TRIS-Puffer geschüttelt (Thermomixer).

#### DNA-Gehalt bestimmen und DNA-Reinheit überprüfen

Der DNA-Gehalt und die Reinheit werden mittels Spektrophotometer (Nano-Drop Technologies) bestimmt. Dazu wird mit Puffer (Lösungsmittel) auf 0 [ng/µl] DNA kalibriert, dann 1,5µl Probe auftragen und die Absorption (A) bei 260nm und 280nm gemessen. Reine DNA hat ein Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  zwischen 1,7 - 1,9.

Die DNA-Konzentration wird dreimal bestimmt. Schwankt der Wert, wird die Probe höher verdünnt und erneut etwa 20min bei 26 °C geschüttelt bis drei Werte „nahezu identisch“ sind. Diese werden gemittelt und für die spätere Auswertung notiert.

#### Neutrale thermische Hydrolyse

Direkt vor der Hydrolyse erfolgt eine exakte Volumenbestimmung (mittels Pipette). Der DNA-Gehalt ergibt sich aus der DNA-Konzentration [ng/µl] x Volumen [µl]. Die Proben werden für die Hydrolyse in 200µl-Mengen aliquotiert (Doerge *et al.*, 2005). Dann werden die Proben-Aliquots 20min im vorgeheizten Thermoblock bei 95 °C thermisch neutral hydrolysiert. Dazu werden die Eppendorf-Reaktionsgefäße mit Verschlusskappen versetzt oder/und mit einer Thermoplatte abgedeckt und (gegen das Aufspringen der Deckel) fixiert. Anschließend lässt man die DNA auf RT abkühlen. Es folgt ein Größenausschluss (3kDa): Mittels Millipore's Amicon Microcon Centrifugal Filter Devices (YM-3, Biocompare, Staufen) werden die herausgelösten Addukte von der restlichen DNA abgetrennt. Die Filter werden mit 100µl Aqua<sub>bidest.</sub>



befeuchtet, 10min bei 12000 x g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Danach werden die feuchten Filter auf neue Amicon-Microcon-Gefäße gesteckt.

Nun werden die Proben unter Berücksichtigung des maximalen Filtervolumens in Aliquots auftragen und bei 13000 x g und 21 °C (RT) für 99min zentrifugiert. Die Filtrate einer Probe werden vereint. Zuletzt wird vor der Messung eine Volumenbestimmung des Filtrates durchgeführt.

### Detektion

Messung mittels HPLC-ESI-MS/MS

### **HPLC-ESI<sub>pos</sub>-MS/MS-Bedingungen**

Fließmittel 0,1% Ameisensäure in Wasser (A) / Acetonitril (B)

Gradient 5%B auf 70%B in 10min

Flussrate 200µl/min

Injektionsvolumen 10µl

Säule Waters Symmetry C18, 2,1 x 150mm, 5µm

Beheizte Kapillare 200 °C

Spannung 3,4kV

Auxilliary gas 10l/ min (Stickstoff 5,0)

Sheath gas 70psi (Stickstoff 5,0)

Scanzeit 1sec

Scanbereich 100-800u (cent)

### Selected Reaction

Monitoring (SRM) m/z 238,9 -> 151,9 bei 22eV (Argon CID 2,0mTorr)

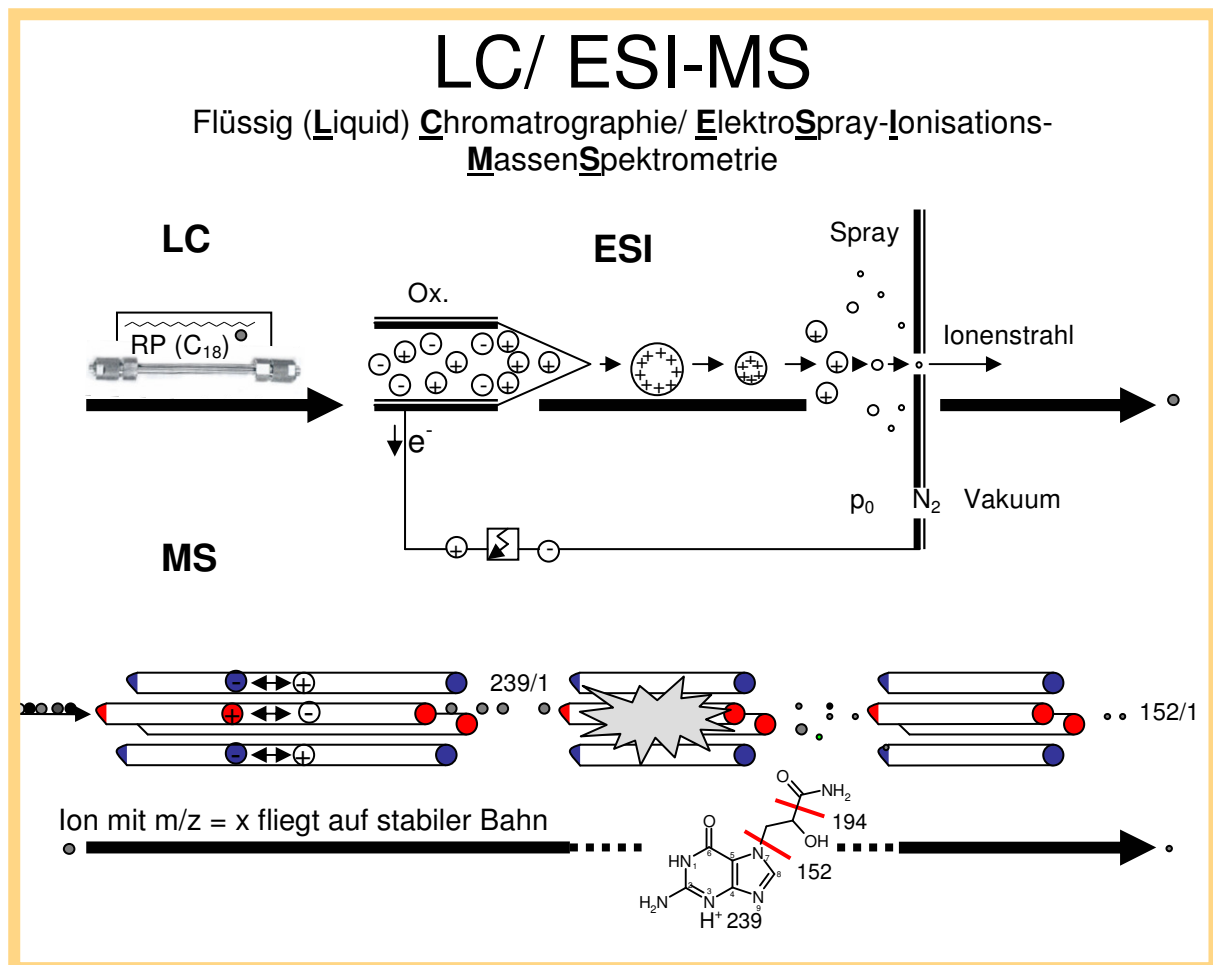


Abb. 93: Funktionsweise eines ESI-MS/MS

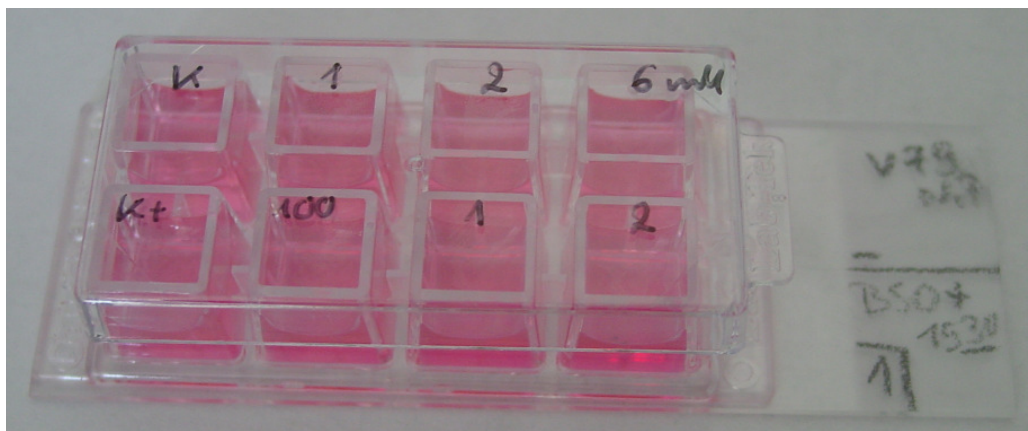
## 8.10 Viabilität

### 8.10.1 Morphologie: Mikroskopische Aufnahmen

Die Zellmorphologie gibt Aufschluss über den Zustand der Zellen. Bereits unter geringer Vergrößerung kann man die Wachstumsdichte und den Differenzierungsgrad (z.B. bei V79-Zellen die Fibroblasten-Struktur oder bei HT29-Zellen die Mikrovilli) abschätzen. Auch der Anteil in Teilung befindlicher Zellen (bei V79-Zellen die kugelförmigen) oder etwa abgelöster toter Zellen lässt sich leicht erkennen. Es lassen sich grobe bakterielle Verunreinigungen ausschließen. Morphologische Veränderungen können Indiz für die Wirkungsweise von Substanzen sein. Apoptotische Zellen sehen in einem frühen Stadium nierenförmig aus, das Chromatin kondensiert und vor der Phagozytose sieht man apoptotische Körperchen. Nekrotische Zellen sind meist vergrößert, weisen Vakuolen auf oder zeigen sich als Zelltrümmer. Es gibt eine Reihe

Farbstoffe, mit denen man z.B. Zytoplasma und DNA unterschiedlich anfärben kann (vgl. Kapitel 8.1.6 und 8.6). Mit AxioVision Software (Zeiss) lassen sich separat Fotos unter verschiedenen Farbfiltern anfertigen, bearbeiten (z.B. in der Farbtintensität und Helligkeit) und übereinander legen. Dadurch erhält man ein Foto von doppelt angefärbten Zellen. Die Technik für diese mikroskopischen Aufnahmen wurde von dem AK Prof. Fischer in der Westhochschule (Karlsruhe) zur Verfügung gestellt.

Für mikroskopische Zwecke wurden entweder Superfrost-Objektträger (in Petri- oder QuadriPerm-Schalen) oder so genannte Chamber Slides verwendet. Die Chamber Slides bieten den Vorteil, dass auf einem Objektträger acht verschieden behandelte Zell-Gruppen untersucht werden können.



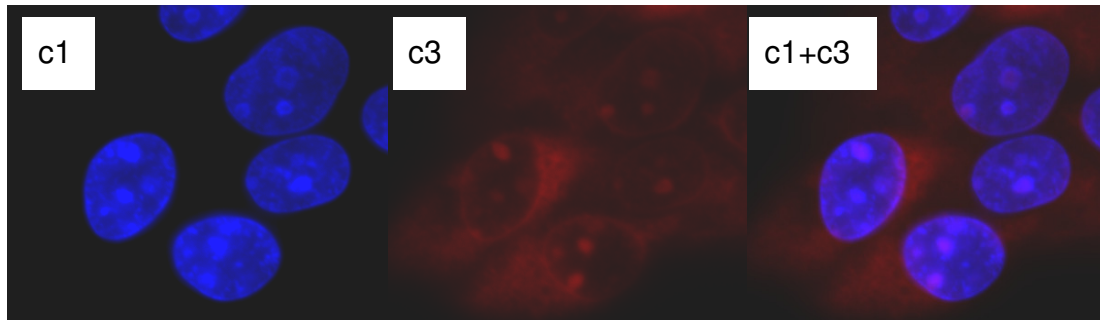
**Abb. 94: Chamber Slide**

### Durchführung

Die Inkubationsbedingungen richten sich nach der Fragestellung.

- 15.000 V79-Zellen/ml und 400µl/Kammer (des Chamber Slides) ausstreuen (+ 10% FKS)
- Nach 24h mit  $\pm$  1mM BSO vorinkubieren (1% PBS, 10% FKS)
- Nach 24h mit PBS waschen
- Mit Testsubstanz  $\pm$  1mM BSO inkubieren (1% PBS, 1% DMSO, 0% FKS)
- Anschließend in -20°C kaltes Methanol stellen ( $\geq$  1h) bis zur Färbung
- Entfernen der Kammerreste
- Überschichten mit DAPI-Propidiumjodid-Antifade-Lösung
- Auflegen eines Deckglases, kühl und dunkel halten
- Öltropfen zugeben
- DAPI (c1)- und Cy3 (c3)-Filter nacheinander verwenden
- Kameramodell AxioCamMR

- Mittels Carl Zeiss AxioVision Software:
  - o Einrichten eines Größenmaßstabs (10 $\mu$ m)
  - o Fotos einzeln nachbearbeiten (z.B. Ausschnitt, Helligkeit und Intensität)
  - o Fotos verschiedener Farbfilter übereinander legen s. Abb. 95



**Abb. 95: Beispiel für Überlagerung von Fotos verschiedener Filter – doppelte Färbung (DAPI und Propidiumjodid)**

### 8.10.2 Membranintegrität: Trypan Blau-Ausschlusstest

Der Trypan Blau-Ausschlusstest erlaubt die Unterscheidung lebender und toter Zellen. Er eignet sich hervorragend für die Kombination bei jeder Zellzahlbestimmung sowie im HPRT-Test oder Comet-Assay, da der Farbstoff nicht in Zellen mit intakter Zellmembran eindringen kann. Tote Zellen sind jedoch für die Trypan Blau-Lösung (Sigma-Aldrich) durchlässig und erscheinen dann unter dem Durchlicht-Mikroskop blau. Da der Farbstoff eine Eigentoxizität besitzt, dürfen die Zellen dem Farbstoff nur kurz ausgesetzt werden und sind nach dem Zählen nicht mehr verwendbar. Der Verdünnungsfaktor, der sich durch das Vermischen der Zellsuspension mit der Färbelösung ergibt, wird bei der Berechnung der Zellzahl/ml berücksichtigt. Die Gesamtzellzahl/ml wird auf 100% gesetzt und der prozentuale Anteil lebender Zellen daran als [%] Viabilität ausgedrückt. Insbesondere nach der Gewinnung von primären Rattenhepatozyten ist die Viabilität von großer Bedeutung.

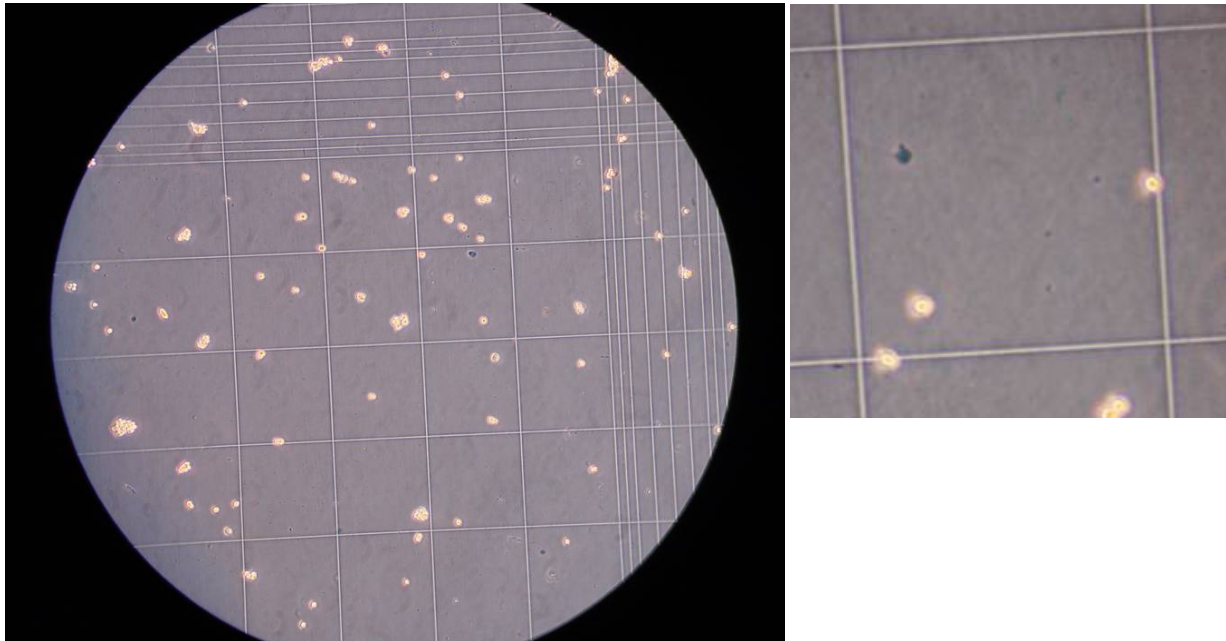
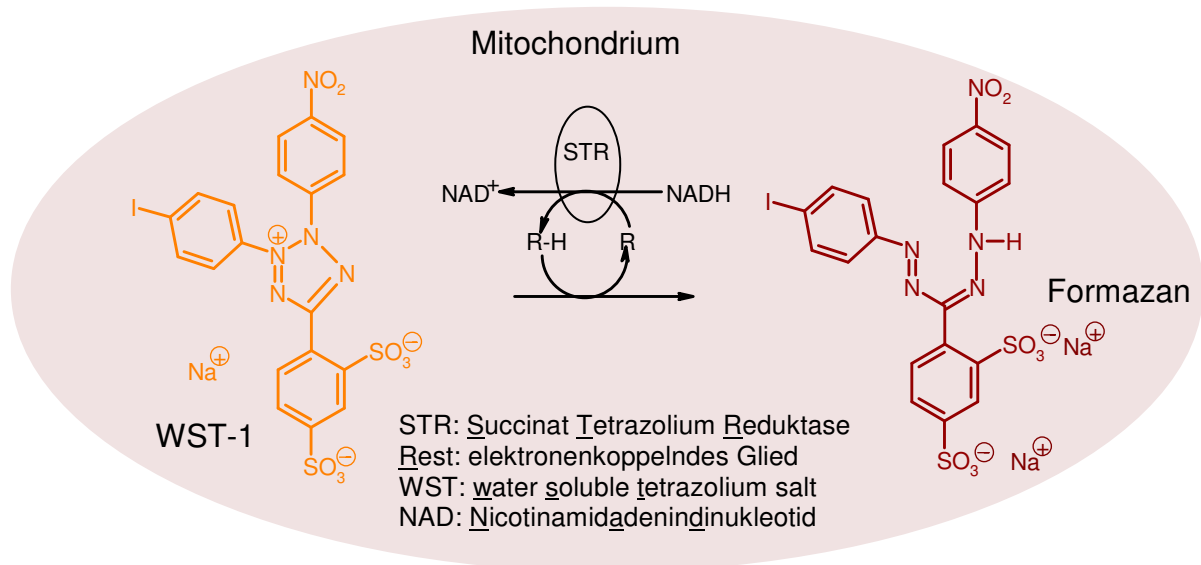


Abb. 96: Trypan Blau-Ausschlusstest

### 8.10.3 Mitochondriale Aktivität: WST-1-Assay

Der WST-1-Assay kann zur Bestimmung von Zellproliferation, Viabilität und Zytotoxizität eingesetzt werden. Es handelt sich um eine photometrische Bestimmung, welche in 96-Loch-Platten durchgeführt werden kann. Darin liegt auch ein Vorteil im Vergleich zum SRB-Test, der typischerweise in 24-Loch-Platten durchgeführt wird, da weniger Testsubstanz verbraucht wird. Zu Bedenken ist jedoch, dass es Volumina-bedingte Grenzen für die Lösungsmittelkonzentrationen dabei gibt. Beispielsweise von einer in 100% DMSO gelösten Substanz ausgegangen, kann man nicht 0,1% DMSO als Endkonzentration erreichen, da die präzise Zugabe von unter 1µl technisch nicht möglich ist. Während beim SRB-Test die Zellzahl den Endpunkt darstellt, ist der Endpunkt der Bestimmung im WST-1-Assay die metabolische Aktivität der Zellen. Es wird die Aktivität des mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Reduktase-Systems colorimetrisch bestimmt. Das genannte System ist Teil der Atmungskette der Mitochondrien und nur in metabolisch aktiven Zellen aktiv. Den Zellen wird über das Medium WST-1-Reagenz (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitro-phenyl)-2H-5-tetrazolium]-1,3-benzendisulfonat) angeboten. In den zellulären Mitochondrien wird das Tetrazoliumsalz zu einem dunkelroten Formazan metabolisiert. Der WST-1-Assay ist eine Weiterentwicklung des MTT-Tests (Mosmann, 1983), bei dem der ge-

bildete Formazan-Farbstoff wasserlöslich ist: water soluble tetrazolium (WST). Dies erspart einige Wasch- und Lösungsschritte. Dieser Assay wurde zur Untersuchung mitochondrialer Fitness bzw. Schädigung herangezogen, aber auch von Zellproliferation und Zytotoxizität (Roche Diagnostics, 1999).



**Abb. 97: Prinzip vom WST-1-Assay: Umsetzung des WST-1-Reagenz zum Formazan, nach Roche Diagnostics, 1999, modifiziert.**

### Durchführung

Es wird das Roche Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Für die längerfristige Lagerung des WST-1 Reagenz ist die Lagerung bei -20 °C empfohlen; Aliquots davon sind bei 4 °C für wenige Wochen haltbar.

Im Vortest werden nach Produktbeschreibung von Roche geeignete Zellzahlen, je nach zu erwartender Bildungsgeschwindigkeit des Formazans und Intensität der Absorption, ermittelt. Je nach Fragestellung wird der Assay in den Inkubationsbedingungen, z.B. denen des a) Mikrokernassays oder dem b) Comet-Assay, angepasst. Auch die Zellzahl muss gegebenenfalls der Inkubationszeit angepasst werden, z.B. c) zeitabhängige Untersuchung des BSO-Effektes auf die Zellzahl.

Es wird eine 4fache Bestimmung durchgeführt (4 Löcher/Konzentration; Ausnahme: 4 bis 8 Löcher/Kontrolle). Als Positivkontrolle dient 60µM Quercetin. Das Loch zur Bestimmung des Hintergrundwertes (Blank) ist zellfrei, damit keine Umsetzung des Reagenz stattfindet. Die Lösungsmittelkonzentration beträgt durch die Testsubstanzen 1% DMSO und durch die BSO-Behandlung 1% PBS im Endansatz.

Tag 1

Ausstreuen von 7.500 V79-Zellen/Loch

in 100µl DMEM/Loch (10% FKS, 1% Napyr, 1% Pen/Strep) [24h]

Tag 2

a) Inkubation mit Testsubstanz in serumfreien Medium [24h]

b) Vorinkubation ± BSO in Kulturmedium (10% FKS) [24h]

c) Vorinkubation ± BSO in Kulturmedium (10% FKS) [1-24h]

Beim Wechsel von Medium mit 10% FKS auf +0% oder von mit Substanz auf ohne einen Waschschrift mit PBS durchführen -> hier bei a); gilt auch für Tag 3 a) - c)

Tag 3

a) Nachkultivierung mit Kulturmedium (10% FKS; substanzfrei) [24h]

b) Inkubation mit Testsubstanz in serumfreiem Medium [z.B. 6h]

c) Inkubation ± BSO in serumfreiem Medium [1-24h]

**Messung a) Tag 4 b) Tag 3 oder 4 c) Tag 2, 3 oder 4**

- Absaugen des Mediums
- Spülen mit PBS
- 100µl serumfreies Medium/Loch; Blankreihe mit 100µl (zellfrei) mitführen
- Zugabe von 10µl WST-1 Reagenz/Loch mit Multipette
- Inkubation bei 37°C
- Messung in 30 minütigen Zeitintervallen im Multiplattenlesegerät bis
- Absorption etwa bei 2,0 liegt
- 60sec Schütteln -> Messung bei 450nm
- Auswertung:
  - o Abzug des Blankwertes
  - o Bildung des Mittelwertes von 4 wells (Werten) / Konz.
  - o Bilden des Test over Control (T/C)-Wertes:
  - o Angabe in Prozent [%] im Vergleich zur Kontrolle
  - o Anwenden des Ausreißertests nach Nalimov über mindestens 4 Versuche
  - o Bilden des Mittelwertes über ≥ 3 unabhängige Werte
  - o Berechnen der Signifikanzen mittels students t-test (Origin 6.0)

### 8.10.4 Caspase-3-Aktivitäts-Untersuchung

Die Caspase-3 ist ein Cystein-abhängiges Enzym, welches seine Substrate nach Aspartatresten spaltet. Die Caspase-3 spielt eine bedeutende Rolle in der Apoptose. Einige Caspasen liegen als Procaspasen inaktiv in der Zelle vor und werden z.B. durch Initiatorcaspasen gespalten und aktiviert. Eine weitere Gruppe stellen die Effektorcaspasen, die u.a. als Nukleasen tätig werden. Ein Apoptosesignal aktiviert eine Signal-(oder Caspase-)kaskade, an dessen Ende die Apoptose einer Zelle steht. Eine erhöhte Caspase-3-Aktivität ist ein sicheres Indiz für Apoptoseinduktion durch eine Substanz.

#### Zellbehandlung

Da sich primäre Rattenhepatozyten *in vitro* nicht mehr teilen und nur wenige Tage in Kultur überleben, ist auf eine erhöhte Mindest-Vitalität (~90%) zu achten, wenn sie für den Caspase-3-Assay bestimmt sind. Eine Lösungsmittelkontrolle wird mitgeführt. Als Positivkontrolle wird Quercetin verwendet, da es ein effektiver Apoptose-Induktor ist (Cao *et al.*, 2007). Es werden 6Mio Leberzellen mit 10ml Medium in eine PS von 92mm Durchmesser ausgestreut. Wie bei allen Versuchen mit Rattenhepatozyten werden beschichtete PS verwendet, spezielle Medien (und Zusätze) und der erste Mediumwechsel wird nach 2h durchgeführt (vgl. Kapitel 8.1.1). Im Vergleich dazu werden nur 1Mio V79-Zellen ausgestreut, diese jedoch 24h statt 2h anwachsen gelassen.

#### Glutathion-Depletion und Substanzinkubation

Zur 24-stündigen Vorinkubation mit 1mM BSO (in Puffer) erhalten die Zellen FKS bzw. ITS. Zellen, welche nicht im GSH-Gehalt reduziert werden sollen, werden gleichbehandelt. Sie erhalten ebenfalls einen Mediumwechsel, nur ohne BSO-Lösung. Die Zellen werden anschließend mit Puffer gewaschen und für 24h mit Testsubstanz inkubiert. BSO-vorbehandelte Zellen werden weiter mit 1mM BSO koinkubiert.



## Stammlösungen:

## Fluorogenes Caspase-3-Substrat

20mM Ac-DEVD-AFC<sup>43</sup>-Stammlösung (Biomol) in DMSO (5mg in 343µl DMSO)

bei -20 °C lichtgeschützt lagern

## Caspase-3-Inhibitor

0,2mM Ac-DEVD-CHO<sup>44</sup> (Biomol)

(1mg in 400µl DMSO + 10ml Assay-Puffer)

## Fluoreszenz-Standard AFC

10mM 7-Amino-4-trifluormethyl-cumarin (AFC, Sigma) (5mg + 2,18ml DMSO)

bei -20 °C lichtgeschützt lagern

DTT 1M DTT in Aqua<sub>bidest.</sub> (100mg + 650µl H<sub>2</sub>O); bei -20 °C lagern

PMSF 100mM PMSF in Ethanol (350mg + 20ml Ethanol); bei -20 °C lagern

## Lyse-Puffer für 100ml

50mM HEPES (pH 7,4) 10ml

0,1mM EDTA 1ml

0,1% Triton X-100 100µl

0,1% CHAPS 100mg

+ 89ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

bei 4 °C lagern, direkt vor Gebrauch zugeben (zu 2ml):

1mM DTT 2µl 1M(1:1000)

1mM PMSF 20µl 100mM (1:100)

+ Proteaseinhibitoren Pepstatin und Leupeptin (je 1µl)

dunkel auf Eis halten

<sup>43</sup> DEVD: Einbuchstaben-Aminosäurecode für Asp-Glu-Val-Asp; AFC: 7-Amino-4-trifluormethyl-cumarin

<sup>44</sup> CHO: Aldehyd

## Assay-Puffer für 100ml

50mM HEPES (pH 7,4)	10ml
100mM NaCl	2ml 5M NaCl
0,1% CHAPS	100µl
1mM EDTA	10ml
10% Glycerol	10ml

+ 67,9ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>; bei 4 °C lagern; direkt vor Gebrauch zugeben: 10mM DTT

Die Caspase-Reaktion wird in 96-Loch-Platten durchgeführt und anschließend fluorimetrisch vermessen. Das fluorogene Caspase-3-Substrat (DEVD-AFC) setzt nach Spaltung durch die Caspase-3 das fluoreszierende Cumarinderivat AFC frei. Um die gebildete Menge an AFC zu bestimmen, wird eine Eichreihe des AFC-Standards in Assay-Puffer zwischen 0,1 und 10µM ermittelt.

Da das Substrat auch von anderen Enzymen gespalten werden kann, wird jede Probe zweimal aufgetragen. Einmal wird ein spezifischer Caspase-3-Inhibitor mit in das Loch gegeben, das andere Loch erhält Assay-Puffer. Bei der Auswertung wird der Wert mit Inhibitor von dem Wert ohne Inhibitor substrahiert. Dadurch erhält man die Menge an AFC, die spezifisch durch Caspase-3-Aktivität freigesetzt worden ist.

Zellernte

Der Zellkulturüberstand einer PS wird in ein 15ml-Röhrchen überführt, damit auch vom Boden abgelöste Zellen erfasst werden. Der Petrischalen-Boden wird mit ein bis zwei ml Puffer mediumfrei gespült und die Waschlösung in selbigem Gefäß gesammelt. Man lässt 1ml Trypsin ca. 20-30sec. Einwirken, bevor die Zellsuspension ebenfalls in das Gefäß überführt wird. Leichtes auf die Arbeitsoberfläche Schlagen der Petrischalen löst festsitzende Zellen ab.

Die Zellen werden in 1ml Medium (+ FKS) aufgenommen und überführt. Zweimal wird mit je 1ml Medium nachgespült und auch diese Waschlösung gesammelt. Die Zellsuspension wird in der Zytofuge bei 20 °C und 800rpm 5min zentrifugiert.

Der Überstand wird verworfen. Die Pellets lässt man kurz lufttrocknen, bevor sie dann in 1ml Puffer resuspendiert werden. Nach Überführen in ein 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß folgt die Zentrifugation in der Eppendorfszentrifuge bei 800rpm für 5min (20 °C). Der Überstand wird verworfen. Dem Pellet wird 150µl eisgekühlter Lysepuffer zugegeben und die Mischung 30min auf Eis inkubiert. Während der Inkuba-

tion wird im 5min-Abstand gevortext. Anschließend werden die Proben in der Eppendorffzentrifuge (14000rpm, 10min, 4°C) zentrifugiert und letztlich der Überstand (= Lysat) aliquotiert. 120µl Lysat werden bis zur Caspase-3-Aktivitätsbestimmung bei -80°C gelagert. Vom Rest wird eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

Direkt vor der Messung wird 1. der Assay-Puffer mit DTT versetzt (10mM)

→ Damit werden die folgenden Stammlösungen verdünnt, wobei auf Eis und unter Lichtausschluss gearbeitet wird.

- |                            |                |
|----------------------------|----------------|
| 2. 10µM AFC-Lösung wird    | 1:1000,        |
| 3. 1µM Caspase-3-Inhibitor | 1:200 und      |
| 4. 2mM Substrat            | 1:10 verdünnt. |

Eichgeraden werden erstellt und einmalig vermessen.

Die Proben hingegen unterliegen einer kinetischen Reaktion, weshalb die Reaktion im 1-2 Minuten Abstand durch Messung verfolgt wird. Zunächst wird ohne Substrat der Reaktionsmix im Reader durch Schütteln vermischt und lichtgeschützt inkubiert – dann wird Substrat zugegeben und die Messung gestartet. Die Messung wird nach einer Stunde abgebrochen. Die Auswertung erfolgt im linearen Bereich.

#### Messprotokoll für die Eichreihe

Es wird eine Fluoreszenzmessung mit den Filtern für die Extinktion 405nm und Emission 465nm am Genios (Tecan, Crailsheim) durchgeführt. Die eingestellte Integrationszeit beträgt 40µs; die Temperatur wird konstant auf 27°C gehalten.

Für die Messung der Caspase-Aktivität werden die Proben im Gerät zunächst zum Vermischen von Inhibitor und Lysat geschüttelt und für 10min darin lichtgeschützt belassen. Danach erfolgt eine Pause, in der die 96-Lochplatte herausgefahren wird: Dieses ist der Zeitpunkt für die Zugabe von 10µl Substrat je Loch. Danach startet alle 60sec eine Messung der Fluoreszenzabgabe der Proben. Diese Messungen werden 60fach wiederholt.

- 
1. Assay-Puffer      90µl in den Blank  
                         30µl in die Löcher, welche zusätzlich inhibitiert werden  
                         40µl in restliche Probelöcher
  2. Lysat              50µl in alle Wells außer in den Blank
  3. Inhibitor          10µl in jedes Loch unter Lichtausschluss
  4. Substrat          10µl in jedes Loch unter Lichtausschluss

### Auswertung

Es werden ausschließlich Werte aus dem linearen Bereich der Eichgerade verwendet. Nach Abzug des Blankwertes wird die AFC-Konzentration [pmol] mithilfe der zuvor erstellten Eichgeraden berechnet. Die Aktivität wird in pmol/min angegeben. Die spezifische Caspase-3-Aktivität ergibt sich aus der DEVDase-Aktivität nach Abzug dessen, was unter Einwirkung des spezifischen Caspase-3-Inhibitors umgesetzt wurde. Das Ergebnis wird nach erfolgter Proteinbestimmung nach Bradford (vgl. Kapitel 8.2) auf das Protein bezogen [pmol AFC/min x mg Protein].

## 9. Materialien & Geräte

### Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Allgemeine Chemikalien	Ac-DEVD-AFC	Biomol GmbH Hamburg, Deutschland
	Acrylamid für Molekularbiologie; > 99,5%	Sigma (Sigma-Aldrich GmbH München, Deutschland)
	Acrylnitril	Fluka (Sigma-Aldrich GmbH München, Deutschland)
	Agarose (low melting point)	Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
	Agarose (normal melting point)	Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
	Chlorzoxazon	Sigma (Sigma-Aldrich GmbH München, Deutschland)
	Cytochalasin B	Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
	Dinatriumhydrogenphosphat	Merck Darmstadt, Deutschland
	5,5'-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid)	Sigma (Sigma-Aldrich GmbH München, Deutschland)
	Glutathion, reduziertes und oxidiertes	Sigma (Sigma-Aldrich GmbH München, Deutschland)
	Guanosin U-15N5, 96-98%	Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Andover, MA, USA
	HEPES	Carl Roth GmbH + Co KG Karlsruhe, Deutschland
	6-Hydroxy-Chlorzoxazon	Dr. Ehrenstorfer GmbH Augsburg, Deutschland
	Kalbsthymus-DNA 89370	Fluka (Sigma-Aldrich GmbH München, Deutschland)
	NADPH	Fluka (Sigma-Aldrich GmbH München, Deutschland)
	Phenacetin	Sigma (Sigma-Aldrich GmbH München, Deutschland)
	Propidiumjodid	Sigma-Aldrich GmbH München, Deutschland

	5-Sulfosalicylic acid dihydrate	Sigma (Sigma-Aldrich GmbH München, Deutschland)
	Trypan-Blau	Sigma-Aldrich GmbH München, Deutschland
	2-Vinylpyridin	Sigma-Aldrich GmbH München, Deutschland
	Wasserstoffperoxid	Riedel-de Haën (Sigma-Aldrich GmbH München, Deutschland)
	Ziegenserum	Sigma-Aldrich GmbH München, Deutschland
Antikörper	Anti-human-centromere Protein A Purified	Antibodies Incorporated Davis, CA, USA
	Anti-human IgG (Fab-specific) FITC-konjugiert	Sigma-Aldrich GmbH München, Deutschland
	Anti-Rabbit Antibody HRP-linked IgG	New England BioLabs GmbH Cell Signaling Technology Frankfurt a.M., Deutschland
	Rabbit polyclonal antiserum to rat/ Human Cytochrome P450 2E1	BioTrend Chemikalien GmbH Köln, Deutschland
Enzyme	FPG	Collins A.R. Oslo, Norwegen
	Glutathione Reductase G-3664	Sigma (Sigma-Aldrich GmbH München, Deutschland)
Filter	Millipore's Amicon & Microcon Centrifugal Filtration Devices YM-3	Biocompare Staufen, Deutschland
Kits	Blood & Cell Culture Maxi Kit	Qiagen Hilden, Deutschland
	LumiGLO	New England BioLabs GmbH Cell Signaling Technology Frankfurt a.M., Deutschland
	WST-1	Roche Mannheim, Deutschland
Marker	SeeBlue Plus-2 Pre-Stained Standard	Invitrogen GmbH Karlsruhe, Deutschland

WesternBlot	Nitrocellulose Transfer Membran	Protan Bio Science Schleicher & Schuell Dassel, Deutschland
	Whatman-Papier	Whatman GmbH Dassel, Deutschland
Zellen/Organismen und Bedarf	Standard Diät	Altromin Lage, Deutschland
	Wistar Ratten	Savo Kisslegg, Deutschland
	Zelllinien CaCo-2 und V79	DSMZ Braunschweig, Deutschland
Zellkulturmaterial	Einmalspritzen	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
	Kryoröhrchen	Greiner Bio-One GmbH Sollingen, Deutschland
	Kulturflaschen, Petrischalen	Nunclon, Nunc Wiesbaden, Deutschland
	Medien, Medienzusätze	GIBCO Invitrogen Corporation Karlsruhe, Deutschland; Sigma-Aldrich GmbH München, Deutschland
	Neubauer Zählkammer	Superior Marienfeld Laboratory Glassware Lauda-Königshofen, Deutschland
	24- und 96-well-Platten, Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Sollingen, Deutschland
	QuadriPERM Zellkulturschalen	Vivascience AG (Sartorius AG Göttingen, Deutschland)
	Rotilabo-Spritzenfilter	Carl Roth GmbH + Co KG
	Rotilabo-Verschlussclips	Karlsruhe, Deutschland
	Superfrost-Objektträger, Deckgläser	Menzel-Gläser Braunschweig, Deutschland
Zellschaber, Handpotter	Wheaton Science Millville, NJ, USA	

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien waren vorrätig oder können über die Firmen Alexis, Böhringer Ingelheim, Brand, Carl-Roth, Carl Zeiss Mikroskopie, Eppendorf, Fluka, Gibco Invitrogen Corporation, Greiner-Bio-One, Honeywell Riedel-de Haën, Macherey-Nagel, Merck, Nunc, Sarstedt, Serva, Sigma-Aldrich, VWR International oder Wenzel bezogen werden.

**Technik und Geräte**

Autklav	Systemec 5075 EL Autoklav	Systemec Wettenberg, Deutschland
Biofreezer	MDF-U50V	Sanyo Fisher München, Deutschland
Blotter	Semi-Phor	Hoefler Scientific Instruments San Francisco, CA, USA
Brutschrank		Binder Tuttlingen, Deutschland
Elektrophorese- kammer		Peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen, Deutschland
Gefrierschränke	Premium, Comfort	Liebherr Ochsenhausen, Deutschland
HPLC	HPLC	Jasco Gross-Umstadt, Deutschland
	HPLC 1100	Agilent Technologies Inc. Santa Clara, CA, USA
HPLC-Säulen	Hypersil ODS-C18, 100 x 2,1mm, 5µm	VWR Darmstadt, Deutschland
	LiChroCART 125-4	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
	LiChrospher 100RP-18	VWR Darmstadt, Deutschland
	Phenomenex Luna 5u C18(2) 100Å; 250 x 4,60mm	VWR Darmstadt, Deutschland
Kühlschränke		Liebherr Ochsenhausen, Deutschland; Arneg Leondin/Linz, Österreich
Lumi-Imager		Boehringer Mannheim (Boehringer Ingelheim Ingelheim, Deutschland)
Massenspektrometer	API 2000 LC/MS-MS	Perkin Elmer Wiesbaden, Deutschland
Mikroskope	Axioskop	Zeiss Göttingen, Deutschland
	Axiovert 25	Zeiss Göttingen, Deutschland



	Axiovert 40 C	Zeiss Göttingen, Deutschland
<sup>1</sup> H-NMR	AMX 400 (MHz)	Bruker Ettlingen, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipettus akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co KG Eberstadt, Deutschland
Plattenlesegeräte	GENios	Tecan Deutschland GmbH Crailsheim, Deutschland
	Microplate-Reader Model 450	Bio-Rad Laboratories GmbH München, Deutschland
Power Station	Victor <sup>3</sup> V 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer Wiesbaden, Deutschland
	Consort E835	Consort Tumhout, Belgien Peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen, Deutschland
Rüttler	Über-Kopf-Inkubator RK 10-VS	Heto Lab Equipment Allerød, Dänemark
	Roto-Shake Genie	Scientific Industries Bohemia, NY, USA
Software	AxioVision Software	Carl Zeiss MicroImaging GmbH Göttingen, Deutschland
	Comet II	Perceptive Instruments Suffolk, England
	ChemStation	Agilent Technologies Inc. Santa Clara, CA, USA
	Excel, Powerpoint, Word	Microsoft Schleißheim, Deutschland
	Isis Draw 2.1	Elsevier MDL Frankfurt a.M., Deutschland
	Origin 6,0 Professional	Additive Friedrichsdorf, Deutschland
	P/ACE 32Karat 7,0	Beckman Coulter GmbH Krefeld, Deutschland
	PE Sciex Analyst	Perkin Elmer

	Wallac 1420 Manager	Wiesbaden, Deutschland Perkin Elmer Wiesbaden, Deutschland
Spektrophotometer	NanoDrop	NanoDrop Technologies Wilmington, DE, USA
Sterilbank	Kojair	Kojair Biowizard Vilppula, Finnland
Thermomixer	Modell 5436	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Trockenschrank	U40	Memmert GmbH & Co KG Schwabach, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex RB225	Bandelin electronic GmbH und Co KG Berlin, Deutschland
Vortex	Minishaker IKA MS1	IKA Staufen, Deutschland
Waagen	Feinwaage CP64-0CE	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
	Feinwaage Sartorius Research	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
	Grobwaage	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Wasserbäder		Julabo Seelbach, Deutschland
	Schüttelwasserbad geschlossen	Köttermann Labortechnik GmbH & Co KG Uetze/Hänigsen, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415 und 5417 R	Eppendorf Hamburg, Deutschland
	Megafuge 1,0 R	Heraeus Hanau, Deutschland

## 10. Referenzen

### 10.1 Literatur

- Adler, I.-D.; Zouth, R. and Schmid, E. – Perturbation of cell division by acrylamide *in vitro* and *in vivo*. *Mutation Research*, **1993**, 301, 249-254.
- Andreassen, P. R.; Ho Gary, P.H. and Andrea, A.D.D. – DNA damage responses and their many interactions with the replication fork. *Carcinogenesis*, **2006**, 27(5), 883-892.
- Arand, M.; Cronin, A.; Adamska, M. and Oesch, F. – Epoxide Hydrolases: Structure, Function, Mechanism, and Assay. *Methods in Enzymology*, **2005**, 400, 569-588.
- Armstrong, J.S. – Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *BioEssays*, **2006**, 28(3), 253-260.
- Baum, M.; Fauth, E.; Fritzen, S.; Herrmann, A.; Mertes, P.; Merz, K., Rudolphi, M.; Zankl, H. and Eisenbrand, G. – Acrylamide and glycidamide: genotoxic effects in V79-cells and human blood. *Mutation Research*, **2005**, 580, 61-69.
- Besaratinia, A. and Pfeifer G. P. – DNA adduction and mutagenic properties of acrylamide. *Mutation Research*, **2005**, 580, 31-40.
- Boettcher, M., I.I.; Schettgen, T.; Kütting, B.; Pischetsrieder, M. and Angerer, J. – Mercapturic acids of acrylamide and glycidamide as biomarkers of the internal exposure to acrylamide in the general population. *Mutation Research*, **2005**, 580, 167-176.
- Brookes, P. and Lawley, P.D. – The Alkylation of Guanosine and Guanylic Acid. *The Biochemical Journal*, **1961**, 3923-3928.
- Buchko, G. W.; Wallace, S. S. and Kennedy, M. A. – Letter to the Editor: Base excision repair: NMR backbone assignments of Escherichia coli formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *Journal of Biomolecular NMR*, **2002**, 22, 301-302.
- Calleman C.J.; Bergmark, E.; Stern, L.G. and Costa, L.G. – A Nonlinear Dosimetric Model for Hemoglobin Adduct Formation by the Neurotoxic Agent Acrylamide and Its Genotoxic Metabolite Glycidamide. *Environmental Health Perspectives*, **1993**, 99, 221-223.
- Calleman, C.J.; Wu, Y.; He, F.; Tian, G.; Wang, Y.; Crofton, K.M.; Fenell, T. *et al.* – Relationships between biomarkers of exposure and neurological effects in a group of workers exposed to acrylamide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **1994**, 126(2), 361-71.
- Campbell, N.A. – Biologie. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg-Berlin-Oxford, **2000**, 577.

- Cao, X.G.; Li, X.X.; Bao, Y.Z.; Xing, N.Z. and Chen, Y. – Responses of Human Lens Epithelial Cells to Quercetin and DMSO. *Investigative Ophthalmology & Visuell Science*, **2007**, 48(8), 3714-3718.
- Chang, H.Y. and Yang, X. – Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2000**, 64(4), 821-846.
- Chelule, P.K.; Pegoraro, R.J.; Gqualeni, N. and Dutton, M.F. – The frequency of Cytochrome P450 2E1 polymorphisms in Black South Africans. *Dis Markers*, **2006**, 22 (5-6), 351-354.
- Chen, T.; Pearce, L.L.; Peterson, J.; Stoyanovsky, D. and Billiar, T.R. – Glutathione depletion renders rat hepatocytes sensitive to nitric oxide donor-mediated toxicity. *Hepatology*, **2005**, 42 (3), 598-607.
- Cheng, X.; Kelso, C.; Hornak, V.; de los Santos, C.; Grollman, A., P. and Simmerling, C. – Dynamic Behavior of DNA Base Pairs Containing 8-Oxoguanine. *Journal of the American Chemical Society*, **2005**, 127, 13906-13918.
- Chi, L.; Ke, Y.; Luo, C.; Gozal, D. and Liu, R. – Depletion of reduced glutathione enhances motor neuron degeneration *in vitro* and *in vivo*. *Neuroscience*, **2007**, 144, 991-1003.
- Citti, L.; Gervasi, P.G.; Turchi, G.; Belluci, G. and Bianchini, R. – The reaction of 3,4-epoxy-1-butene with deoxyguanosine and DNA *in vitro*: synthesis and characterization of the main adducts. *Carcinogenesis*, **1984**, 5(1), 47-52.
- Clement, F. HEATOX in Haller-Brem, S. – Krebserregende Frühstücksflocken? *Unimagazin*, **2006**, Universität Zürich.
- Coste, F.; Ober, M.; Carell, T.; Boiteux, S.; Zelwer, C. and Castaing, B. – Structural Basis for the Recognition of the FapydG Lesion (2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) by Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase. *The Journal of Biological Chemistry*, **2004**, 279(42), 44074-44083.
- Countryman, P.I. and Heddle, J.A. – The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated culture of human lymphocytes. *Mutation Research*, **1976**, 41, 321-332.
- Cunniffe, S.M.; Lomax, M.E. and O'Neill, P. – An AP site can protect against the mutagenic potential of 8-oxoG when present within a tandem clustered site in E.coli. *DNA Repair (Amst)*, **2007**, Abstract.
- Cushnir, J.R.; Naylor, S.; Lamb, J.H. and Farmer, P.B. – Tandem Mass Spectrometric Approaches for the Analysis of Alkylguanines in Human Urine. *Organic Mass Spectrometry*, **1993**, 28, 552-558.
- Da Costa, G.G.; Churchwell, M.I.; Hamilton, L.P.; von Tungeln, L.S.; Beland, F.A.; Marques, M.M. and Doerge, D.R. – DNA Adduct Formation from Acrylamide via Conversion To Glycidamide in Adult and Neonatal Mice. *Chemical Research of Toxicology*, **2003**, A-J.

- Dearfield, K.L.; Douglas, G.R.; Ehling, U.H.; Moore, M.M.; Sega, G.A. and Brusick, D.J. – Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutation Research*, **1995**, 330, 71-99.
- De Wilde, T.; De Meulenaer, B.; Mestdagh, F.; Govert, Y.; Ooghe, W.; Fraselle, S.; Demeulemeester, K.; Van Peteghem, C.; Calus, A.; Degroot, J.-M. and Verhe, R. – Selection Criteria for Potato Tubers to Minimize Acrylamide Formation during Frying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 2199-2205.
- Dipple, A. – Commentary DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, **1995**, 16(3) 437-441.
- Doerge, D.R.; Gamboa da Costa, G.; Mc Daniel, L.P.; Churchwell, M.I.; Twaddle, N.C. and Beland, F.A. – DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats. *Mutation Research*, **2005**, 580, 131-141.
- Durling, L.J.K. and Abrahamsson-Zetterberg, L.A. – Comparison of genotoxicity between three common heterocyclic amines and acrylamide. *Mutation Research*, **2005**, 580, 103-110.
- Dybing, E.; Scanner, T. – Risk assessment of acrylamide in foods. *Toxicological Sciences*, **2003**, 75, 7-15.
- Eastmond, D.A. and Tucker, J.D. – Identification of aneuploidy-inducing agents by cytosine arabinoside and its synergistic interaction with hydroxyurea in human lymphocytes. *Mutagenesis*, **1994**, 9(3) 273-277.
- Efrati, E.; Tocco, G.; Eritja, R.; Wilson, S. H. and Goodman, M. F. – “Action-at-a-Distance” Mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, **1999**, 274(22), 15920-15926.
- Eisenbrand, G.; Metzler, M. and Hennecke, F.J. – Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner. Wiley-VCH, **2005**.
- Elschenbroich, S. – Zytotoxizität von Acrylamid in Säugerzellen. Diplomarbeit, **2006**, Universität Karlsruhe (TH).
- European Commission Joint Research Centre – European Union Risk Assessment Report: Acrylamide, **2002**, 24.
- Falbe, J. und Regitz, M. (Hrsg) – Römpp. Basislexikon Chemie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York*, **1999**, A-Z.
- Favor, J. and Shelby, M. D. – Transmitted mutational events induced in mouse germ cells following acrylamide or glycidamide exposure. *Mutation Research*, **2005**, 580, 21-30.
- Fenech, M. – The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*. **2000**, 455, 81-95.
- Fenech, M.; Chang, W.P.; Kirsch-Volders, M.; Holland, N.; Bonassi, S. and Zeiger, E. – HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-

- block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, **2003**, 534, 65-75.
- Fennell, T. R. and Friedman M. A. – Comparison of Acrylamide Metabolism in Humans and Rodents. *Chemistry and safety of acrylamide in food*, **2005**, 109-116.
- Fuhr, U.; Boettcher, M. I.; Kinzig-Schippers, M.; Weyer, A.; Jetter, A.; Lazar, A.; Taubert, D.; Tomalik-Scharte, D.; Pournara, P.; Jakob, V.; Harlfinger, S.; Klaasen, T.; Berkessel, A.; Angerer, J.; Sörgel, F. and Schömig, E. – Toxicokinetics of Acrylamide in Humans after Ingestion of a Defined Dose in a Test Meal to Improve Risk Assessment for Acrylamide Carcinogenicity. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research*, **2006**, 15(2), 266-271.
- Fütterer, N. – Induktion von Caspase-3 Aktivität in V79-Zellen und in primären Hepatozyten der Ratte durch Acrylamid, Forschungsarbeit TU Kaiserslautern, **2005**.
- Gallagher, E.; Kavanagh, T. and Eaton, D. – Glutathione, oxidized glutathione and mixed disulfides in biological samples. *Methods in Toxicology*, **1994**, 1B:349.
- Garey, J.; Ferguson, S. A. and Paule, M. G. – Developmental and behavioural effects of acrylamide in Fischer 344 rats. *Neurotoxicology and Teratology*, **2005**, 27, 553-563.
- Ghanayem, B. I.; McDaniel, L. P.; Churchwell, M. I.; Twaddle, N. C.; Snyder, R.; Fennell, T. R. and Doerge, D. R. – Role of CYP2E1 in the Epoxidation of Acrylamide to Glycidamide and Formation of DNA and Hemoglobin Adducts. *Toxicological Sciences*, **2005**, 88(2), 311-318.
- Gill, J.H. and Dive, C. – Apoptosis: Basic Mechanisms and Relevance to Toxicology. *Apoptosis in Toxicology* (R. Roberts, Ed.), **2000**, Taylor and Francis, New York, 1-19.
- Glatt, H.; Schneider, H. and Liu, Y. – V79-hCYP2E1-hSULT1A1, a cell line for the sensitive detection of genotoxic effects induced by carbohydrate pyrolysis products and other food-borne chemicals. *Mutation Research*, **2005**, 580, 41-52.
- Gökmen, V. and Senyuva, H.Z. – A simplified approach for the kinetic characterization of acrylamide formation in fructose-asparagine model system. *Food Additives and Contaminants*, **2006**, 23(4), 348-354.
- Griffin, S.J. and Houston, J.B. – Prediction of *in vitro* intrinsic clearance from hepatocytes: comparison of suspensions and monolayer cultures. *Drug metabolism and disposition: The biological fate of chemicals*, **2005**, 33(1), 115-120.
- Guguen-Guillouzo, C. and Guillouzo, A. – Modulation of functional activities in cultured rat hepatocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **1983**, 53-54(1-2), 35-56.
- Hagmar, L.; Törnqvist, M.; Nordaner, C.; Rosen, I.; Bruze, M.; Kautiainen, A.; Magnusson, A.-L.; Malmberg, B.; Aprea, P.; Granath, F. and Axmon, A. – Health effects of occupational exposure to acrylamide using haemoglobin adducts as bio-

- markers of internal dose. *Scandinavian Journal of work, environmental and health*, **2001**, 27 (4) 219-226.
- Hagmar, L.; Wirfält, E.; Paulsson, B. and Törnqvist, M. – Differences in haemoglobin adduct levels of acrylamide in the general population with respect to dietary intake, smoking habits and gender. *Mutation Research*, **2005**, 580, 157-165.
- Hasler, J.A.; Estabrook, R.; Murray, M.; Pikuleva, I.; Waterman, M.; Capdevila, J.; Holla, V.; Helvig, C.; Falck, J.R.; Farell, G.; Kaminsky, L.S.; Spivack, S.D.; Boitier, E. and Beaune, P. – Human cytochromes P 450. *Molecular Aspects of medicine*, **1999**, 20, 1-137.
- Heddle, J.A. – A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutation Research*, **1973**, 18, 187-190.
- Heddle, J.A.; Cimino, M.C.; Hayashi, M.; Romagna, F.; Shelby, M.D.; Tucker, J.D.; Vanparys, Ph. and MacGregor, J.T. – Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **1991**, 18, 277-291.
- Hong, S.-Y.; Gil, H.-W.; Yang, J.-O.; Lee, E.-Y.; Kim, H.-.; Kim, S.-H.; Chung, Y.-H.; Hwang, S.-K. and Lee, Z.-W. – Pharmacokinetics of Glutathione and its metabolites in normal subjects. *Journal of Korean Medical Science*, **2005**, 20, 721-726.
- Hsieh, M., H. and Ngyen, H. T. – Molecular Mechanism of Apoptosis Induced by Mechanical Forces. *International Review of Cytology*, **2005**, 245, 45-89.
- Husøy, T.; Abrahamsson-Zetterberg, L.; Ølstørn, H.B.; Paulsen, J.E. and Alexander, J. – Adenomatous polyposis coli influences micronuclei induction by PhIP and acrylamide in mouse erythrocytes. *Mutation Research*, **2005**, 580, 111-118.
- Ishihara, Y.; Shiba, D. and Shimamoto, N. – Primary hepatocyte apoptosis is unlikely to relate to caspase-3 activity under sustained endogenous oxidative stress. *Free Radical Research*, **2005**, 39(2), 163-173.
- Ishihara, Y. and Shimamoto, N. – Involvement of endonuclease G in nucleosomal DNA fragmentation under sustained endogenous oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*, **2006**, 281(10), 6726-6733.
- Johansson, F.; Lundell, T.; Rydberg, P.; Erixon, K. and Jenssen, D. – Mutagenicity and DNA repair of glycidamide-induced adducts in mammalian cells. *Mutation Research*, **2005**, 580, 81-89.
- Jones, J. W. and Robins, R. K. – Purine Nucleosides. III. Methylation Studies of Certain Naturally Occurring Purine Nucleosides, **1962**, 85, 193-201.
- Jorquera, R. and Tanguay, R. – Cyclin B-dependent kinase and caspase-1 activation precedes mitochondrial dysfunction in fumarylacetoacetate induced apoptosis. *The FASEB Journal*, **1999**, 13, 2284-2298.
- Kalweit, S.; Utesch, D.; von der Hude, W. and Madle, S. – Chemically induced micronucleus formation in V79 cells--comparison of three different test approaches. *Mutation Research*, **1999**, 439(2), 183-190.

- Kamp, H.G. – Untersuchungen zur nephrotoxischen Wirkung des Mykotoxins Ochratoxin A. Dissertation TU Kaiserslautern, **2004**.
- Kang, Y.J. and Enger, M.D. – Buthionine sulfoximine-induced cytostasis does not correlate with glutathione depletion. *The American Journal of Physiology*, **1992**, 262(1Pt1), C122-127.
- Kellert, M.; Scholz, K.; Wagner, S.; Dekant, W. and Völkel W. – Quantitation of mercapturic acids from acrylamide and glycidamide in human urine using a column switching tool with two trap columns and electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A.*, **2006**, 1131(1-2), 58-66.
- Kelly, B.S.; Antholine, W.E. and Griffith, O.W. – Escherichia coli  $\gamma$ -Glutamylcysteine Synthetase: Two active site metal ions affect substrate and inhibitor binding. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277(1), 50-58.
- Kirman, C. R.; Gargas, M., L.; Deskin, R.; Tonner-Navarro, L. and Andersen, M.E. – A physiologically based pharmacokinetic model for acrylamide and its metabolite, glycidamide, in the rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **2002**, 66, 253-274.
- Kirsch-Volders, M.; Sofuni, T.; Aardema, M.; Albertini, S.; Eastmond, D.; Fenech, M.; Ishidate, M.Jr.; Lorge, E.; Norppa, H.; Surrallés, J.; von der Hude, W. and Wakata, A. – Report from the *in Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenicity*, **2000**, 35(3), 167-172.
- Klauning, J. E. and Kamendulis, L. M. – Mechanisms of acrylamide induced rodent carcinogenesis. *Advances in experimental medicine and biology: AEMB*, **2005**, 561, 49-62.
- Knaap, A.G.A.C.; Kramers, P.G.N.; Voogd, C.E.; Bergkamp, W.G.M.; Groot, M.G.; Langebroek, P.G.; Mout, H.C.A.; van der Stel, J.J. and Verharen, H.W. – Mutagenic activity of acrylamide in eukaryotic systems but not in bacteria. *Mutagenesis*, **1988**, 3(3), 263-268.
- Korean, J. – Pharmacokinetics of Glutathione and its Metabolites in Normal Subjects. *Med Sci*, **2005**, 20, 721-726.
- Kotlyar, M. and Carson, S.W. – Effects of obesity on the cytochrome P450 enzyme system. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **1999**, 37(1), 8-19.
- Koval, V. V.; Kuznetsov, N. A.; Zharkov, D. O.; Ishchenko, A. A.; Douglas, K. T.; Nevinsky, G. A. and Fedorova, O. S. – Pre-steady-state kinetics shows differences in processing of various DNA lesions by Escherichia coli formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Research*, **2004**, 32(3).
- Krebsfänger, N.; Mürdter T.E.; Zanger U.M.; Eichelbaum M.F. and Doehmer, J. – V79 Chinese Hamster Cells Genetically Engineered for Polymorphic Cytochrome P450 2D6 and their Predictive Value for Human. *ALTEX* **2003**, 143-154.
- Kroemer, G.; Zamzami, N. and Susin S.A. – Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology today*, **1997**, 46(18/1), 44-51.



- Kulling, S. E.; Jacobs, E.; Pfeiffer, E. and Metzler, M. – Studies on the genotoxicity of the mammalian lignans enterolactone and enterodiol and their metabolic precursors at various endpoints *in vitro*. *Mutation Research*, **1998**, 416, 115-124.
- Kunz, S. – Untersuchungen zur tumorpromovierenden Wirkung nicht-dioxinartiger polychlorierter Biphenyle in der Rattenleber, TU Kaiserslautern, **2004**.
- Kurebayasshi, H. and Ohno Y. – Metabolism of acrylamide to glycidamide and their cytotoxicity in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors. *Archives of toxicology*, **2006**.
- Latif, F.; Moschel, C.; Hemminki, K. and Dipple, A. – Styrene Oxide as a Stereochemical Probe for the Mechanism of Alkylation at Different Sites on Guanosine. *Chemical research in toxicology*, **1988**, 1, 364-369.
- Laval, J. – Role of DNA Repair Enzymes in the Cellular Resistance to Oxidative Stress. *Pathologie-Biologie*, **1996**, 44(1), 14-24.
- Levine, R.A. and Smith, R. E. – Sources of Variability of Acrylamide Levels in a Cracker Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53(11), 4410-4416.
- Lewis D.F.; Ioannides C. and Parke D.V. – Cytochromes P450 and species differences in xenobiotic metabolism and activation of carcinogen. *Environmental Health Perspectives*, **1998**, 106(10), 633-641.
- Li, S.X.; Cui, N.; Zhang, C.L.; Zhao, X.L.; Yu, S.F. and Xie, K.Q. – Effect of subchronic exposure to acrylamide induced on the expression of bcl-2, bax and caspase-3 in the rat nervous system. *Toxicology*, **2006**, 217(1), 46-53.
- Lindl, T. – Zell- und Gewebekultur : Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. *Spektrum Akad. Verlag*, Heidelberg, **2000**.
- Liu, H.; Chang, D.W. and Yang, X. – Interdimer Processing and Linearity of Pro-caspase-3 Activation. *The Journal of Biological Chemistry*, **2005**, 280(12), 11578-11582.
- LoPachin, R.M. – The Role of Fast Axonal Transport in Acrylamide Pathophysiology: Mechanism or Epiphenomenon? *NeuroToxicology*, **2002**, 253-257.
- Lucas, D.; Berthou, F.; Girre, C.; Poitrenaud, F. and Ménez, J.F. – High-performance liquid chromatographic determination of chlorzoxazone and 6-hydroxy-chlorzoxazone in serum: a tool for indirect evaluation of cytochrome P450E1 activity in humans. *Journal of Chromatography*, **1993**, 622(1), 79-86.
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F. and Sambrook, J. – Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, **1982**, 280/281.
- Manjanatha, M.G.; Aidoo, A.; Shelton, S.D.; Bishop, M.E.; McDaniel, L.P.; Lyn-Cook, L.E. and Doerge, D.R. – Genotoxicity of Acrylamide and Its Metabolite Glycidamide Administered in Drinking Water to Male and Female Big Blue Mice. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **2006**, 47, 6-17.

- Manière, I.; Godard, T.; Doerge, D.R.; Churchwell, M.I.; Guffroy, M.; Laurentie, M. and Poul, J.-M. – DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide. *Mutation Research*, **2005**, 580, 119-129.
- Marsh, G.M.; Lucas, L.J.; Youk, A.O. and Schal, L.C. – Mortality patterns among workers exposed to acrylamide:1994 follow up. *Journal of occupational and environmental medicine*, **1999**, 56, 181-190.
- Marsh, G.M.; Youk, A.O.; Buchanich, J.M.; Kant, I.J. and Swaen, G. – Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: updated follow up. *Journal of occupational and environmental medicine*, **2007**, 49(1), 82-95.
- Martin, K.R. – Targeting Apoptosis with Dietary Bioactive Agents. *Experimental biology and medicine* (Maywood), **2006**, 231, 117-129.
- Martins, C.; Oliveira, N.G.; Pingarilho, M.; Gamboa da Costa, G.; Martins, V.; Marques, M.M.; Beland, F.A.; Churchwell, M.I.; Doerge, D.R.; Rueff, J. and Gaspar, J.F. – Cytogenetic damage induced by acrylamide and glycidamide in mammalian cells: correlation with specific glycidamide-DNA adducts. *Toxicological sciences*, **2007**, 95(2), 383-390.
- Minozzo, R.; Deimling, L.I.; Gigante, L.P. and Santos-Mello, R. – Micronuclei in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead. *Mutation Research*, **2004**, 565, 53-60.
- Moon, Y.J.; Wang, X. and Morris, M.E. – Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol. In Vitro*, **2006**, 20(2), 187-210.
- Moore, M.M.; Amtower, A.; Doerr, C.; Brock, K.H. and Dearfield, K.L. – Mutagenicity and Clastogenicity of Acrylamide in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. *Environmental Mutagenesis*, **1987**, 9, 261-267.
- Morland, I.; Rolseth, V.; Luna, L.; Rognes, T.; Bjoras, M. and Seeberg, E. – Human DNA glycosylases of the bacterial Fpg/MutM superfamily: an alternative pathway for the repair of 8-oxoguanine and other oxidation products in DNA. *Nucleic Acids Research*, **2002**, 30(22), 4926-4936.
- Mosmann, T. – Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, **1983**, 65, 55-63.
- Mucci, L.A.; Adami, H.-O. and Wolk, A. – Prospective study of dietary acrylamide and risk of colorectal cancer among women. *International Journal of Cancer*, **2006**, 118, 169-173.
- Neeley, W.L. and Essigmann, J. M. – Mechanism of Formation, Genotoxicity, and Mutation of Guanine Oxidation Products. *Chemical Research in Toxicology*, **2006**, 19(4), 491-505.
- O'Brien, P.J.; Chan, K. and Silber, P.M. – Human and animal hepatocytes *in vitro* with extrapolation *in vivo*. *Chemico-biological interactions*, **2004**, 150(1), 97-114.

- O'Brien, P.J.; Renwick, A.G.; Constable, A.; Dybing, E.; Müller, D.J.G.; Schlatter, J.; Slob, W.; Tueting, W.; van Benthem, J.; Williams, G.M. and Wolfreys, A. – Approaches to the risk assessment of genotoxic carcinogens in food: A critical appraisal. *Food and Chemical Toxicology*, **2006**, 44, 1613-1635.
- Oe, T.; Kambouris S.J.; Walker V.E.; Menq Q.; Recio L.; Wherli S.; Chaudhary A.K. and Blair I.A. – Persistence of N7-(2,3,4-trihydroxybutyl)guanine adducts in the livers of mice and rats exposed to 1,3-butadiene. *Chemical research in toxicology*, **1999**, 12(3), 247-257.
- Ogata, M.; Inanami, O.; Nakajima, M.; Nakajima, T.; Hiraoka, W. and Kuwabara, M. – Ca<sup>2+</sup>-dependent and Caspase-3-independent Apoptosis Caused by Damage in Golgi Apparatus due to 2,4,5,7-Tetrabromorhodamine 123 Bromide-induced Photodynamic Effects. *Photochemistry and Photobiology*, **2003**, 241-247.
- Oliveira, N.G.; Castro, M.; Rodrigues, A.S.; Goncalves, I.C.; Gil, O.M.; Fernandes, A.P.; Toscano-Rico, J.M. and Rueff, J. – Wortmannin enhances the induction of micronuclei by low and high LET radiation. *Mutagenesis*, **2002**, 18(1), 37-44.
- Ostling, O. and Johanson, K.J. – Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1984**, 123(1), 291-8.
- Park, J.; Kamendulis, L.M.; Friedman, M.A. and Klaunig, J.E. – Acrylamide-induced cellular transformation. *Toxicological Sciences*, **2002**, 65(2), 177-183.
- Paulsson, B.; Kotova, N.; Grawe, J.; Henderson, A.; Granath, F.; Golding, B. and Törnqvist, M. – Induction of micronuclei in mouse and rat by glycidamide, genotoxic metabolite of acrylamide. *Mutation Research*, **2003**, 535, 15-24.
- Paulsson, B.; Larsen, K.-O. and Törnqvist, M. – Hemoglobin adducts in the assessment of potential occupational exposure to acrylamides - three case studies. *Scand. J. Work Environ. Health*, **2006**, 32(2), 154-159.
- Paulsson, B.; Rannug, A.; Henderson, A.P.; Golding, B.T.; Törnqvist, M. and Warholm, M. – *In vitro* studies of the influence of glutathione transferases and epoxide hydrolase on the detoxification of acrylamide and glycidamide in blood. *Mutation Research*, **2005**, 580, 53-59.
- Pauwels, W. and Veulemans, H. – Comparison of ethylene, propylene and styrene 7,8-oxide *in vitro* adduct formation on N-terminal valine in human haemoglobin and on N-7-guanine in human DNA. *Mutation Research*, **1998**, 418, 21-33.
- Payne, G. B. and Williams, P. H. – Reactions of Hydrogen Peroxide. VI. *Alcaline Epoxidation of Acrylonitrile*, **1960**, 651-659.
- Pelucchi, C.; Galeone, C.; Levi, F.; Negri, E.; Franceschi, S.; Talamini, R.; Bosetti, C.; Giacosa, A. and La Vecchia, C. – Dietary acrylamide and human cancer. *International Journal of Cancer*, **2006**, 118, 467-471.

- Pennathur, S.; Ido, Y.; Heller, J.I.; Byun, J.; Danda, R.; Pergola, P.; Williamson, J.R. and Heinecke, J.W. – Reactive carbonyls and polyunsaturated fatty acids produce a hydroxyl radical-like species: a potential pathway for oxidative damage of retinal proteins in diabetes. *The Journal of Biological Chemistry*, **2005**, 280(24), 22706-22714.
- Perez, C.; Lopez de Cerain, A. and Bello, J. – Induction of micronuclei in V79 cells after combined treatments with heterocyclic aromatic amines. *Food and Chemical Toxicology*, **2002**, 40, 1463-1467.
- Pilch, D.S.; Kirolos, M.A.; Liu, X.; Plum, G.E. and Breslauer, K.J. – Berenil [1,3-bis(4'-amidinophenyl)triazene] binding to DNA duplexes and to a RNA duplex: evidence for both intercalative and minor groove binding properties. *Biochemistry*, **1995**, 34(31), 9962-9976.
- Puppel, N. – Beeinflussung zellulärer Signalübertragungskaskaden durch Apfelinhaltsstoffe und verwandte Naturstoffe. Diplomarbeit, TU Kaiserslautern, **2003**.
- Puppel, N.; Tjaden, Z.; Fueller, F. and Marko, D. – DNA strand breaking capacity of acrylamide and glycidamide in mammalian cells. *Mutation Research*, **2005**, 580, 71-80.
- Rice, J., M. – The carcinogenicity of acrylamide. *Mutation Research*, **2005**, 580, 3-20.
- Rigacci, S.; Iantomasi, T.; Marraccini, P.; Berti, A.; Vincenzini, M.T. and Ramponi, G. – Evidence for glutathione involvement in platelet-derived growth-factor-mediated signal transduction. *The Biochemical Journal*, **1997**, 324(Pt 3), 791–796.
- Rousset, M. – The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie*, **1986**, 68, 1035-1040.
- Sands, M.; Kron, M.A. and Brown, R.B. – Pentamidine: a review. *Reviews of infectious diseases*, **1985**, 7, 625-634.
- Schmeiser, H.H.; Arlt, V.M.; Bieler, C.A.; Sorg, B.; Erdinger, L.; Rastall, A. and Wiesler, M. – *In vivo* DNA-Addukte des Luftschadstoffes 3-Nitrobenzanthron; Bildung und Identifizierung. Forschungsbericht FZKA-BWPLUS, DKFZ Heidelberg, **2002**.
- Schuler, M. – Aneuploidogene und klastogene Wirkmechanismen von Östrogenen in verschiedenen Säugerzellen *in vitro*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern, **1994**.
- Segerbäck, D.; Calleman, C.J.; Schroeder, J.L.; Costa, L.G. and Faustman, E.M. – Formation of N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [<sup>14</sup>C]acrylamide. *Carcinogenesis*, **1995**, 16(5), 1161-1165.
- Seglen, P.O. – Preparation of isolated rat liver cells. *Methods in Cell Biology*, **1976**, 13, 29-83.
- Shiver, T.M.; Sackett, D.L.; Knipling, L. and Wolff, J. – Intermediate Filaments and Steroidogenesis in Adrenal Y-1 Cells: Acrylamide Stimulation of Steroid Production. *Endocrinology*, **1992**, 131(1), 201-207.

- Sickles, D. W.; Stone, J. D. and Friedman, M. A. – Fast Axonal Transport: A Site of Acrylamide Neurotoxicity? *NeuroToxicology*, **2002**, 23, 223-251.
- Silvari, V.; Haglund, J.; Jenssen, D.; Golding, B.T.; Ehrenberg, L. and Törnqvist, M. – Reaction-kinetic parameters of glycidamide as determinants of mutagenic potency. *Mutation Research*, **2005**, 580, 91-101.
- Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R. and Schneider, E.L. – A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, **1988**, 175, 184-191.
- Smart, D.J.; Chipman, J.K. and Hodges, N.J. – Activity of OGG1 variants in the repair of pro-oxidant-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosin. *DNA Repair (Amest.)*, **2006**, 11, 1337-1345.
- Solomon, J. J.; Fedyk, J.; Mukai, F. and Segal, A. – Direct Alkylation of "2'-Deoxynucleosides and DNA following *in Vitro* Reaction with Acrylamide. *Cancer Research*, **1985**, 45, 3465-3470.
- Stephanie, M. – Acrylamid. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern, **2003**.
- Stock, J. – Zytotoxizität von Treosulfan nach Glutathiondepletion durch BSO bei humanen Glioblastomzellen. Dissertation, Universität Tübingen, **2005**.
- Stoiber, T.; Bonacker, D.; Böhm, K. J.; Bolt, H. M.; Thier, R.; Degen, G. H. and Unger, E. – Disturbed microtubule function and induction of micronuclei by chelate complexes of mercury (II). *Mutation Research*, **2004**, 563, 97-106.
- Strupp, C. – Induktion von Cytochrom P450 2E1 in kultivierten Ratten-Hepatozyten und CYP2E1-Ausstattung der intestinalen Zell-Linie CaCo2. Forschungsarbeit, Technische Universität Kaiserslautern, **2003**.
- Sumner, S.C.J.; Fennell, T.R.; Moore, T.A.; Chanas, B.; Gonzalez, F. and Ghanayem, B.I. – Role of Cytochrome P450 2E1 in the Metabolism of Acrylamide and Acrylonitrile in Mice. *Chemical Research in Toxicology*, **1999**, 12, 1110-1116.
- Tareke, E.; Rydberg, P.; Karlsson, P.; Eriksson, S. and Törnqvist, M. – Acrylamide: A Cooking Carcinogen? *Chemical Research in Toxicology*, **2000**, 13, 517-522.
- Tareke, E.; Rydberg, P.; Karlsson, P.; Eriksson, S. and Törnqvist, M. – Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. *Journal of agricultural and food chemistry*, **2002**, 50(17), 4998-5006.
- Tareke, E.; Twaddle, N.C.; McDaniel, L.P.; Churchwell, M.I.; Young, J.F. and Doerge, D.R. – Relationships between biomarkers of exposure and toxicokinetics in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice administered single doses of acrylamide and glycidamide and multiple doses of acrylamide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2006**, 217(1), 63-75.
- Tchou, J.; Bodepudi, V.; Shibutani, S.; Antoshechkin, I.; Miller, J.; Grollman, A.P. and Johnson, F. – Substrate Specificity of Fpg Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, **1994**, 269(21), 15318-15324.

- Thielen, S.; Baum, M.; Hoffmann, M.; Loeppky, R.N. and Eisenbrand, G. – Genotoxicity of glycidamide in comparison to (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and  $\alpha$ -acetoxy-N-nitroso-diethanolamine in human blood and V79-cells. *Molecular Nutrition Food Research*, **2006**, 50(4-5), 430-436.
- Tice, R.R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J.-C. and Sasaki, Y.F. – Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **2000**, 35, 206-221.
- Tretyakova, N.Yu.; Lin, Y.-P.; Upton, P.B.; Sangaiah, R. and Swenberg, J.A. – Macromolecular adducts of butadiene. *Toxicology*, **1996**, 113, 70-76.
- Tsai-Turton, M. and Luderer, U. – Opposing Effects of Glutathion Depletion and Follicle-Stimulating Hormone on Reactive Oxygen Species and Apoptosis in Cultured Preovulatory Rat Follicles. *Endocrinology: official journal of the Endocrine Society*, **2006**, 147(3), 1224-12236.
- Tyl, R.W. and Friedman, M.A. – Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reproductive Toxicology*, **2003**, 17, 1-13.
- Vesper, H.W.; Ospina, M.; Meyers, T.; Ingham, L.; Smith, A.; Gray, J.G. and Myers, G.L. – Automated method for measuring globin adducts of acrylamide and glycidamide at optimized Edman reaction conditions. *Rapid Communications in mass spectrometry*, **2006**, 20, 959-964.
- Vogt, B.L. and Richie, J.P.Jr. – Glutathione depletion and recovery after acute ethanol administration in the aging mouse. *Biochemical pharmacology*, **2007**, 73(10), 1613-1621.
- Wang, H.; Ge, J.Y.; Zhou, Z.Q.; Wang, Z.C. and Shi, F.X. – Oral acrylamide affects the development and reproductive performance of male rats. *Zhonghua Nan Ke Xue (=National Journal of Andrology)*, **2007**, 13(6), 492-497.
- Wang, N. and Stamenovic, D. – Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth. *American journal of physiology, Cell physiology*, **2000**, 279(1), C188-C194.
- Wauthier, V.; Schenten, V.; Verbeeck, R.K. and Calderon, P.B. – Ageing is associated with increased expression but decreased activity of CYP2E1 in male wistar rats. *Life Sciences*, **2006**, 79(20), 1913-1920.
- Weinstein, I.B. – Growth Factors, Oncogenes, and Multistage Carcinogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, **1987**, 33, 213-224.
- Weinstein, I.B. – Strategies for inhibiting multistage carcinogenesis based on signal transduction pathways. *Mutation Research*, **1988**, 202, 413-420.
- Weinstein, I.B. – The Origins of Human Cancer: Molecular Mechanisms of Carcinogenesis and Their Implications for Cancer Prevention and Treatment-Twenty-seventh G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Research*, **1988**, 48, 4135-4143.

- Wilson, W.D.; Nguyen, B.; Tansious, F.A.; Mathis, A.; Hall, J.E.; Stephens, C.E. and Boykin, D.W. – Dictations that target the DNA minor groove: compound design and preparation, DNA interactions, cellular distribution and biological activity. *Current medicinal chemistry. Anti-Cancer Agents*, **2005**, 5, 389-408.
- Woodcroft, K.J. and Novak, R.F. – Xenobiotic-enhanced expression of cytochromes P450 2E1 and 2B in primary cultured rat hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, **1998**, 26(4), 372-378.
- Yamada, K.; Ojika, M. und Kigoshi, H. – Isolierung, Chemie und Biochemie von Ptaquilosid, einem Carcinogen des Adlerfarns. *Angewandte Chemie*, **1998**, 110 (13/14), 1918-1926.
- Yang, H.-J.; Lee, S.-H.; Jin, Y.; Choi, J.-H.; Han, D.-U.; Chae, C.; Lee, M.-H. and Han, C.-H. – Toxicological effects of acrylamide on rat testicular gene expression profile. *Reproductive Toxicology*, **2005**, 19, 527-534.
- Yaylayan, V. and Stadler, R.H. – Acrylamide formation in food: a mechanistic perspective. *Journal of AOAC International*, **2005**, 88(1), 262-267.
- Young, J.F.; Luecke, R.H. and Doerge D.R. – Physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic model for acrylamide and its metabolites in mice, rats and human. *Chemical research in toxicology*, **2007**, 20(3), 388-399.
- Yousef, M.I. and El-Demerdash, F.M. – Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats. *Toxicology*, **2006**, 219, 133-141.
- Zankl, H. – Der Mikronukleus-Test in der Mutagenitätsforschung. Humangenetik im Saarland von Zang, K. und Henn, W., Röhrig-Universitätsverlag, St. Ingbert, **1999**, 251-288.
- Zerilli, A.; Lucas, D.; Ahmed, Y.; Beauge, F.; Volant, A.; Floch, H.H.; Berthou, F. and Menez, J.F. – Cytochrome P450 2E1 in rat liver, kidney and lung microsomes after chronic administration of ethanol either orally or inhalation. *Alcohol and Alcoholism*, **1995**, 30(3), 357-365.
- Zurlo, J. and Arterburn, L. M. – Characterization of a primary hepatocyte culture system for toxicological studies. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, **1996**, 32, 211-220.

## 10.2 Internet

BGVV, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin-  
jetzt -> BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung, <http://www.bfr.bund.de/>

DSMZ, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zelllinien, <http://www.dsmz.de>

European Commission Joint Research Centre (Institute for Health und Consumer  
Protection): Acrylamide. Summary Risk Assessment Report. Special Publication  
I.01.70, 2002.

INFOSAN, International Food Safety Authorities Network: Information Note No.  
2/2005 Acrylamide, [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/No\\_02\\_Acrylamide\\_Mar05\\_en\\_rev1.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_02_Acrylamide_Mar05_en_rev1.pdf)

NTP-CERHR National Toxicology Program – Center for the Evaluation of Risks to  
Human Reproduction: NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Repro-  
ductive and Developmental Effects of Acrylamide. NIH publication 05-4472  
(2005).

02.02.2006 <http://www.ub.es/biocel/wbc/biocel/pdf/08%20-%20WST02.pdf>

15.06.2003 [www.uni-kl.de/FB-Biologie/AG-Zankl/mntest.htm](http://www.uni-kl.de/FB-Biologie/AG-Zankl/mntest.htm) erstellt 27.02.2002

09.09.2003 <http://www.swan.ac.uk/cget/ejgt/article1.htm> : Parry, J.M.. A proposal for  
a new OECD Guideline for the in vitro micronucleus test.

02.01.2007 <http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm> last update 10/17/2006

10.01.2007 <http://www.rki.de> Robert Koch Institut

13.03.2007 [http://de.wikibooks.org/wiki/Biologie\\_f%C3%BCr\\_Mediziner:\\_Zytoskelett](http://de.wikibooks.org/wiki/Biologie_f%C3%BCr_Mediziner:_Zytoskelett)  
Biologie für Mediziner: Zytoskelett

09.08.2007 [http://vetstudy.johanneslink.de/pafiledb3/uploads/LernSkript\\_Para\\_Protozoa.pdf](http://vetstudy.johanneslink.de/pafiledb3/uploads/LernSkript_Para_Protozoa.pdf)

### Bildernachweis

02.10.2006 [http://www.die-schaedlingsbekaempfer.com/PRAXIS-TIPPS/Ratten\\_\\_\\_Mause/ratten\\_\\_\\_mause.html](http://www.die-schaedlingsbekaempfer.com/PRAXIS-TIPPS/Ratten___Mause/ratten___mause.html)

02.10.2006 <http://www.nlac.mahidol.ac.th/nlacwwwtha/rat.jpg>

Hanahan, D. and Weinberg, R.A., – The hallmarks of cancer. *CELL*, **2000**, 100, 57-70.



## 11. Anhang

### **Veröffentlichungen**

- 04/2004 Doris Marko, **Nicole Puppel**, Zeina Tjaden, Sandra Jakobs and Gudrun Pahlke. The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. *Molecular Nutrition Food Research*, **2004**, 48, 318-325.
- 02/2005 **Nicole Puppel**, Zeina Tjaden, Florian Füller and Doris Marko. DNA strand breaking capacity of acrylamide and glycidamide in mammalian cells. *Mutation Research*, **2005**, 580, 71-80.
- 04/2005 Melanie Kern, Zeina Tjaden, Yufanyi Ngiewih, **Nicole Puppel**, Frank Will, Helmut Dietrich, Gudrun Pahlke and Doris Marko. Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Molecular Nutrition Food Research*, **2005**, 49, 317-328.

## Posterbeiträge

- 10/2003 GDCh-Jahrestagung Chemie in München, 32. Lebensmittelchemikertag 07.10.-10.10.2003,  
**N. Puppel**, S. Jakobs, Z. Tjaden und D. Marko, Anthocyanidine interferieren strukturabhängig mit unterschiedlichen zentralen zellulären Signalwegen  
M. Kern, G. Pahlke, **N. Puppel**, F. Will, H. Dietrich, H. Becker und D. Marko, Modulation der Protein Kinase C in humanen Kolontumorzellen durch Lebensmittelinhaltsstoffe
- 11/2003 1<sup>st</sup> International Conference on Polyphenols and Health, 18.11.-21.11.2003, Vichy (Frankreich), M. Kern, G. Pahlke, **N. Puppel**, F. Will, H. Dietrich, H. Becker und D. Marko, Modulation of protein kinase C (PKC) activity in human colon cells by polyphenol-rich apple juice extract  
**N. Puppel**, S. Jakobs, Z. Tjaden und D. Marko, Anthocyanidines interfere with different cellular signalling cascades dependent on structure
- 08/2004 12<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols, 25.08.-28.08.2004, Helsinki (Finnland), M. Kern, Z. Tjaden, Y. Ngiewih, **N. Puppel**, F. Will, H. Dietrich, G. Pahlke and D. Marko, Hemmstoffe des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors in Apfelsaftextrakt
- 09/2004 GDCh-Jahrestagung Chemie in Bonn, 33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 13.09.-15.09.2004,  
**N. Puppel**, Z. Tjaden, F. Füller und D. Marko, DNA-strangbrechende Wirkung von Acrylamid und seinem Metabolit Glycidamid *in vitro*  
M. Kern, Z. Tjaden, Y. Ngiewih, **N. Puppel**, F. Will, H. Dietrich, G. Pahlke und D. Marko, Hemmstoffe des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors in Apfelsaftextrakt

- 09/2005 Euro Food Chem XIII 21-23.09.2005 und GDCh-Jahrestagung Chemie in Hamburg, 34. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 19.-21.09.2005  
D. Marko, Z. Tjaden, F. Füller and **N. Puppel**, DNA strand breaking capacity of acrylamide and glycidamide in mammalian cells
- 09/2005 DFG Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (SKLM) Thermal Processing of Food: Potential Health Benefits and Risks 25.-27.09.2005  
D. Marko, J. Westrup, T. Hofmann, **N. Puppel**  
Selected coloured Maillard reaction products inhibit cell proliferation and induce apoptosis without substantial genotoxicity in V79 cells
- 09/2006 GDCh-Jahrestagung Chemie in Dresden, 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 18.9.-20.9.2006  
**N. Puppel**, F.Füller und D. Marko, Genotoxizität von Acrylamid und Glycidamid – Ein Vergleich verschiedener biologischer Endpunkte –

## **Dank**

Frau Prof. Dr. Doris Marko danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die gute Betreuung.

Dem Landesgraduiertenkolleg Rheinlandpfalz danke ich für die Gewährung eines Stipendiums, dem BfR für die Förderung des Projektes und meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung während der Promotion.

Ich danke meinen Korrekturlesern und -leserinnen Dr. Matthias Baum, Dr. Martin Hossann, Dr. Katharina Klug und Dipl.-Ing. Pia Lohnes.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Elke Richling, die für mich die Messungen der *N7*-Gua-Addukte mittels HPLC-MS/MS durchgeführt hat. Desweiteren danke ich Dipl.-Lebensmittelchemiker Daniel Bertow für die Freundschaft und die ersten Messungen an der HPLC-MS/MS. Herrn Dipl.-Chemiker Peter Mertes und vor allem Dr. Karlheinz Merz danke ich für die Hilfe bei den Synthesen, ohne die die Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich danke dem Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. D. Schrenk für die Überlassung primärer Rattenhepatozyten. Ich danke Frau Dr. Ulrike Bernauer vom BfR für die Ermöglichung eines Aufenthaltes am Institut in Berlin und die Hilfe bei der Messung der CYP 2E1-Aktivität sowie Frau Dr. Erika Pfeiffer und Dipl.-Ernährungswissenschaftlerin Silke Gerstner bei den weiteren Messungen an der HPLC (TH Karlsruhe). Danke auch Prof. Dr. R. Fischer und Dipl.-Biologin Nadine Zekert für die Ermöglichung von tollen mehrfarbigen mikroskopischen Aufnahmen. Vielen Dank an Dr. Evelyne Fauth für die Tips beim Mikrokerntest und dem zur Verfügung stellen von Berenil als Positivkontrolle.

Ich danke meinen Helfern, meiner Forschungspraktikantin Nicole Fütterer für u.a. gemeinsame nächtliche Caspase-3-Messungen und meiner Examenskandidatin Caroline Krämer, die durch ihre tatkräftige Unterstützung die Forschung im Labor aufrecht erhielt, als ich wegen einem Bänderabriss auf Unterarmstützen lief. Ich danke für die nette Zusammenarbeit meinen Diplomandinnen Julia Westrupp und Sarah Elschenbroich. Einen Dank an Dipl.-Lebensmittelchemiker Florian Füller, der als HiWi noch den einen oder anderen Comet-Assay durchgeführt hat. Unserer ehemaligen

Technikerin Dipl.-Ing. agr. Zeina Tjaden danke ich nicht nur für ihre große Hilfe, sondern auch für ihre menschliche, herzliche Art und Freundschaft.

Selbstverständlich danke ich allen, die zum Gelingen meiner Arbeit und einer netten Arbeitsatmosphäre beigetragen haben, insbesondere ganz herzlich den Arbeitskreisen von Prof. Dr. G. Eisenbrand, Prof. Dr. M. Metzler, Prof. Dr. H. Zankl und natürlich dem eigenen Arbeitskreis – Dr. Sandra Jakobs, Dr. Michael Habermeyer, Dr. Leane Lehmann, Dr. Monika Kemény, Dr. Sandra Vatter, Dr. Gudrun Pahlke, Dr. Melanie Kern, Jessica Fritz, Diana Fridrich, Matthias Roth, Markus Fehr, Ute Boettler und Nicole Teller.

Ich danke Nadine Wollnitz, Monika Batke, Denis Eberhard, Roland Weidlich, Pia Lohnes, Falko Marschall, Kathi Klug, Laura Auer, Arina Holländer, Sascha Gerhardt sowie allen Jongleuren und Akrobaten für die vielen frohen Stunden und Freundschaft während des Studiums der Lebensmittelchemie und darüber hinaus.

Nochmals einen speziellen Dank an Dr. Martin Hossann für die Beherbergung während eines Toxkurses (München's Umgebung hat tolle Berge) und die Diskussionsbereitschaft während der Promotion und vor allem während des Zusammenschreibens.

Ich danke von ganzem Herzen meinen Freunden, die an mich geglaubt haben und meinem liebevollen Freund Martin Harich für alles!

---

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

---

#### **Nicole Puppel**

Geboren am 24.02.1977 in Frankfurt am Main

Obere Riedstr.57  
68309 Mannheim

Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: Ledig

### **Beruflicher Werdegang**

---

09/2007 –                    Projektleiterin „Produktsicherheit“  
Firma Dr. Knoell Consult GmbH

### **Promotion**

---

05/2003 – 10/2006      Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis  
Frau Prof. Dr. Doris Marko  
Thema der Dissertation: „Untersuchungen zur Genotoxizität  
von Acrylamid und Glycidamid an Säugerzellen“

06/2005                    Umzug des gesamten Lehrstuhls von der TU Kaiserslautern  
an die TH Karlsruhe  
neuer Standort: Institut für angewandte Biowissenschaften  
Abt. Lebensmitteltoxikologie

05/2005                    Gastwissenschaftlerin am Bundesinstitut für Risikobewertung  
(BfR) Berlin

09/2003 – 10/2005      Erhalt eines Promotions-Stipendiums nach dem Landesgradu-  
iertenförderungsgesetz (LGFG)

05/2003 – 09/2003      Beginn der Promotion als Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
an der      TU Kaiserslautern  
Fachbereich Chemie  
Molekulare Ernährungsforschung

### **Hochschulstudium**

---

03/2003                    Abschluss: Diplom (sehr gut)

Thema der Diplomarbeit: Beeinflussung zellulärer Signalübertragungskaskaden durch Apfelinhaltsstoffe und verwandte Naturstoffe

- 09/2002                      Erstes Staatsexamen (sehr gut)
- 04/2002                      Universitäres Forschungspraktikum  
Untersuchungen zur Wachstumsbeeinflussung neuartiger Maillardreaktionsprodukte sowie einiger Naturstoffderivate des Lycobetains
- 10/1997 – 03/2003        Studium der Lebensmittelchemie  
Universität Kaiserslautern

### Schule

---

- 09/1987 – 06/1997        Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (2,4)  
Diltheyschule – Humanistisches Gymnasium in Wiesbaden
- 1986- 1987                    Grundschule Taunusstein-Neuhof
- 1983-1986                    Grundschule Taubenberg in Idstein am Taunus

### Auszeichnungen

---

- 09/2004                      Posterpreis für das Poster „DNA-strangbrechende Wirkung von Acrylamid und Glycidamid *in vitro*“ auf dem Deutschen Lebensmittelchemikertag 2004 in Bonn

### Veröffentlichungen

---

- 02/2005                      Nicole Puppel, Zeina Tjaden, Florian Füller and Doris Marko. DNA strand breaking capacity of acrylamide and glycidamide in mammalian cells. *Mutation Research*, 2005, 580, 71-80.
- 01/2005                      Kern, M.; Tjaden, Z.; Ngiewih, Y.; Puppel, N.; Will, F.; Dietrich, H.; Pahlke, G. and Marko, D. Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Molecular Nutrition Food Research*, 2005, 49, 317-328.
- 04/2004                      Doris Marko, Nicole Puppel, Zeina Tjaden, Sandra Jakobs and Gudrun Pahlke. The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. *Molecular Nutrition Food Research*, 2004, 48, 318-325.
- 2003 – 2006                    verschiedene Posterbeiträge an Tagungen

---

**Weiterbildungen**

---

2004 – 2007	Teilnahme an der Weiterbildung zur Fachtoxikologin der Gesellschaft für Toxikologie (DGPT)
06/2007	Grundlagen der Organtoxikologie und -pathologie Teil II (Helios Klinikum, Erfurt)
11/2006	Chemische Kanzerogenese und Mutagenese (am GSF-Forschungszentrum, Neuherberg)
09/2006	Fremdstoffmetabolismus und Toxikokinetik (TH Zürich)
02/2006	Molekulare Zelltoxikologie (GSF-Forschungszentrum, Neuherberg )
06/2005	Versuchstierkunde II (praktischer Teil) (Klinikum der FSU Jena)
04/2005	Regulatorische Toxikologie (Staatl. Gewerbeaufsichtsamt Hildesheim, Hannover)
10/2004	Versuchstierkunde I und Biostatistik (Klinikum der FSU Jena)
09/2004	Grundlagen der Ökotoxikologie (TU Dresden)
03/2004	Klinische Toxikologie (Universität des Saarlandes Homburg/Saar)

**Zusatzqualifikationen**

---

Eingeschränkte Sachkunde nach §5 Chemikalien-Verbotsverordnung (ChemVerbotsV)