

Metabolismus und genetische Toxizität von  
Furanfettsäuren, sowie deren Einfluss auf  
Zellmembranen *in vitro*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

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

**DISSERTATION**

von

Lebensmittelchemiker

**Simon Göckler**

aus Waiblingen

**Dekan:** Prof. Dr. Stefan Bräse

**Referent:** Prof. Dr. Dr. Manfred Metzler

**Korreferent:** Prof. Dr. Doris Marko

**Tag der mündlichen Prüfung:** 10. Februar 2009



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Methylsubstituierte Furanfettsäuren . . . . .	1
1.1.1. Strukturen und Vorkommen von methylsubstituierten Furanfettsäuren	1
1.1.2. Biosynthese von methylsubstituierten Furanfettsäuren . . . . .	4
1.1.3. Metaboliten von methylsubstituierten Furanfettsäuren . . . . .	6
1.1.4. Reaktionen von methylsubstituierten Furanfettsäuren . . . . .	7
1.2. Nicht methylsubstituierte Furanfettsäuren . . . . .	11
1.2.1. Bildung und Strukturen von Furanfettsäuren . . . . .	11
1.2.2. Reaktionen von Furanfettsäuren . . . . .	13
1.3. Furane . . . . .	15
1.3.1. Verbreitung von Furanderivaten . . . . .	15
1.3.2. Bildung von Furanderivaten in Lebensmitteln . . . . .	18
1.3.3. Metabolismus und toxikologische Bedeutung von Furanderivaten . .	20
<b>2. Aufgabenstellung</b>	<b>23</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>25</b>
3.1. Metabolismus und Abbau von Furanfettsäuren . . . . .	25
3.1.1. Mikrosomale Umsetzung von Furanfettsäuren . . . . .	25
3.1.1.1. 8,10-Furanfettsäure . . . . .	25
3.1.1.2. 9,11-Furanfettsäure . . . . .	45
3.1.1.3. 10,12-Furanfettsäure . . . . .	51
3.1.2. $\beta$ -Oxidation von Furanfettsäuren . . . . .	56
3.2. Toxizität von Furanfettsäuren . . . . .	59
3.2.1. Cytotoxizität von Furanfettsäuren . . . . .	60
3.2.2. Genotoxizität von Furanfettsäuren . . . . .	62
3.3. Einfluss von Fettsäuren auf Lipide von Zellen . . . . .	63
3.3.1. Einbau von Fettsäuren in Lipide von V79-Zellen . . . . .	64
3.3.2. Einbau von Furanfettsäuren in Lipide von HT-29-Zellen . . . . .	70
3.3.3. Einbau von Furanfettsäuren in Lipide von HepG2-Zellen . . . . .	73
3.3.4. Gegenüberstellung der eingesetzten Zelllinien . . . . .	76
3.3.5. Abbau von Furanfettsäuren in Zellen . . . . .	81
3.4. Einfluss von Furanfettsäuren auf Lipide in Gewebe . . . . .	86
3.4.1. Gewebeschnitte . . . . .	86
3.4.2. Einbau von Furanfettsäuren in Rattenleberschnitte . . . . .	89
3.5. Einfluss von Furanfettsäuren auf die Lipidperoxidation . . . . .	92
3.5.1. Einbau von Arachidonsäure in V79-Zellen . . . . .	92
3.5.2. Lipidperoxidation in Zellkultur . . . . .	94

## Inhaltsverzeichnis

3.5.3.	Lipidperoxidation in Gewebekultur . . . . .	95
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>97</b>
4.1.	<i>In vitro</i> -Metabolismus und $\beta$ -Oxidation . . . . .	97
4.1.1.	Oxidativer Metabolismus von Furanfettsäuren . . . . .	97
4.1.2.	Bildung von Dioxoenfettsäuren . . . . .	99
4.1.3.	$\beta$ -Oxidationsprodukte von Furanfettsäuren . . . . .	100
4.1.4.	Toxikologische Bedeutung der Produkte . . . . .	100
4.2.	Untersuchungen in Zell- und Gewebekultur . . . . .	101
4.2.1.	Allgemeine Merkmale der Zelllinien und Gewebe . . . . .	101
4.2.2.	Verfügbarkeit der Furanfettsäuren im Medium . . . . .	103
4.2.3.	Einfluss von Furanfettsäuren auf Lipide von Zellen und Gewebe . . .	104
4.2.4.	Zusammenhang zwischen Abbau und Mengen der Furanfettsäuren in Lipiden . . . . .	107
4.2.5.	Toxikologische Bedeutung von Furanfettsäuren . . . . .	109
4.2.5.1.	Einfluss der Furanfettsäuren auf Membranen . . . . .	109
4.2.5.2.	Genotoxische Wirkung von Furanfettsäuren . . . . .	110
4.2.5.3.	Einfluss von Furanfettsäuren auf die Lipidperoxidation . . .	111
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>113</b>
<b>6.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>117</b>
6.1.	Geräte, Chemikalien und Lösungen . . . . .	117
6.1.1.	Geräte . . . . .	117
6.1.2.	Verbrauchsmaterialien . . . . .	119
6.1.3.	Chemikalien . . . . .	120
6.1.4.	Biologisches Material . . . . .	122
6.1.5.	Pufferlösungen, Kulturmedien und Färbereagenzien . . . . .	123
6.1.5.1.	Puffer . . . . .	123
6.1.5.2.	Kulturmedien . . . . .	125
6.1.5.3.	Färbereagenzien . . . . .	126
6.2.	Methoden . . . . .	127
6.2.1.	Analytik . . . . .	127
6.2.1.1.	HPLC-DAD . . . . .	127
6.2.1.2.	GC-MS . . . . .	128
6.2.1.3.	GC-FID . . . . .	130
6.2.1.4.	Kalibrierungen . . . . .	131
6.2.2.	Untersuchungen im zellfreien System . . . . .	136
6.2.2.1.	Oxidative Umsetzung mit Rattenlebermikrosomen . . . . .	136
6.2.2.2.	$\beta$ -Oxidation mit Rattenlebermitochondrien . . . . .	137
6.2.3.	Darstellung von Vergleichssubstanzen . . . . .	138
6.2.3.1.	Chemo-enzymatische Epoxidierung von Furanfettsäuren . .	138
6.2.3.2.	Chemo-enzymatische Dioxoenbildung aus Furanfettsäuren .	139
6.2.4.	Genotoxizitäts- und Cytotoxizitätsassay . . . . .	140
6.2.4.1.	MTT-Assay . . . . .	140
6.2.4.2.	Mikrokerntest . . . . .	142
6.2.5.	Bestimmung der Fettsäuremuster . . . . .	143
6.2.5.1.	Festphasenextraktion . . . . .	143

## Inhaltsverzeichnis

6.2.5.2.	Bestimmung der Fettsäuren von FKS . . . . .	146
6.2.5.3.	Bestimmung der Fettsäuremuster von Säugerzellen . . . . .	146
6.2.6.	Einfluss von Fettsäuren auf Zellen . . . . .	147
6.2.6.1.	Einbau von Fettsäuren in Lipide von V79-Zellen . . . . .	147
6.2.6.2.	Abbau von Fettsäuren in Lipiden von V79-Zellen . . . . .	148
6.2.6.3.	$\beta$ -Oxidation von Furanfettsäuren in V79-Zellen . . . . .	149
6.2.6.4.	Einbau von Furanfettsäuren in Lipide von HT-29-Zellen . . . . .	149
6.2.6.5.	Einbau von Furanfettsäuren in Lipide von HepG2-Zellen . . . . .	150
6.2.6.6.	Substanzkontrollen in Zellkultur . . . . .	150
6.2.7.	Untersuchungen in Gewebekultur . . . . .	150
6.2.7.1.	Präparation von Präzisionsgewebeschnitten . . . . .	150
6.2.7.2.	Bestimmung der Fettsäuremuster von Gewebe . . . . .	151
6.2.7.3.	Inkubation von Präzisionsgewebeschnitten . . . . .	152
6.2.7.4.	Einbau von Furanfettsäure in Präzisionsgewebeschnitten . . . . .	152
6.2.7.5.	Substanzkontrollen in Gewebekultur . . . . .	153
6.2.8.	Untersuchung der Lipidperoxidation . . . . .	154
6.2.8.1.	Lipidperoxidation in Zellen . . . . .	154
6.2.8.2.	Lipidperoxidation in Präzisionsgewebeschnitten . . . . .	156
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>157</b>
<b>A. Anhang</b>		<b>171</b>
A.1.	Analytische Daten zu den Furanfettsäuren . . . . .	171
A.1.1.	GC-MS-Fragmentierung der Furanfettsäuren . . . . .	171
A.1.2.	GC-MS-Fragmentierung der Metaboliten von Furanfettsäuren . . . . .	172
A.1.3.	GC-MS-Fragmentierung der Dioxoenfettsäuren . . . . .	175
A.1.4.	GC-MS-Fragmentierung der $\beta$ -Oxidationsprodukte . . . . .	175
A.1.5.	GC-MS-Chromatogramme der Umsetzung von 9,11- und 10,12-FFA . . . . .	176
A.1.6.	Re-Analysen der Epoxide der Furanfettsäuren . . . . .	181
A.2.	Cytotoxizitäts- und Genotoxizitätsassay . . . . .	182
A.3.	Abbau von Furanfettsäuren und Linolsäure in V79-Zellen . . . . .	183
A.4.	Lipidperoxidation . . . . .	184
<b>B. Veröffentlichungen</b>		<b>185</b>
<b>C. Danksagung</b>		<b>187</b>



# Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
Ac-CoA	Acetyl-Coenzym A
amu	Atomare Masseneinheit
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<b>BSFTA</b>	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
<b>C 14:0</b>	Myristinsäure
<b>C 16:0</b>	Palmitinsäure
<b>C 16:1</b>	Palmitoleinsäure
<b>C 16:2</b>	Hexadecadiensäure
<b>C 18:0</b>	Stearinsäure
<b>C 18:1</b>	Ölsäure
<b>C 18:2</b>	Linolsäure
<b>C 18:3</b>	Linolensäure
<b>C 18:1tr11</b>	Vaccensäure
<b>C 20:4</b>	Arachidonsäure
<b>CE</b>	Cholesterylester
<b>CHO</b>	Chinesische Hamster Ovarien
<b>ChOL</b>	Cholesterol
<b>CoA</b>	Coenzym A
<b>CYP</b>	Cytochrom P450
<b>DAD</b>	Dioden-Array-Detektor
<b>DAPI</b>	4',6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinsäure
<b>DOC</b>	Dynamic Organ Culture
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EI</b>	Elektronenstoß
<b>eV</b>	Elektronenvolt
<b>FA</b>	Fettsäure
<b>FAD</b>	Flavin-Adenin-Dinucleotid
<b>FADH<sub>2</sub></b>	reduziertes Flavin-Adenin-Dinucleotid
<b>FFA</b>	Furanfettsäure
<b>FID</b>	Flammenionisationsdetektor
<b>FKS</b>	fetales Kälberserum
<b>FSME</b>	Fettsäuremethylester
<b>GC</b>	Gaschromatographie
<b>GC-MS</b>	gekoppelte Gaschromatographie-Massenspektrometrie

## Abkürzungsverzeichnis

<b>HEPES</b>	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HepG2	humane Lebercarcinom-Zellen
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HT-29	humane Colonicarcinom-Zellen
<b>IE</b>	Ionisierungsenergie
<b>LO·</b>	Alkoxyradikal
<b>LOO·</b>	Peroxyradikal
LOOH	Lipidhydroperoxid
LOX	Lipoxygenase
LPO	Lipidperoxidation
<b>m-CPA</b>	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
MN	Mikrokern
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
<b>NQO</b>	4-Nitrochinolin-N-oxid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff
<sup>3</sup> O <sub>2</sub>	Triplett-Sauerstoff
OT	Objektträger
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PL	Phospholipid
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäure
<b>R<sup>2</sup></b>	Korrelationskoeffizient
RLM	Rattenlebermikrosomen
RT	Retentionszeit
<b>SD</b>	Sprague-Dawley
S.D.	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPE	Festphasenextraktion
<b>Tab.</b>	Tabelle
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TBME	<i>tert</i> -Butylmethylether
TMP	1,1,3,3,-Tetramethoxypropan
tBuOOH	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TG	Triglycerid
TIC	Totalionenstrom
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
<b>V79</b>	Lungenfibroblasten des männlichen chinesischen Hamsters
<b>Wi</b>	Wistar

# 1. Einleitung

## 1.1. Methylsubstituierte Furanfettsäuren

### 1.1.1. Strukturen und Vorkommen von methylsubstituierten Furanfettsäuren

Furanfettsäuren (FFA) repräsentieren eine große Gruppe von Fettsäuren (FA), die durch einen Furanring charakterisiert sind, der an der einen  $\alpha$ -Position einen unverzweigten Säurerest und an der anderen  $\alpha$ -Position einen Alkylrest aufweist. Die natürlich vorkommenden FFAs sind entweder an einer oder an beiden  $\beta$ -Positionen des Furanrings methylsubstituiert. Der Alkylrest besteht aus 3 oder 5 und der Säurerest aus 9, 11 oder 13 Kohlenstoffatomen (Tab. 1.1). Die am weitesten verbreitete natürlich vorkommende FFA weist einen Pentylrest und einen Säurerest mit 11 Kohlenstoffatomen auf (Glass et al., 1975; Spittler, 2005a).

Tabelle 1.1.: Grundstruktur und die am häufigsten vorkommenden methylsubstituierten Furanfettsäuren

m	n	R
2	8	CH <sub>3</sub>
4	8	H
4	8	CH <sub>3</sub>
2	10	CH <sub>3</sub>
4	10	H
4	10	CH <sub>3</sub>
4	12	H
4	12	CH <sub>3</sub>

Die Existenz von methylsubstituierten FFAs wurde 1974 entdeckt, als diese in Europäischem Hecht (*Esox lucius*) nachgewiesen werden konnten (Glass et al., 1974).

## 1. Einleitung

Nachdem Kluytmans und Zandee 1973 die Lipide der selben Fischart untersucht hatten und anhand der Retentionszeiten in der GC-Analyse fälschlicherweise einige Peaks mehrfach ungesättigten FFAs (PUFA) zugeordnet hatten, war es Glass et al. möglich, mittels GC-MS acht FFAs zu detektieren und deren Strukturen aufzuklären. Des Weiteren konnten Glass et al. 1977 zeigen, dass es während der Laichzeit zu einem deutlichen Anstieg der FFA-Gehalte in Leber und Testes unterschiedlicher Fischarten kommt. Dies kann aufgrund der Beobachtung von Gunstone et al. (1976), dass Dorsch (*Gadus morhua*) während einer Hungerperiode große Mengen an FFAs in der Leber anreichert, mit der Hungerperiode während der Laichzeit in Verbindung gebracht werden.

In den folgenden Jahren wurden eine Vielzahl an tierischen und pflanzlichen Organismen auf deren Gehalt an methylsubstituierten FFAs hin untersucht. Sowohl in Süßwasserfischen (Glass et al., 1977; Gunstone et al., 1978) als auch in Salzwasserfischen (Gunstone et al., 1976, 1978; Ishii et al., 1988b; Ota und Takagi, 1992; Wahl et al., 1994) wurden große Mengen an FFAs in unterschiedlichen Gewebetypen und in Blut nachgewiesen. Demzufolge waren FFAs als Bestandteile von Lebertran ebenfalls nachweisbar (Scrimgeour, 1977; Wahl et al., 1994). Außerdem konnten FFAs in wirbellosen Tieren (Dembitsky und Rexanka, 1996), in Schalentieren (Okajima et al., 1984; Ishii et al., 1988a, 1989a), in Amphibien und in Reptilien (Ishii et al., 1988a) detektiert werden. In marinen Bakterien (Shirasaka et al., 1995, 1997; Carballeira et al., 2000) sowie Algen (Kazlauskas et al., 1982; Batna et al., 1993) waren ebenfalls FFAs nachweisbar. Aber auch in Gewebe von Säugetieren (Schödel und Spiteller, 1987), in tierischen Fetten wie z.B. Butter (Guth und Grosch, 1992) und menschlichem Blut (Puchta et al., 1988; Puchta und Spiteller, 1988; Wahl, 1998) konnten methylsubstituierte FFAs detektiert werden. Abschließend war es auch möglich methylsubstituierte FFAs in einer großen Zahl von Pflanzen wie z.B. Löwenzahn, Birken, Gräsern, Zuckerrohr (Hasma und Subramaniam, 1978; Hannemann et al., 1989; Scheinkönig und Spiteller, 1993a), in einer Vielzahl von Pflanzenölen wie z.B. Olivenöl (Boselli et al., 2000) und Sojaöl (Guth und Grosch, 1991), sowie in Hefen und in Pilzen (Hannemann et al., 1989) nachzuweisen. Dies lässt auf ein ubiquitäres Vorkommen von methylsubstituierten FFAs schließen. Ungewöhnliche methylsubstituierte FFAs, die sich von den bisher beschriebenen aufgrund ihrer mehrfach ungesättigten Alkylreste unterscheiden, konnten aus marinen Schwämmen isoliert werden (Ciminiello et al., 1991). Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über die Verteilung der FFAs in den einzelnen Lipidfraktionen unterschiedlicher Organismen und Gewebetypen. Dabei wurden in Leber und Testes von Fischen die mit Abstand höchsten Gehalte an FFAs nachgewiesen. Hier waren, je nach Jahreszeit und Haltungsbedingungen der Fische, Anteile der Gesamt-FA von bis zu 40% in Leber von *Gadus morhua* (Gunstone et al., 1978) und 50% in den Testes von *Esox lucius* nachweisbar (Glass et al., 1977). Bei Betrachtung der quantitativen Gehalte in verschiedenen Organismen, Gewebetypen und Lebensmitteln ist zu sehen, dass Fische in ihren Lipiden um ein vielfaches höhere Gehalte an methylsubstituierten FFAs als Säuger und Pflanzen aufweisen (Tab. 1.3).

## 1. Einleitung

Tabelle 1.2.: Verteilung an methylysubstituierten Furanfettsäuren in den einzelnen Lipidfraktionen der unterschiedlichen Gewebetypen und Blut von Tieren sowie in Pflanzen (Spiteller, 2005a)

Organismus	Gewebe / Blut	PL	CE	TG
Fisch	Leber	-	++++	++
Fisch	Testes	++	++	++++
Fisch	Rogen	++	+	-
Fisch	Muskel	+	++++	-
Fisch	Blut	-	++++	+
Flusskrebs	Hepatopankreas	+	+++	+
Flusskrebs	Muskel	+++	+	-
Schwämme		-	++	-
Rind	Leber	-	+	+
Rind	Blut	+++	+	+
Mensch	Blut	++	+	+
Pflanzen	Zuckerrohr	+++	+	+

Tabelle 1.3.: Gehalte an methylysubstituierten Furanfettsäuren in unterschiedlichen Organismen und verarbeiteten Lebensmitteln

Organismus / Lebensmittel	Untersuchte Probe	Gehalt [ $\mu\text{g/g}$ ]
Europäischer Hecht	Leber	1700
Karpfen	Leber	3200
Großmäuliger Büffelfisch	Leber	19900
Rind	Leber	4,5
Rind	Blut	0,019
Mensch	Blut	0,043
Gras	Halme	242
Birke	Blätter	194
Pilze		167
Algen		157
Olivenöl		3,5
Butter		476
Lebertran		10900

In lebenden Zellen liegen methylysubstituierte FFAs in veresterter Form vor. Die freie Form ist im Gegensatz zu allen anderen FAs nicht nachweisbar (Spiteller, 2005a). In Leber, Muskelfleisch und Blut von Fischen stellen Cholesterylester (CE) der FFAs die Hauptspeicherform dar. Im Gegensatz dazu liegen FFAs in den Testes von Fischen überwiegend als Triglyceride (TG) vor. FFA-haltige Phospholipide (PL) sind in Testes, Rogen und Muskelfleisch von Fischen nachweisbar (Gunstone et al., 1976, 1978; Glass et al., 1975,

## 1. Einleitung

1977; Ota und Takagi, 1992; Tab. 1.2), wobei die FFAs überwiegend in der Fraktion des Phosphatidylcholins (PC) detektierbar sind (Ishii et al., 1988b). Die höchsten Anteile an FFAs in PLs konnten in Muskelfleisch von Flusskrebsen nachgewiesen werden. Auch hier liegen die FFAs hauptsächlich in PC gebunden vor (Ishii et al., 1989a).

Die Untersuchungen von Lebergewebe von Säugetieren ergaben, dass methylsubstituierte FFAs, wie in Fischleber, in Form von CEs und TGs vorliegen (Schödel und Spiteller, 1987). In Blutplasma von Säugetieren und von Menschen sind FFAs hingegen überwiegend in den PLs nachweisbar (Puchta et al., 1988; Tab. 1.2), wobei hier ebenfalls das PC und des Weiteren das Phosphatidylethanolamin (PE) die höchsten Gehalte an FFAs aufweisen (Puchta und Spiteller, 1988). In pflanzlichem Gewebe liegen FFAs, wie bei Säugern, überwiegend in Form von PC und PE vor (Scheinkönig und Spiteller, 1993a).

Bei Untersuchungen der Strukturen der PL-Klassen konnte gezeigt werden, dass in Fisch hauptsächlich Position *sn*-1 der PLs mit FFAs substituiert wird (Ishii et al., 1988b), während bei Säugern und Pflanzen Position *sn*-2 bevorzugt substituiert wird (Puchta und Spiteller, 1988; Scheinkönig und Spiteller, 1993a).

### 1.1.2. Biosynthese von methylsubstituierten Furanfettsäuren

Glass et al. (1975) vermuteten zunächst, dass FFAs in Fischen biosynthetisiert würden. Allerdings konnte dies nach Fütterungsversuchen von Fischen mit  $^{14}\text{C}$ -gelabeltem Acetat ausgeschlossen werden. Mit diesem Experiment waren Sand et al. (1984) in der Lage zu zeigen, dass in Fischen nur der Säurerest der FFAs durch das Einfügen von Acetat-Einheiten verlängert wird. Weder im Alkylrest noch im Furanring ist im Anschluss an die Fütterungsversuche  $^{14}\text{C}$  nachweisbar. Dies ließ den Schluss zu, dass eine *de novo*-Synthese von FFAs in Fischen nicht stattfindet.

Um der Annahme nachzugehen, dass Linolsäure (C 18:2) die Ausgangssubstanz der Biosynthese für FFAs ist, wurden mit Ratten Versuche durchgeführt, bei denen  $\text{C}_{19}$ -Homologe von C 18:2 verfüttert wurden. Es konnten jedoch keine Homologe der FFAs in der untersuchten Rattenleber nachgewiesen werden. Demzufolge müssen die Ratten FFAs über pflanzliche Bestandteile in ihrer Nahrung aufnehmen (Gorst-Allman et al., 1988). Dies konnte durch spätere Untersuchungen von pflanzlichem Gewebe bestätigt werden, da eine große Anzahl an Pflanzen, wie in 1.1.1 beschrieben, methylsubstituierte FFAs enthält (Hannemann et al., 1989).

Die Beobachtung, dass FFAs in Pflanzen nachweisbar sind, führte zu neuen Untersuchungen der Biosynthese mit radioaktiv markierten Verbindungen, die in Zellen von Zuckerrohr (*Saccharum spec.*) in Zellkultur durchgeführt wurden. So konnte gezeigt werden, dass

## 1. Einleitung

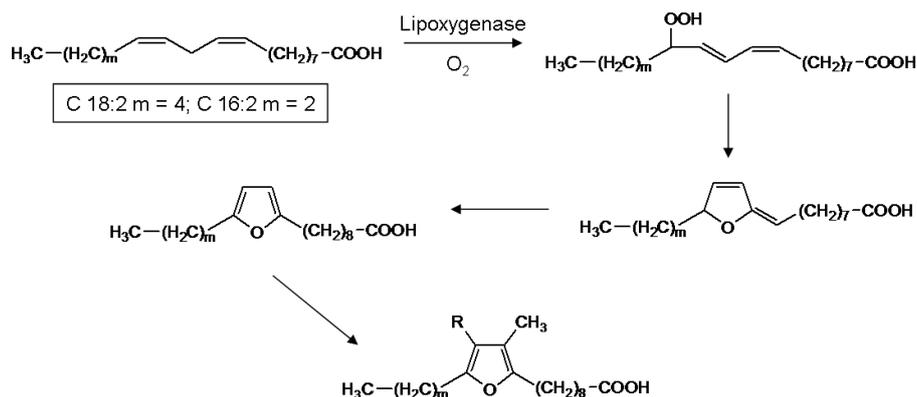


Abbildung 1.1.: Biosynthese von methylsubstituierten Furanfettsäuren in Pflanzenzellen

die Kohlenstoffkette der FFAs analog zu geradzahligen unverzweigten FAs aus Acetat-Einheiten aufgebaut wird (Scheinkönig und Spiteller, 1993b). Als Quelle für die Methylgruppen an den  $\beta$ -Positionen des Furanrings konnte Methionin ausgemacht werden (Scheinkönig und Spiteller, 1991; Scheinkönig et al., 1995), und das Sauerstoffatom im Furanring wird aus Luftsauerstoff gewonnen (Batna und Spiteller, 1991). Die ursprüngliche Annahme von Gunstone und Wijesundera (1979), dass FFAs aus einem Lipidhydroperoxid (LOOH) von C 18:2 entstehen, konnte von Batna et al. (1993) für FFAs mit einem Pentylrest in Zellkultur mit Algenzellen belegt werden. Nach Bildung eines LOOHs an Position 12 der Kohlenstoffkette von C 18:2 kommt es zu einer Cyclisierung. Im Gegensatz dazu werden FFAs mit einem Propylrest aus 9,12-Hexadecadiensäure (C 16:2) gebildet (Batna et al., 1993; Abb. 1.1). Die längerkettigen Homologe der FFAs werden durch den Einbau von Acetat-Einheiten in die Säurekette gebildet (Spiteller, 2005a). Alle in tierischen Organismen nachgewiesenen FFAs werden demnach ursprünglich in Pflanzen biosynthetisiert und über die Nahrungskette aufgenommen.

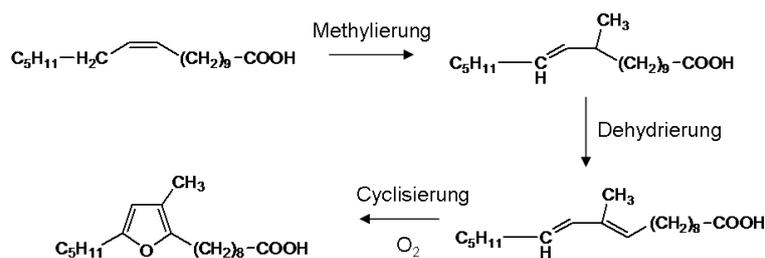


Abbildung 1.2.: Vorgeschlagener Weg der Biosynthese von methylsubstituierten Furanfettsäuren in marinen Bakterien

Ein weiterer vorgeschlagener Weg der Biosynthese von FFAs, der jedoch nur anhand von isolierten Intermediaten beschrieben wurde, ist, dass marine Bakterien, die in Fisch vorkommen, FFAs *de novo* synthetisieren können (Abb. 1.2). Dazu methylieren sie zunächst *cis*-Vaccensäure (C 18:1cis11) und führen eine zweite Doppelbindung ein. Es wird angenom-

## 1. Einleitung

men, dass die entstandene zweifach ungesättigte FA anschließend mit Sauerstoff reagiert und es danach zu einem Ringschluss kommt (Shirasaka et al., 1997).

### 1.1.3. Metaboliten von methylsubstituierten Furanfettsäuren

Bei Untersuchungen von menschlichem Urin durch Spiteller und Spiteller (1979) waren in der Fraktion der FAs bis dahin unbekannte Dicarbonsäuren mit einem tetra-substituierten Furanring nachweisbar. Aufgrund ihrer Herkunft wurden diese als Urofuransäuren bezeichnet. Dabei bilden 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropansäure und 3-Carboxy-4-methyl-5-pentyl-2-furanpropansäure den größten Anteil dieser Verbindungen (Spiteller et al., 1980). Pfordt et al. konnten Urofuransäuren 1981 auch in menschlichem Blut nachweisen. In weitergehenden Untersuchungen war es Bauer und Spiteller (1985a) möglich Urofuransäuren, die an Position 4 des Furanrings nicht methyliert sind, in Spuren in menschlichem Urin nachzuweisen. Durch Einnahme einer definierten Menge an methylsubstituierten FFAs war es Schödel et al. (1986) möglich durch die erhöhte Ausscheidung von Urofuransäuren im Urin nachzuweisen, dass diese tatsächlich Metaboliten von FFAs darstellen. In einer weiteren Humanstudie, in der Lebertran supplementiert wurde, der reich an FFAs ist (s. 1.1.1; Tab. 1.3), konnte gezeigt werden, dass es im Urin über vier Wochen zu einer drei- bis sechsfachen Steigerung des Gehaltes der Urofuransäuren kommt (Wahl et al., 1992).

Allerdings verläuft der Metabolismus von methylsubstituierten FFAs in verschiedenen Säugern auf unterschiedlichen Wegen. Der Abbau des Säurerests durch  $\beta$ -Oxidation bis auf drei Kohlenstoffatome ist in allen Säugerorganismen zunächst identisch. Im menschlichen Organismus wird anschließend durch Oxidation des Methylrests an Position 3 des Furanrings eine Carboxylgruppe eingeführt. Am Alkylrest wird nur in geringem Ausmaß durch  $\omega$ - und  $\alpha$ -Oxidation eine weitere Carboxylgruppe eingeführt. Das ist dadurch zu belegen, dass 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropansäure den Hauptmetaboliten in menschlichem Urin darstellt (Schödel et al., 1986, Abb. 1.3). Im Gegensatz dazu findet in Ratten

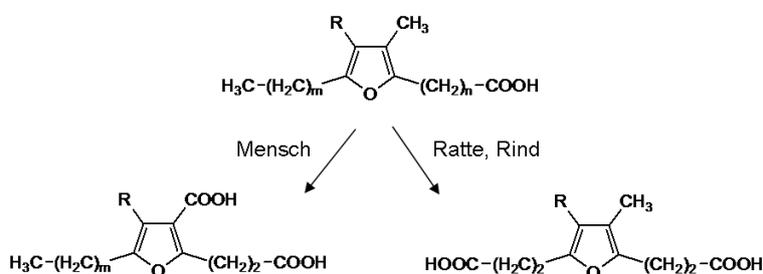


Abbildung 1.3.: Hauptmetaboliten von methylsubstituierten Furanfettsäuren in Mensch, Ratte und Rind

## 1. Einleitung

und Rindern überwiegend eine  $\omega$ -Oxidation des Alkylrests mit anschließender  $\alpha$ -Oxidation statt. Dies führt zur Bildung von Furanicarbonsäuren als Hauptmetaboliten. Urofuran-säuren sind im Urin von Ratten und Rindern nur in Spuren nachweisbar (Sand et al., 1983; Bauer und Spiteller, 1985b; Abb. 1.3).

Menschen, die an chronischer Niereninsuffizienz leiden, reichern Urofuran-säuren im Blut-plasma an. Dabei ist zu beobachten, dass in erster Linie der Gehalt an 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropansäure, die bei gesunden Menschen im Vergleich zu 3-Carboxy-4-methyl-5-pentyl-2-furanpropansäure in viel geringeren Mengen im Plasma vorliegt, um das bis zu siebenfache zunimmt (Liebich et al., 1984). Aufgrund dessen, dass Mabuchi und Nakahashi (1988) zeigen konnten, dass 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropansäure die hepatische Glutathion-S-Transferase inhibiert, stellten sie einen Zusammenhang zwischen der Anreicherung und der toxischen Wirkung von urämischem Plasma her. Des Weiteren stellt die hohe Affinität von 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropansäure zu Plasmaproteinen bei Menschen mit chronischer Niereninsuffizienz ein Problem dar. Zum einen ist eine Entfernung mit konventioneller Hämodialyse äußerst schwierig (Henderson und Lindup, 1990; Costigan und Lindup, 1996), zum anderen kommt es zu einer Behinde-rung der Bindung von Pharmazeutika an Plasmaproteine wie Albumin (Niwa et al., 1988; Liebich et al., 1990). Weitere negative Auswirkungen von 3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropansäure, die in urämischem Plasma nachgewiesen werden konnten, sind die Hemmung der mitochondrialen Zellatmung (Niwa et al., 1993) und die Absenkung des Bindevermögens von Bilirubin (Tsutsumi et al., 2000).

### 1.1.4. Reaktionen von methylsubstituierten Furanfettsäuren

Werden methylsubstituierte FFAs oxidiert, so erfolgt wie bei  $\alpha,\alpha$ -aryl-disubstituierten Fu-ranen eine Ringöffnung (Boyer et al., 1975) und es werden *cis*-Dioxoenfettsäuren gebildet (Schödel und Spiteller, 1985; Ishii et al., 1988a; Jandke et al., 1988; Abb. 1.4). Die ur-sprüngliche Annahme von Boyer et al. (1975), dass diese Reaktion ausschließlich durch Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) hervorgerufen werden könne, wurde 1977 von Takayama et al. widerlegt. Sie konnten zeigen, dass LOOHs, die durch die Fenton-Reaktion Alkoxyradikale ( $\text{LO}\cdot$ ) freisetzen, ebenfalls in der Lage sind  $\alpha,\alpha$ -aryl-disubstituierte Furane zu Dioxoenen zu oxidieren.



Abbildung 1.4.: Bildung von *cis*-Dioxoenfettsäuren aus methylsubstituierten Furanfettsäu-ren durch Oxidation

## 1. Einleitung

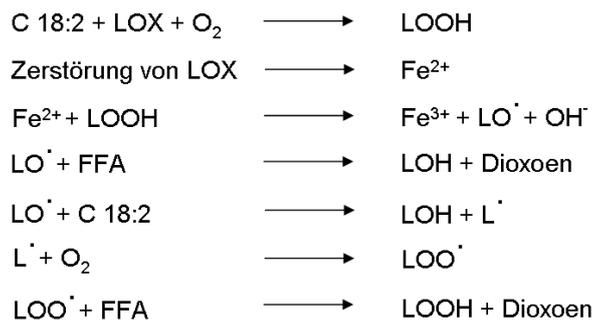


Abbildung 1.5.: Sequenz, die zur Bildung von Dioxoenfettsäuren aus methylysubstituierten Furanfettsäuren führt

Neu in diesem Zusammenhang war die Beobachtung von Boyer et al. (1979), dass auch Lipoxygenase (LOX) mit C 18:2 als Cosubstrat in der Lage war diese Reaktion zu induzieren. Der erste Schritt ist dabei die enzymatische LOOH-Bildung aus C 18:2. Die meisten dieser LOOHs werden schnell durch Enzyme, wie z.B. Glutathionperoxidase, zu ihren entsprechenden Hydroxydiensäuren abgebaut (Spiteller, 2005b). Allerdings kommt es durch die Gegenwart von hohen Mengen an C 18:2 zu einer Inaktivierung und Zerstörung von LOX, was wiederum eine Freisetzung von bivalenten Eisenionen (Fe<sup>2+</sup>) zur Folge hat (Fuchs und Spiteller, 2000). Der daraus resultierende Ablauf der Fenton-Reaktion bringt LO<sup>•</sup> hervor, was eine radikalische Kettenreaktion auslöst. Die dabei entstehenden LO<sup>•</sup> und Peroxyradikale (LOO<sup>•</sup>) sind in der Lage FFAs zu Dioxoenfettsäuren zu oxidieren (Batna und Spiteller, 1994b, 1994a; Abb. 1.5).

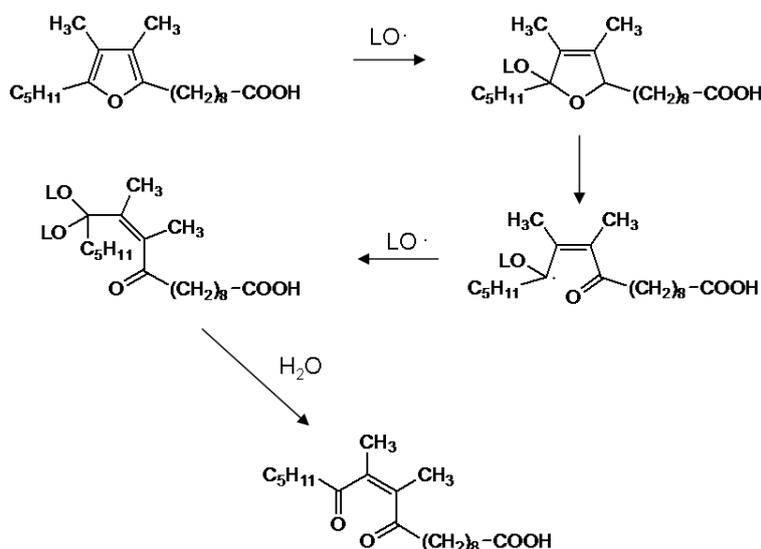


Abbildung 1.6.: Bildung von *cis*-Dioxoenfettsäuren aus methylysubstituierten Furanfettsäuren unter Bindung zweier Alkoxyradikale

## 1. Einleitung

Der Mechanismus verläuft über die Addition des  $\text{LO}\cdot$  an Position 2 oder 5 des Furanrings. Infolge dessen kommt es zu einer Ringöffnung. Das entstandene Radikal ist mesomeriestabilisiert. Daher ist es weniger reaktiv als  $\text{LO}\cdot$  oder  $\text{LOO}\cdot$ , was die Lebensdauer dieses Radikals verlängert und es somit in der Lage ist ein zweites  $\text{LO}\cdot$  unter Bildung eines Ketals zu binden. Durch anschließende Hydrolyse wird die *cis*-Dioxoenfettsäure gebildet (Spiteller, 2005a, 2005b; Abb. 1.6).

Abhängig vom pH-Wert werden aus den *cis*-Dioxoenfettsäuren im neutralen und leicht sauren Milieu unter Recyclisierung ungesättigte FFAs gebildet (Schödel und Spiteller, 1987; Abb. 1.7, unten). In alkalischem Milieu entstehen unter Aldonringschluss Cyclopentenolone (Schödel und Spiteller, 1985; Abb. 1.7, oben). Daher sind die hier beschriebenen Artefakte in wässrig aufgearbeiteten Proben nachweisbar.

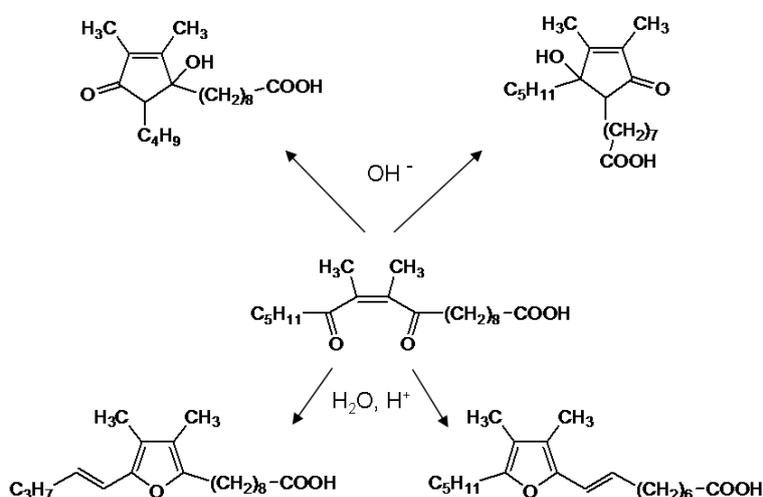


Abbildung 1.7.: Recyclisierungs-Reaktionen der *cis*-Dioxoenfettsäuren von methylsubstituierten Furanfettsäuren bei verschiedenen pH-Werten im wässrigen Milieu

Werden *cis*-Dioxoenfettsäuren im alkalischen mit thiolischen Verbindungen, wie z.B. Mercaptoethanol, Cystein oder Glutathion umgesetzt, so wird das Thiol an die Enolform des Dioxoens addiert (Jandke et al., 1988; Abb. 1.8). Nach einer Eliminierung von Wasser kommt es nach einer Recyclisierung des Furanrings zur Bildung von FFA-Thioethern. Da sich dieser Reaktionsablauf ein zweites Mal wiederholen kann, werden auch Dithioether gebildet.

Jede Veränderung in der Membranstruktur von Zellen, z.B. durch homogenisieren des Gewebes, bringt eine Änderung der Aktivität verschiedener Membrankanäle mit sich, was zu einem erhöhten Einfluss an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen führt (Spiteller, 2005a). Dies hat unter anderem die Aktivierung der Phospholipase  $\text{A}_2$  zur Folge (Bingham und Austen, 1999; Andreani et al., 2000). Die dadurch freigesetzten PUFAs stellen ein Substrat für LOX dar, was zum

## 1. Einleitung

enzymatischen, ersten Schritt der bereits beschriebenen Lipidperoxidation (LPO) führt. Die anschließende Akkumulation von größeren Mengen an PUFAs und die anschließende Zerstörung der LOX lassen die Reaktion in einen unkontrollierten nicht-enzymatischen Zustand übergehen, was die Bildung von  $\text{LO}\cdot$  und  $\text{LOO}\cdot$  zur Folge hat. Die Beobachtung, dass methylsubstituierte FFAs in homogenisiertem Gewebe nicht nachweisbar sind, während der Gehalt an PUFAs nahezu konstant bleibt (Schödel und Spiteller, 1985) lässt den Schluss zu, dass methylsubstituierte FFAs ein bevorzugtes Substrat für  $\text{LO}\cdot$  und  $\text{LOO}\cdot$  darstellen. Dieser Zusammenhang kann damit bestätigt werden, dass in homogenisiertem Gewebe, in dem zuvor die Enzyme durch Hitze oder organische Lösungsmittel inaktiviert wurden, keine Abnahme der FFAs festzustellen ist (Schödel und Spiteller, 1985; Ishii et al., 1988a; Spiteller, 2005a). Über die Nahrung aufgenommene methylsubstituierte FFAs werden hauptsächlich in PLs in Blut und Gewebe des Menschen aufgenommen, wo sie teilweise PUFAs ersetzen (Puchta et al., 1988; Puchta und Spiteller, 1988), und tragen so zum Schutz vor LPO bei.

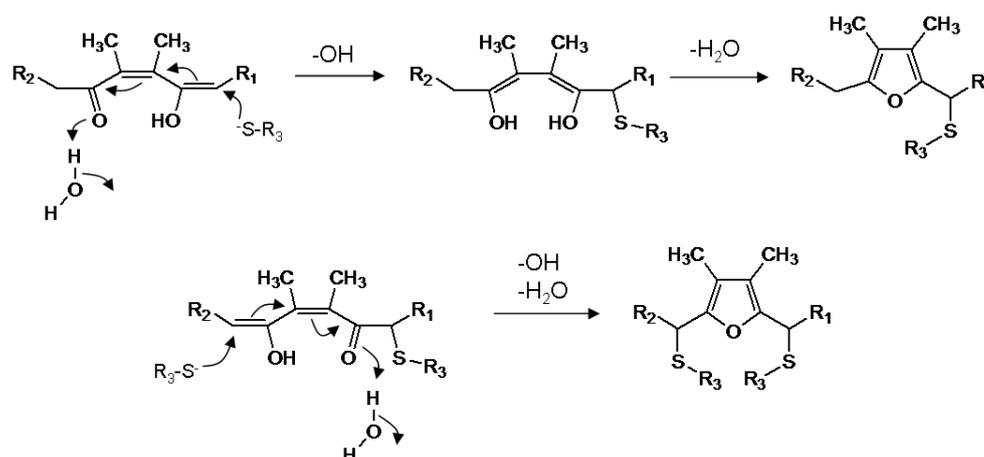


Abbildung 1.8.: Addition von Thiolen an *cis*-Dioxyenfettsäuren von methylsubstituierten Furanfettsäuren

Diese Eigenschaft von methylsubstituierten FFAs antioxidativ zu wirken scheint ein Grund für das Vorkommen in Pflanzen zu sein. Pflanzen besitzen so, vor allem in ihren Blättern, wirksame Radikalfänger, die z.B. vor den schädlichen Wirkungen von UV-Strahlung schützen. Ishii et al. konnten 1989 zeigen, dass PC Liposomen aus Sojabohnen antioxidative Eigenschaften aufweisen. Methylsubstituierte FFAs weisen außerdem eine größere antioxidative Wirkung gegen Hydroxyradikale auf, wie andere natürlich in Pflanzen vorkommende Antioxidantien, wie z.B. Ascorbinsäure und  $\alpha$ -Tocopherol (Okada et al., 1996).

## 1.2. Nicht methylysubstituierte Furanfettsäuren

### 1.2.1. Bildung und Strukturen von Furanfettsäuren

Im Gegensatz zu den in 1.1.1 beschriebenen, in der Natur vorkommenden, methylysubstituierten FFAs werden nicht-methylysubstituierte FFAs in der Natur nicht biosynthetisiert. Gunstone und Wijesundera (1979) war es erstmals möglich nachzuweisen, dass diese FFAs durch Photooxidation aus konjugierten Linolsäuren (CLA) entstehen (Abb. 1.9). Durch eine Diels-Alder-Addition von  $^1\text{O}_2$  an das 1,3-Diensystem der CLA entsteht dabei zunächst ein Endoperoxid. Aus diesem wird unter Temperatur- oder Lichteinfluss der Furanring gebildet. Bascetta et al. (1984) konnten in ergänzender Weise den Mechanismus aufklären und so nachweisen, dass außerdem  $\text{Fe}^{2+}$  mit an der Bildung des Furanrings aus dem Endoperoxid beteiligt ist (Abb. 1.10). Weitergehende Untersuchungen von Yurawecz et al. (1997) und Eulitz et al. (1999) ergaben, dass die *t,t*-Isomere der CLAs am sensitivsten auf die Oxidation mit  $^1\text{O}_2$  reagieren und somit die größten Mengen an FFAs bilden.

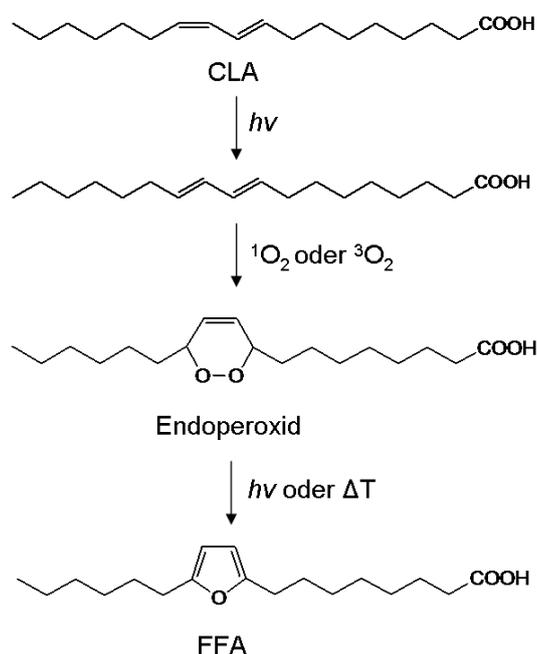


Abbildung 1.9.: Bildung von nicht methylysubstituierten Furanfettsäuren durch Photo- oder Autoxidation aus konjugierten Linolsäuren über ein intermediäres Endoperoxid

## 1. Einleitung

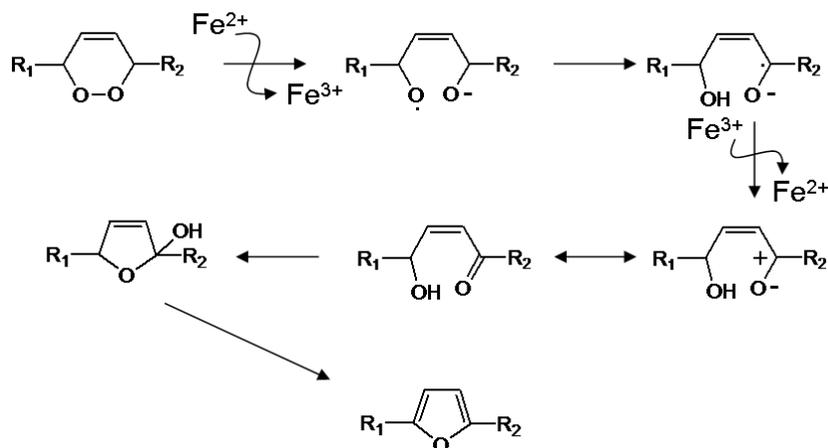


Abbildung 1.10.: Mechanismus zur Bildung des Furanrings aus dem intermediären Endoperoxid unter dem Einfluss von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen

Außerdem konnten sie zeigen, dass FFAs auch durch Autoxidation (Reaktion mit Triplett-Sauerstoff ( $^3\text{O}_2$ )) aus CLAs entstehen (Abb. 1.9). Es wird angenommen, dass ebenfalls ein Endoperoxid das Intermediat darstellt. Die Halbwertszeit der CLAs ist bei der Autoxidation temperaturabhängig. So ist bei Raumtemperatur nach 14 Tagen die Hälfte der CLAs oxidiert, während bei  $75^\circ\text{C}$  dieser Punkt bereits nach 7 h erreicht ist. Dabei sind freie CLAs stärker durch die Oxidation betroffen als in TGs oder PLs gebundene CLAs (Zhang und Chen, 1997; Eulitz et al., 1999). Ebenso nimmt das eingesetzte Lösungsmittel einen Einfluss auf die gebildete Oxidation der CLAs. Je größer der Anteil an Wasser im Reaktionsansatz ist, desto stärker werden die CLAs oxidiert (Yurawecz et al., 1995, 1997). Insgesamt werden jedoch durch Autoxidation geringere Mengen an FFAs aus CLAs gebildet als durch Photooxidation.

Bei Oxidationsversuchen mit einem kommerziell erworbenen, industriellen CLA-Gemisch und mit aus Distelöl isolierten CLAs war es Yurawecz et al. (1995) möglich zu zeigen,

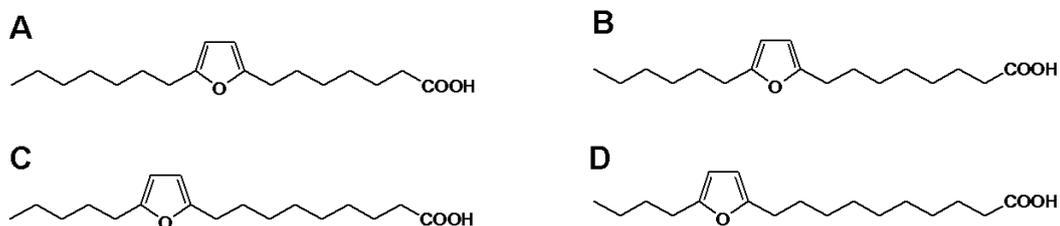


Abbildung 1.11.: Strukturen der Furanfettsäuren, die als Oxidationsprodukte aus konjugierten Linolsäuren gebildet werden: (A) 7-(5-Heptyl-2-furyl)-heptansäure; (B) 8-(5-Hexyl-2-furyl)-octansäure; (C) 9-(5-Pentyl-2-furyl)-nonansäure; (D) 10-(5-Butyl-2-furyl)-decansäure

## 1. Einleitung

dass mit 7-(5-Heptyl-2-furyl)-heptansäure (8,10-FFA; Abb. 1.11 (A)), 8-(5-Hexyl-2-furyl)-octansäure (9,11-FFA; Abb. 1.11 (B)), 9-(5-Pentyl-2-furyl)-nonansäure (10,12-FFA; Abb. 1.11 (C)) und 10-(5-Butyl-2-furyl)-decansäure (11,13-FFA; Abb. 1.11 (D)) vier FFAs als Oxidationsprodukte gebildet werden.

Bisher fehlen Daten, die Erkenntnisse darüber liefern, wieviel nicht-methylsubstituierte FFAs über die Nahrung aufgenommen werden. Definitiv steht die Aufnahme aber im direkten Zusammenhang mit der Menge an CLAs, die in einem Lebensmittel vorliegen, und wie dieses gelagert oder verarbeitet wird. Insbesondere Milchprodukte, Rindfleisch und andere mit Rindern assoziierte Produkte sind besonders reich an CLAs (Devery et al., 2001; Kelly, 2001; Azain, 2003; Eynard und Lopez, 2003; Shen et al., 2007) und daher in diesem Zusammenhang von Interesse. Ebenso werden in den vergangenen Jahren in wachsendem Ausmaß Nahrungsergänzungsmittel auf den Markt gebracht, bei deren Einnahme bis zu 4 g pro Tag an CLAs supplementiert werden.

### 1.2.2. Reaktionen von Furanfettsäuren

Bei der Oxidation von nicht-methylsubstituierten FFAs kommt es, wie für methylsubstituierte FFAs bereits in 1.1.4 beschrieben, zu einer Ringöffnung. Infolgedessen werden aus ihnen ebenfalls Dioxoenfettsäuren gebildet (Yurawecz et al., 1997; Eulitz et al., 1999). Auslöser für diese Reaktion kann auch hier die Oxidation mit  $^1\text{O}_2$  sein. Bezüglich der Oxidation von  $\alpha,\alpha$ -aryl-disubstituierten Furanderivaten mit  $^1\text{O}_2$  war es Foote et al. (1967) möglich ein intermediäres Endoperoxid nachzuweisen. Aus diesem entsteht durch Disproportionierung oder Hydrolyse ein Dioxoen. Dieser Reaktionsmechanismus (Abb. 1.12) wird von Yurawecz et al. (1997) auch für die Bildung der Dioxoenfettsäuren aus nicht-methylsubstituierten FFAs zu Grunde gelegt.

Auch unter der Einwirkung von  $\text{LO}\cdot$  bzw.  $\text{LOO}\cdot$  (Abb. 1.12) werden aus nicht-methylsubstituierten FFAs Dioxoenfettsäuren gebildet. Obwohl für diese Bildung der gleiche Mechanismus wie bei methylsubstituierten FFAs die Grundlage darstellt (s. 1.1.4; Abb. 1.6), scheint der Substitutionsgrad des Furanrings hinsichtlich der Reaktivität der jeweiligen FFA eine bedeutende Rolle zu spielen. So waren Okada et al. (1990) in der Lage zu zeigen, dass nicht-methylsubstituierte FFAs im Gegensatz zu methylsubstituierten FFAs nur eine minimale antioxidative Wirkung haben. Demzufolge war es auch nicht unerwartet, dass Batna und Spittler (1994b) bei der Umsetzung von 9,11-FFA mit dem LOOH von C 18:2 nur sehr geringe Mengen der entsprechenden Dioxoenfettsäure nachweisen konnten.

Ein weiterer Unterschied der nicht-methylsubstituierten FFAs gegenüber den methylsubstituierten Derivaten ist die Stabilität der gebildeten Oxidationsprodukte. Dioxoenfettsäuren

## 1. Einleitung

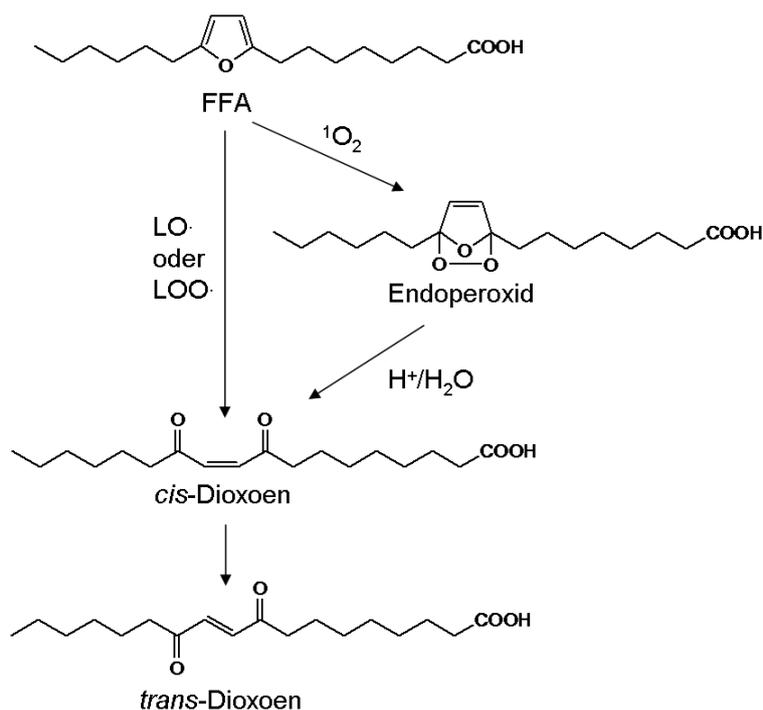


Abbildung 1.12.: Bildung von *trans*-Dioxoenfettsäuren aus Furanfettsäuren durch Oxidation mit Singulett-Sauerstoff oder durch Reaktion mit Alkoxy- bzw. Peroxyradikalen

mit Methylsubstituenten sind im wässrigen Milieu instabil (s. 1.1.4; Abb. 1.7). Aus nicht-methylsubstituierten FFAs hingegen entstehen zunächst *cis*-Dioxoenfettsäuren, die anschließend zu *trans*-Dioxoenfettsäuren isomerisieren (Boyer et al., 1979; Spiteller, 1987; Yurawecz et al., 1997; Eulitz et al., 1999). Diese stellen stabile, isolierbare Produkte dar, die in der Literatur bereits charakterisiert sind (Boyer et al., 1979; Batna und Spiteller, 1994b).

Von den *trans*-Dioxoenfettsäuren ist bekannt, dass sie mit Thiogruppen reagieren (Jandke et al., 1988). Die dabei entstehenden Thioether unterscheiden sich jedoch von denen, die aus den methylsubstituierten Dioxoenen gebildet werden (s. 1.1.4; Abb. 1.8). Die Addition der Thiogruppe findet nicht an der enolischen Doppelbindung des Dioxoenes statt. Da keine Methylsubstituenten am Furanring und somit in der Dioxoenstruktur vorliegen, findet die nucleophile Addition des Thiols direkt an die Doppelbindung der Di-keto-en-Funktion statt. Die entstehenden Thioether, bei denen eine Recyclisierung des Furanrings nicht erfolgen kann, sind in Abbildung 1.13 dargestellt.

Graff et al. (1984) war es möglich zu zeigen, dass *cis*-Dioxoenfettsäuren mit langen Alkylketten die Blutplättchenaggregation hemmen. Die Hemmung wird in diesen Untersuchungen mit der Reaktion der Dioxoene mit den Thiogruppen von Proteinen in Zusammenhang

## 1. Einleitung

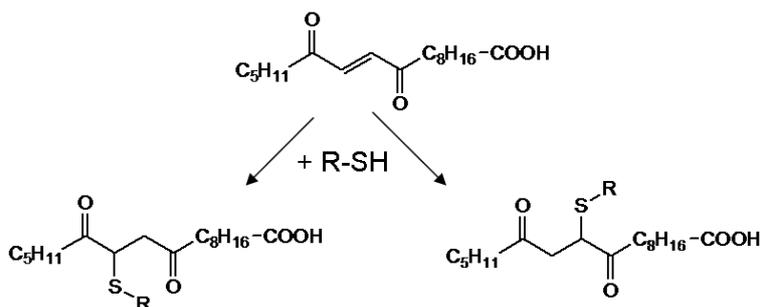


Abbildung 1.13.: Addition von Thiolen an *cis*-Dioenofettsäuren von methylsubstituierten Furanfettsäuren

gebracht. Durch die Bindung der Proteine wird die für die Aggregation von Blutplättchen benötigte Freisetzung von Arachidonsäure (C 20:4) aus Phospholipiden reduziert. Mit von Graff et al. durchgeführten Modellversuchen war zu zeigen, dass tatsächlich die Reaktion der Thiogruppen mit den Dioenen ausschlaggebend ist - auch weil nach einer Reduktion der Doppelbindung keine hemmende Wirkung mehr auszumachen war. Ohne diese ist keine nucleophile Addition einer Thiogruppe an das Molekül möglich.

Studien über den Metabolismus und Abbau von nicht-methylsubstituierten FFAs gibt es derzeit in der Literatur keine. Es ist daher weder bekannt ob eine Aktivierung der FFAs durch oxidativen Metabolismus stattfindet noch in welcher Form diese ausgeschieden werden.

## 1.3. Furane

### 1.3.1. Verbreitung von Furanderivaten

Neben den in 1.1 und 1.2 beschriebenen FFAs gibt es eine Vielzahl von Furanderivaten, die vom Menschen über Nahrung oder Pharmazeutika aufgenommen werden. Die größte Bedeutung kommt in dieser Hinsicht Furanderivaten aus wärmebehandelten Lebensmitteln zu (Maga, 1979), die Aromastoffe darstellen. Auch Furan selbst kommt in verarbeiteten Lebensmitteln vor. Kaffee und Kakao zählen dabei zu den Lebensmitteln, in denen die größte Anzahl unterschiedlicher Furanderivate nachweisbar ist. Aber auch in Tee, Rum, Bier und geräucherten, gekochten und gebratenen Fleisch- und Fischprodukten sind zahlreiche Furanderivate nachweisbar. Weitere Lebensmittel in denen Furanderivate vorliegen sind Früchte, Gemüse, Nüsse und Getreide. Des Weiteren gibt es eine geringere Anzahl an Furanderivaten, die als natürliche Aromastoffe in Nahrungsmitteln vorkommen. In den USA und Europa werden außerdem jährlich ca. 919 kg aliphatische Kohlenwasserstoffe,

## 1. Einleitung

Tabelle 1.4.: Furanderivate, die in wärmebehandelten Lebensmitteln vorkommen und deren Gehalte in einigen Lebensmitteln nach der Verarbeitung; ungefähre jährliche Produktionsmenge in den USA und Europa; <sup>a</sup>Maga (1979); <sup>b</sup>Williams und Bend (2006); LM = Lebensmittel, k.A. = keine Angabe

Verbindung (Struktur, Abb. 1.14)	Vorkommen in verarbeiteten LM <sup>a</sup>	Menge in LM <sup>a</sup> [ppb]	Produktions- menge <sup>b</sup> [kg/a]
Furan (A)	Kaffee, Hühnerfleisch, Rindfleisch, Milchprodukte, Nüsse, Ölsaaten, Brot	50 - 3700 (Rindfleisch), 330 (Raps), 370 (Soja), 120 (Fisch)	k.A.
Furfural (B)	Kaffee, Kakao, Tee, Rum, Mango, Früchte, Schweineleber, Rindfleisch, Milchprodukte, Nüsse, Ölsaaten, Gemüse, Kartoffeln, Brot	k.A.	k.A.
2-Methyl- furan (C)	Kaffee, Rum, Tamarinde, Hühnerfleisch, Schweineleber, Rindfleisch, Milchprodukte, Nüsse, Ölsaaten, Gemüse, Kartoffeln, Brot, Fisch	61 - 150 (Rindfleisch), 27 - 440 (Raps), 14 - 310 (Soja), 12 - 52 (Fisch)	3,4
2-Ethyl- furan (D)	Kaffee, Hühnerfleisch, Schweineleber, Rindfleisch, Milchprodukte, Ölsaaten, Gemüse, Fisch	13 - 1370 (Raps), 130 - 4000 (Soja), 4 - 710 (Fisch)	4,5
2-Butyl- furan (E)	Kaffee, Hühnerfleisch, Rindfleisch, Milchprodukte, Ölsaaten	Spur (Rindfleisch), 1 - 32 (Raps), 14 - 125 (Soja)	4,0
2,5- Dimethyl- furan (F)	Kaffee, Eier, Rindfleisch, Ölsaaten, Fisch	25 (Rindfleisch), Spur (Raps), 31 (Soja), Spur (Fisch)	0,2
2-Acetyl- furan (G)	Kaffee, Kakao, Rum, Schweineleber, Milchprodukte, Nüsse, Ölsaaten, Gemüse, Brot	k.A.	476
1-(2'- Furyl)-3- butanon (H)	Kaffee	k.A.	36,0

## 1. Einleitung

Alkohole, Aldehyde, Ketone, organische Säuren und deren Ester, Sulfide, Disulfide und Ether, die einen Furansubstituenten enthalten, als Aromastoffe produziert (Williams und Bend, 2006). Tabelle 1.4 gibt einen Überblick über einige Furanderivate, die Lebensmittel in denen sie nachweisbar sind und die jährlich produzierte Menge. In Abbildung 1.14 (A) bis (H) sind die dazugehörigen Strukturformeln der Verbindungen dargestellt.

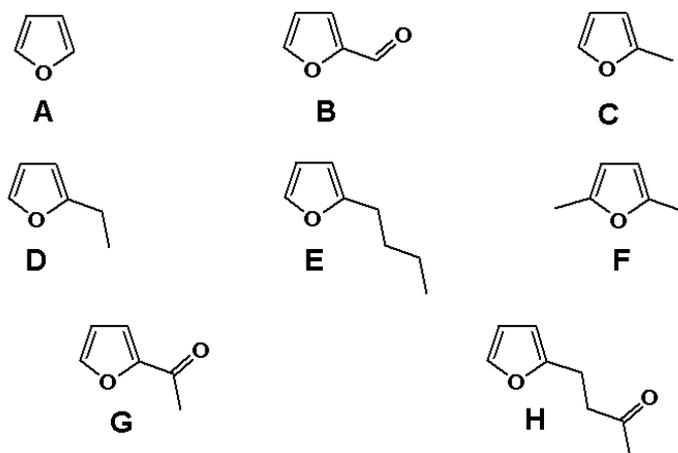


Abbildung 1.14.: Strukturformeln einiger Furanderivate, die in wärmebehandelten Lebensmitteln vorkommen; (A) Furan, (B) Furfural, (C) 2-Methylfuran, (D) 2-Ethylfuran, (E) 2-Butylfuran, (F) 2,5-Dimethylfuran, (G) 2-Acetylfuran, (H) 1-(2'-Furyl)-3-butanon

Furanderivate kommen jedoch nicht nur als Aromastoffe in Lebensmitteln vor. So bildet z.B. die Schwarznessel (*Perilla frutescens*) überwiegend in ihren Blättern mit Perilla-Keton (Abb. 1.15 (A)) ein ein Fraßgift aus, das ebenfalls ein Furanderivat darstellt (Kerr et al., 1986). Des Weiteren bildet die Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*) bei Pilzbefall (z.B. durch *Fusarium solani*) mit Ipomeamaron (Abb. 1.15 (B)) einen Stress-Metaboliten aus, der dem mikrobiellen Wachstum der Parasiten entgegenwirken soll (Akazawa, 1960; Burka und Kuhnert, 1977; Grisebach und Ebel, 1978). Das Ipomeamaron unterliegt anschließend einem weiteren Zerfall und bildet weitere Furanderivate, wie z.B. 4-Ipomeanol (Boyd et al., 1974; Abb. 1.15 (C)), welches in Süßkartoffeln nachweisbar ist (Burka et al., 1977).

Eine weitere Quelle für die Aufnahme von Furanderivaten für den Menschen stellen Medikamente dar. Dabei ist z.B. Furosemid (Abb. 1.15 (D)) eine der am weitesten verbreiteten Verbindungen. Es handelt sich dabei um einen Arzneistoff, der zu den Schleifendiuretika zählt. Furosemid wird als Arzneimittel zur Ausscheidung großer Mengen von Gewebeflüssigkeit verabreicht.

## 1. Einleitung

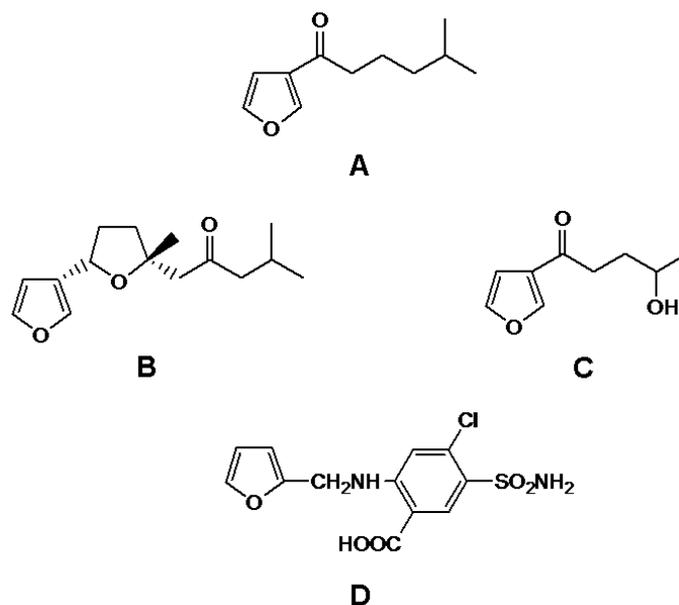


Abbildung 1.15.: Weitere Furanderivate, die vom menschlichen oder tierischen Organismus aus der Umwelt aufgenommen werden; (A) Perilla-Keton, (B) Ipomeamaron, (C) 4-Ipomeanol, (D) Furosemid

### 1.3.2. Bildung von Furanderivaten in Lebensmitteln

Furanderivate können bei der Verarbeitung von Lebensmitteln auf unterschiedlichen Wegen gebildet werden. So kann Furfural beispielsweise im sauren Milieu aus Pentosen entstehen (Belitz et al., 2001; Abb. 1.16, oben). Es kommt dabei zu einer Enolisierung des Saccharids. Durch verschiedene Dehydratisierungsreaktionen und eine Cyclisierung werden schließlich Furanderivate gebildet.

Ebenfalls zu oxygenierten Furanderivaten führt die Maillard-Reaktion. Hier reagieren reduzierende Zucker mit Aminogruppen von Proteinen, Peptiden, Aminosäuren oder Aminen (Abb. 1.16, unten). Eine geringe Wasseraktivität, leicht erhöhte Temperatur und längere Lagerung fördern diese Reaktion (Belitz et al., 2001). Dabei kommt es zunächst zur Bildung von Enaminolen. Nach Eliminierung von Wasser und des Amins entstehen Desoxyosone als Intermediate, aus denen, wie bei der Reaktion im sauren Milieu, durch Dehydratisierung und Cyclisierung Furanderivate entstehen können. Sowohl bei der Maillard-Reaktion als auch bei der Reaktion der Saccharide im Sauren ist es vom Saccharid abhängig welche Produkte gebildet werden.

## 1. Einleitung

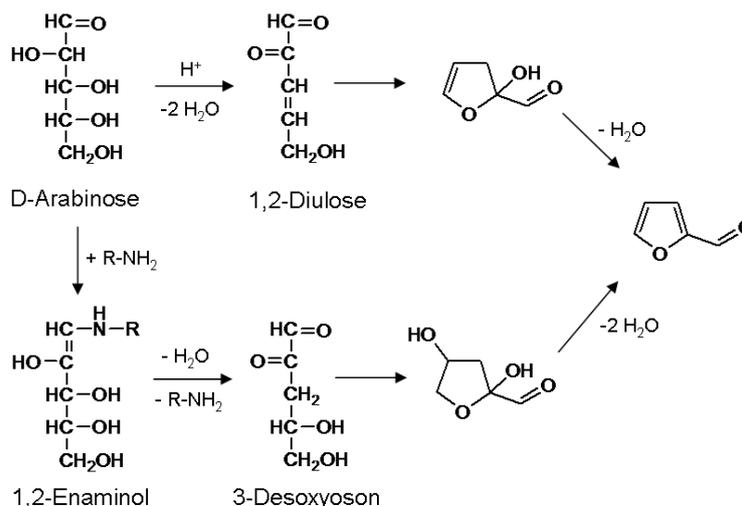


Abbildung 1.16.: Bildung von Furfural aus D-Arabinose im sauren Milieu ( $pH < 3$ ; oben) bzw. durch die Maillard-Reaktion (unten)

Aliphatische Kohlenwasserstoffe mit einem Furansubstituenten entstehen hingegen durch Oxidation aus PUFAs (Sayre et al., 1993). Dabei stellt ein 4-Hydroxy-2-alkenal das relevante Intermediat dar (Abb. 1.17).

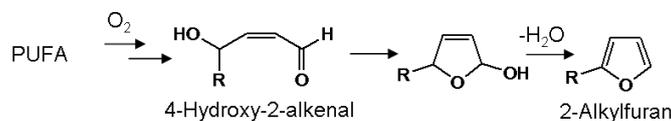


Abbildung 1.17.: Bildung von Alkylfuranen durch Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA)

Furan selbst, das in Lebensmitteln als nicht unbedenklich eingestuft wird (s. 1.3.3), kann auf unterschiedlichen Wegen aus verschiedenen Muttersubstanzen gebildet werden (Abb. 1.18). Perez Locas und Yaylayan (2004) war es möglich die verschiedenen Bildungsmechanismen aufzuklären. Zu den Ausgangsverbindungen zählen Aminosäuren, Kohlenhydrate und PUFAs. Die zentralen Intermediate stellen dabei Aldotetrosen und 4-Hydroxy-2-butenal dar. Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Reaktionen (Saccharide im sauren Milieu, Maillard-Reaktion, Oxidation von PUFAs) können dabei zur Bildung von Furan führen. Zusätzlich kann aus L-Serin und L-Cystein Furan auch in Abwesenheit von Kohlenhydraten Furan entstehen.

## 1. Einleitung

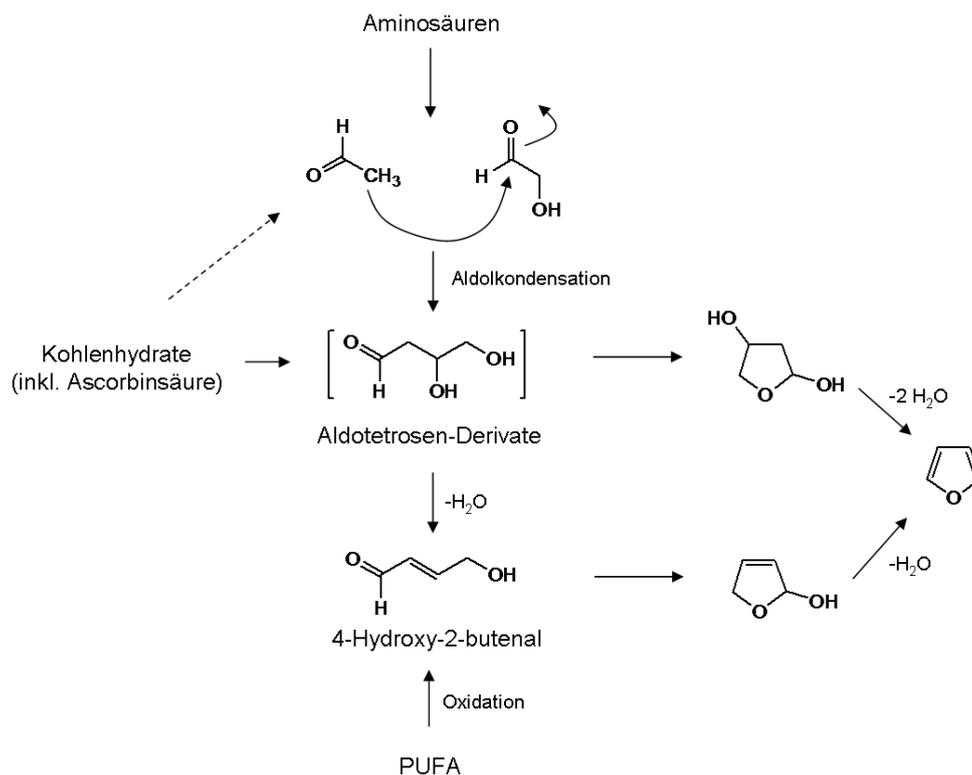


Abbildung 1.18.: Unterschiedliche Bildungswege von Furan aus Kohlenhydraten, mehrfach ungesättigten Fettsäuren und Aminosäuren; der gestrichelte Pfeil stellt einen untergeordneten Mechanismus dar

### 1.3.3. Metabolismus und toxikologische Bedeutung von Furanderivaten

Alle in 1.3.1 beschriebenen Furanderivate werden im Körper über den Fremdstoffmetabolismus in hydrophile Verbindungen überführt, um sie über Urin oder Galle ausscheiden zu können. Dabei kann es zu einer metabolischen Aktivierung der Muttersubstanzen kommen, was toxische Effekte hervorrufen kann.

Ravindranath et al. (1984) war es möglich zu zeigen, dass 2-Methylfuran bei der oxidativen Umsetzung mit Rattenlebermikrosomen (RLM) epoxidiert wird. Infolgedessen kommt es zu einer Ringöffnung des 2-Methylfurans, was zur Bildung von Acetylacrolein führt (Abb. 1.19). Dieses kann aufgrund des elektrophilen Charakters der Aldehydfunktion DNA- und/oder Proteinaddukte bilden. In einer weiterführenden Untersuchung von Ravindranath und Boyd (1985) konnte nachgewiesen werden, dass das durch oxidativen Metabolismus gebildete Acetylacrolein in der Lage ist irreversibel an CYPs zu binden und diese inaktiviert. Aufgrund der nachweisbaren Addukte ist auszuschließen, dass die Epoxide von 2-Methylfuran mit den Proteinen reagieren. Die Fähigkeit von Acetylacrolein kovalent an Proteine und/oder DNA zu binden führt dabei *in vivo* zu Nekrosen. Die meisten Adduk-

## 1. Einleitung

te sind in diesem Zusammenhang in der Leber, gefolgt von Niere und Lunge von Ratten nachzuweisen (Ravindranath et al., 1986).

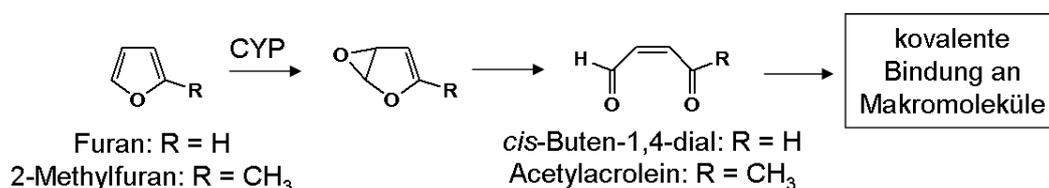


Abbildung 1.19.: Bildung der reaktiven Metaboliten *cis*-Buten-1,4-dial (R = H) und Acetylacrolein (R = CH<sub>3</sub>) aus Furan (R = H) und 2-Methylfuran (R = CH<sub>3</sub>) durch CYP-katalysierte Oxidation

*In vivo* Versuche mit Mäusen zeigten, dass auch andere als Aromastoffe vorkommende und eingesetzte Furanderivate in der Lage sind Nekrosen in verschiedenen Gewebetypen hervorzurufen. So ist bekannt, dass die Behandlung der Tiere mit 2-Acetylfuran zur Bildung von Lebernekrosen (McMurtry und Mitchell, 1977) und mit 2-Ethylfuran zur Bildung von Leber-, Nieren- und Lungennekrosen (Gammal et al., 1984; Wiley et al., 1984) führt. Hierfür ist wie bei 2-Methylfuran die metabolische Aktivierung der Furanderivate ausschlaggebend. Durch Bildung reaktiver Aldehyde können DNA- und/oder Proteinaddukte entstehen.

Bezüglich der Genotoxizität von Furanderivaten, die als Aromastoffe Anwendung finden gibt es widersprüchliche Angaben. Während Stich et al. (1981) in Chinesischen Hamster Ovarien (CHO) klastogene Wirkungen von sechs Furanderivaten (darunter Furfural, 2-Methylfuran, 2,5-Dimethylfuran und 2-Acetylfuran) nachweisen konnten, treten in anderen Studien bei Behandlung von *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* mit diesen Substanzen nahezu keine genotoxischen Wirkungen auf (Williams und Bend, 2006). Williams und Bend kommen außerdem zu der Schlussfolgerung, dass Furanderivate als Aromastoffe in Lebensmitteln in zu geringen Mengen vorliegen, um im Körper eine Konzentration zu erreichen, die tatsächlich ein Risiko darstellt.

Oxidative Metabolisierung führt bei Furan ebenfalls zur Ringöffnung. *Cis*-Buten-1,4-dial stellt den reaktiven Metaboliten von Furan dar (Chen et al., 1995; Abb. 1.19). Diese Substanz wird katalysiert durch CYP2E1 (Kedderis et al., 1993) vermutlich über ein intermediäres Epoxid gebildet. Der gebildete Dialdehyd ist in der Lage irreversibel an Proteine und Nucleotide zu binden (Burka et al., 1991; Byrns et al., 2002). Infolgedessen ist *in vivo* in Ratten und Mäusen eine cancerogene Wirkung von Furan nachweisbar. Unter der Einwirkung von Furan werden u.a. Cholangiocarcinome und Lebercarcinome gebildet. Ein verstärktes Auftreten von mononukleärer Zell-Leukämie ist ebenfalls zu beobachten (Heppner und Schlatter, 2007).

In verschiedenen *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass Furan nach metabolischer Aktivierung genotoxisch wirkt (Stich et al., 1981; Heppner und Schlatter, 2007). Ebenso

## 1. Einleitung

war für *cis*-2-Buten-1,4-dial nachzuweisen, dass es in CHO-Zellen DNA-Einzelstrangbrüche hervorruft (Marinari et al., 1984) und DNA-Addukte *in vitro* bildet (Byrns et al., 2002). Allerdings konnten von Burka et al. (1991) *in vivo* keine DNA-Addukte mit  $^{14}\text{C}$ -gelabeltem Furan detektiert werden. Dagegen waren 80% der eingesetzten Radioaktivität mit Proteinen der Leber assoziiert. Wilson et al. (1992) postulieren in diesem Zusammenhang, dass furan-induzierte Proliferation von Leberzellen und nicht die *in vivo* Genotoxizität in erster Linie für die Bildung von Lebertumoren verantwortlich ist. Kedderis und Ploch (1999) stellen hingegen die These auf, dass die Entkopplung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung in mit Furan behandelten Rattenhepatocyten eine Rolle spielt (Mugford et al., 1997). Die daraus resultierende Abnahme der Energiespeicher führt zur Freisetzung von cytotoxischen Enzymen, wie Endonucleasen. Diese führen DNA-Doppelstrangbrüche herbei. Eine anschließende fehlerhafte Reparatur dieser Strangbrüche führt zu Mutationen, die an der Tumorbildung beteiligt sind.

Ipomeamaron und das daraus entstehende 4-Ipomeanol werden ebenfalls durch CYP katalysierte Oxidation des Furanrings aktiviert. Diese beiden Verbindungen sind in erster Linie lungentoxisch (Boyd et al., 1974). Nur durch zusätzliche Induktion der CYPs war *in vivo* eine Nekrosenbildung in Leber und Nieren zu beobachten (Boyd, 1981). Bei Furosemid handelt es sich um ein hepatotoxisches Furanderivat (Mitchell et al., 1976). Die Aktivierung erfolgt ebenfalls am Furanring, da analoge Verbindungen ohne Furanring oder mit gesättigtem Furanring diese Wirkung nicht zeigten.

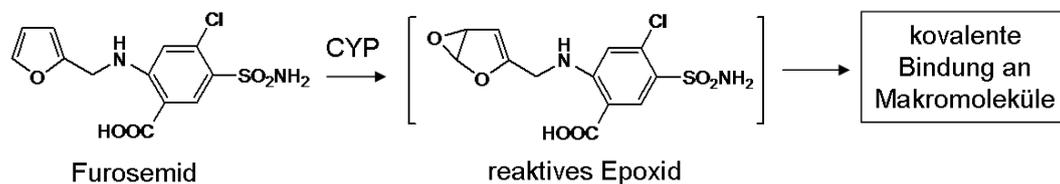


Abbildung 1.20.: Mechanismus der CYP-vermittelten metabolischen Aktivierung von Furosemid

Bei Ipomeamaron, 4-Ipomeanol und Furosemid ist im Gegensatz zu den davor beschriebenen Furanderivaten nicht bekannt wie das reaktive Intermediat aussieht. Da keine Metaboliten mit geöffnetem Furanring nachweisbar waren, kann bei diesen Substanzen möglicherweise das intermediär gebildete Epoxid der reaktive Metabolit sein, der zu Arylierungen im Zielgewebe führt (Mitchell et al., 1976; Boyd, 1981).

## 2. Aufgabenstellung

Methylsubstituierte FFAs sind ubiquitär verbreitet und kommen vor allem in Fischlipiden in großen Mengen vor. Daher wurde in den letzten Jahren die kardioprotektive Wirkung von Fischölen immer wieder mit FFAs in Verbindung gebracht.

FFAs ohne Methylsubstituenten entstehen durch Photo- oder Autoxidation aus CLAs. Auch diesen werden eine Vielzahl positiver Eigenschaften, wie z.B. anticancerogene Wirkungen, nachgesagt. Infolgedessen wurden in den letzten Jahren viele Präparate auf den Markt gebracht, die große Mengen an CLAs enthalten. Bei der Einnahme dieser muss von einer erhöhten Aufnahme von nicht-methylsubstituierten FFAs ausgegangen werden. Wie sich FFAs jedoch auf die Lipidzusammensetzung von Zellen auswirken, ob sie ein genotoxisches Potential besitzen und wie der Metabolismus verläuft ist nicht bekannt. Ebenso ist nicht klar, ob ihnen die selben positiven Wirkungen wie den methylsubstituierten FFAs zuzuschreiben sind.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit 8,10-, 9,11- und 10,12-FFA. Dabei handelt es sich um die drei durch Oxidation von CLAs im größten Ausmaß gebildeten FFAs.

Ziel der Arbeit war zunächst, den oxidativen *in vitro* Metabolismus der FFAs zu betrachten. Dabei war von besonderem Interesse, ob der Furanring der FFAs oxidativ zu reaktiven Metaboliten, wie z.B. Epoxiden, aktiviert wird. Eine weitere Stoffwechselreaktion, die betrachtet wurde, war die  $\beta$ -Oxidation der FFAs. Die FFAs selbst sollten zusätzlich mit Hilfe des *in vitro* Mikrokern-Tests auf ihr genotoxisches Potential hin untersucht werden. Da genotoxische und cytotoxische Wirkungen auch mit einer Veränderung der Membranstruktur von Zellen in Zusammenhang stehen können, war von Interesse, inwiefern FFAs Membran- und Speicherlipide *in vitro* beeinflussen. In dieser Hinsicht war es beabsichtigt, sowohl Versuche in Zell- als auch in Gewebekultur durchzuführen.

Abschließend sollte betrachtet werden, welche Auswirkungen nicht-methylsubstituierte FFAs auf die Lipidperoxidation sowohl in Rattenleberschnitten als auch in kultivierten Zellen haben. Die Absicht war einen Vergleich zu den methylsubstituierten FFAs, die antioxidativ wirken, zu bekommen.



## 3. Ergebnisse

### 3.1. Metabolismus und Abbau von Furanfettsäuren

Im menschlichen Organismus findet eine Vielzahl an Stoffwechselreaktionen statt. So werden z.B. unpolare organische Substanzen unter Einfluss der CYPs im Phase-I-Metabolismus oxigeniert. Im Zuge der Biotransformation können jedoch ebenfalls reaktionsfähige Metaboliten entstehen, die in der Lage sind mit Zellbestandteilen zu reagieren und beispielsweise DNA- oder Protein-Addukte bilden können. Ein Beispiel dafür ist die Bildung reaktiver Epoxide, die an ungesättigten Bindungen, wie sie im Furanring der FFAs vorliegen, entstehen können. Eine weitere Stoffwechselreaktion, die im Zusammenhang mit FFAs von Bedeutung ist, ist der Abbau über den Weg der  $\beta$ -Oxidation. FFAs werden dabei zu Acetyl-Coenzym A (Ac-CoA) abgebaut. Da bisher keine Daten zum oxidativen Metabolismus und der  $\beta$ -Oxidation von FFAs vorliegen, wurden diese Reaktionen mit *in vitro* Experimenten untersucht.

#### 3.1.1. Mikrosomale Umsetzung von Furanfettsäuren

Zur Untersuchung des oxidativen Metabolismus der FFAs wurde ein zellfreies *in vitro* System gewählt. Dazu erfolgte eine Inkubation von 8,10-, 9,11- und 10,12-FFA (s. 1.2.1, Abb. 1.11 (A), (B) und (C)) mit RLM unbehandelter und mit Aroclor 1254 behandelte männlicher Wistar-Ratten (Wi-Ratten) wie in 6.2.2.1 beschrieben. Die Produkte der oxidativen Umsetzung wurden mittels HPLC fraktioniert, gesammelt (s. 6.2.1.1) und anschließend nach Derivatisierung mittels GC-MS analysiert (s. 6.2.1.2).

##### 3.1.1.1. 8,10-Furanfettsäure

Das Elutionsprofil (Abb. 3.1) der Umsetzung von 8,10-FFA mit RLM unbehandelter Wi-Ratten zeigt gegenüber der Kontrolle zusätzlich die Peaks A1 bis A3, A6, A8 und A9.

### 3. Ergebnisse

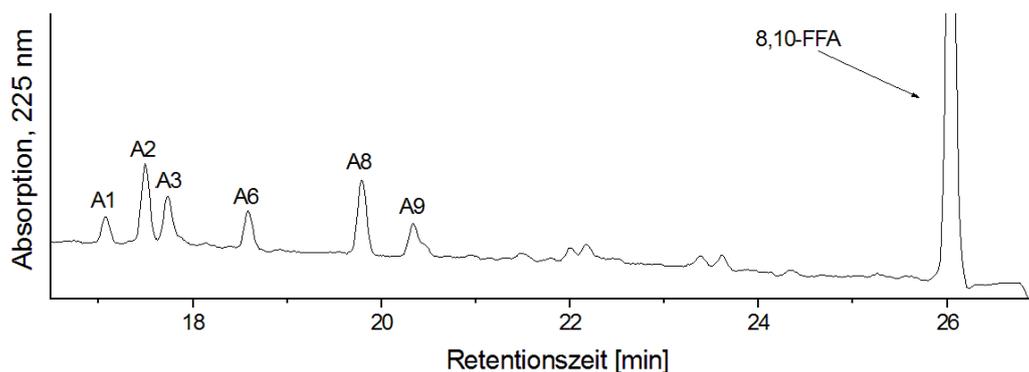


Abbildung 3.1.: HPLC-DAD-Chromatogramm der oxidativen Umsetzung von 8,10-FFA mit RLM von nicht behandelten männlichen Wi-Ratten;  $c(\text{FFA}) = 100 \mu\text{M}$ ;  $t = 60 \text{ min}$ ;  $c(\text{Protein}) = 1 \text{ mg/ml}$ ; HPLC-Bedingungen s. 6.2.1.1

Um die Strukturaufklärung der gebildeten Produkte von 8,10-FFA verständlicher zu machen, wird zunächst die Fragmentierung der Muttersubstanz betrachtet. Bei der Charakterisierung der Metaboliten wurde neben Methylierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) teilweise auch eine Silylierung mit *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) angewendet. Daher sind hier Massenspektren und Fragmentierungsschemata des Methylesters und Trimethylsilylester von 8,10-FFA dargestellt.

Das Massenspektrum des Methylesters von 8,10-FFA (Abb. 3.2) mit dem Molekülion  $m/z = 308$  verdeutlicht, dass die spezifischen Massenfragmente über einen intakten Furanring verfügen, was auf dessen mesomeriestabilisierten Zustand zurückzuführen ist. Bei der Fragmentierung kommt es hauptsächlich zu einer Abspaltung des Säurerests am Furanring, was zum Basision  $m/z = 179$  führt. Die Abspaltung des Alkylrests führt zu dem Fragment  $m/z = 223$ , aus dem durch induktive Spaltung das Fragment  $m/z = 149$  gebildet werden kann. Die Abspaltung des Alkyl- wie auch die des Säurerests kann sowohl über eine  $\sigma$ -Spaltung, als auch über eine  $\beta$ -Spaltung erfolgen. Des Weiteren kann eine  $\alpha$ -Abspaltung des Methylrests des Fettsäuremethylesters (FSME) erfolgen, was zum Fragment  $m/z = 277$  führt. An diesem kann es wiederum zu Abspaltung des Alkyl- oder Säurerests kommen. Auf beiden Seiten des Furanrings kommt es zu Verkürzungen der Alkylkette unter Abspaltungen von Fragmenten mit 14 amu. Die für FFAs spezifischen Fragmente  $m/z = 107$  und  $m/z = 95$  können auf verschiedenen Wegen entstehen.

Der Trimethylsilylester von 8,10-FFA (Abb. 3.3) weist das Molekülion  $m/z = 366$  auf. Durch  $\sigma$ -Abspaltung eines Methylrests an der Trimethylsilylgruppe wird das Fragment  $m/z = 351$  gebildet. Fragmente, welche die derivatisierte Carboxylgruppe beinhalten, haben wegen des höheren Molekulargewichts des Derivatisierungsreagenz, im Vergleich zu

### 3. Ergebnisse

den Fragmenten des Methylesters ein um 58 amu erhöhtes Molekulargewicht. Die übrigen charakteristischen Fragmente des Trimethylsilylestere von 8,10-FFA sind vergleichbar mit denen des Methylesters.

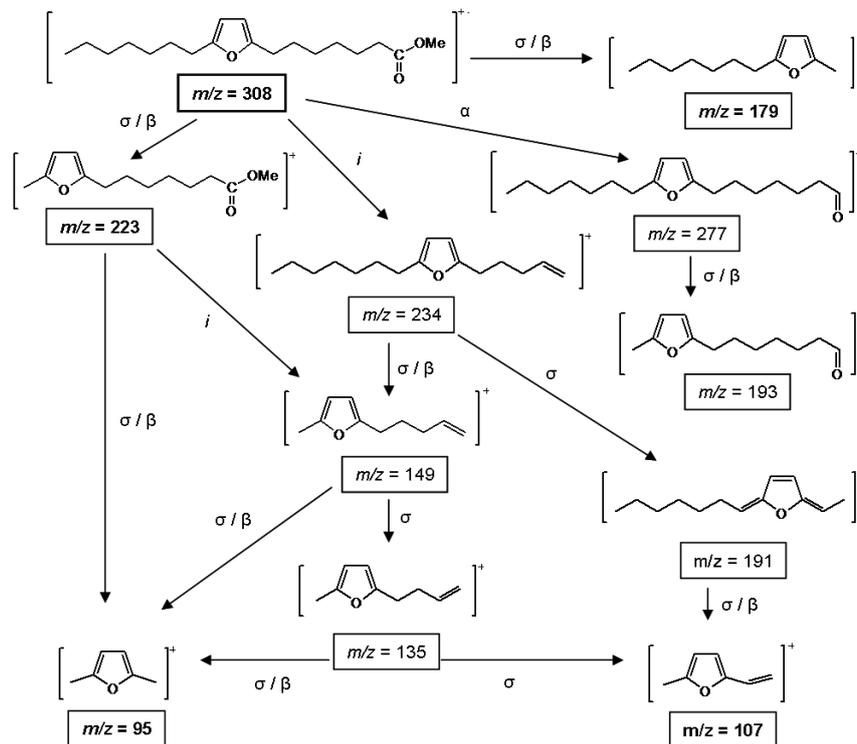
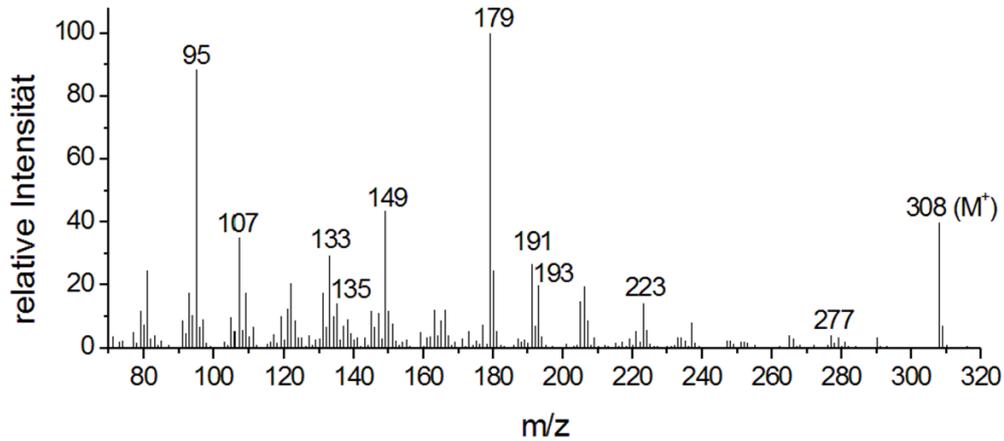


Abbildung 3.2.: Massenspektrum (oben) und Fragmentierungsschema (unten) des 8,10-FFA-Methylesters nach EI-Ionisierung, Molekülion  $m/z = 308$ , IE = 70 eV

### 3. Ergebnisse

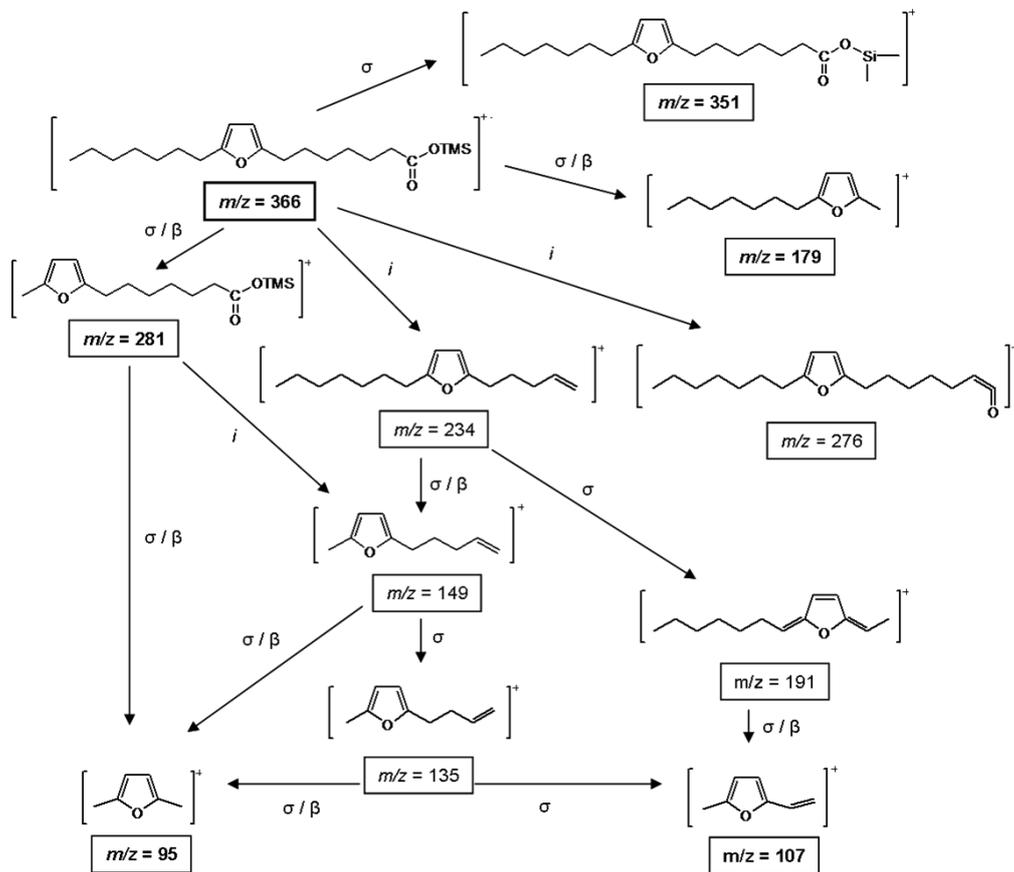
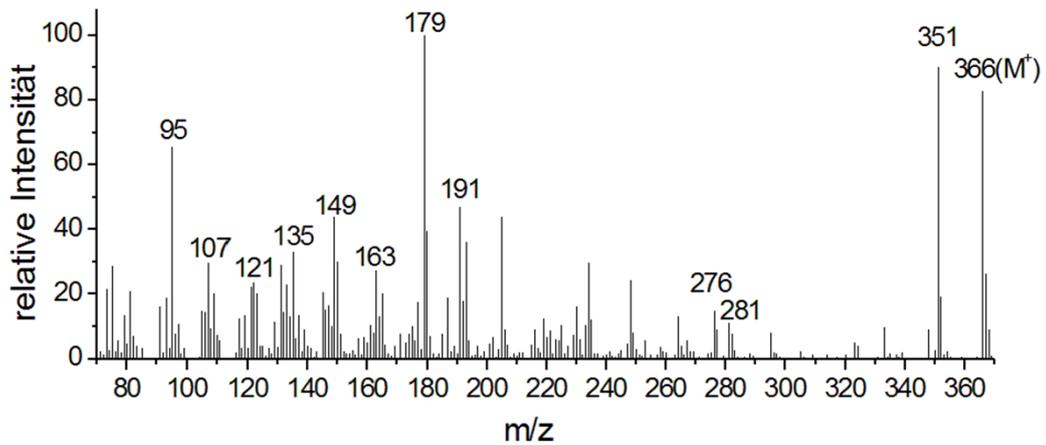


Abbildung 3.3.: Massenspektrum (oben) und Fragmentierungsschema (unten) des 8,10-FFA-Trimethylsilylesters nach EI-Ionisierung, Molekülion  $m/z = 366$ , IE = 70 eV

### 3. Ergebnisse

HPLC-Peak A1 (Abb. 3.1) zeigt in der GC-MS-Analyse nach Methylierung eine der Muttersubstanz zuzuordnende Verbindung (RT = 24,26 min, Abb. 3.4 (A)) mit einem Molekülion von  $m/z = 352$  (Abb. 3.4 (B)). Aufgrund der Masse und der gebildeten Fragmente handelt es sich bei diesem Produkt um einen Metaboliten von 8,10-FFA, der sowohl eine Keto- als auch eine Hydroxygruppe am Alkylrest aufweist (Abb. 3.5). Der Verlust des Säurerests mit den daraus resultierenden Fragmenten  $m/z = 191$  und  $m/z = 223$  zeigt, dass sowohl die Keto- als auch die Hydroxygruppe am Alkylrest der FFA lokalisiert sind. Des Weiteren ist das Fragment  $m/z = 149$  ein Hinweis darauf, dass sich die Keto-Gruppe am Kohlenstoffatom C15 der FFA befindet, da an dieser Stellen bevorzugt eine  $\alpha$ -Spaltung stattfinden kann. Anhand der Doppelbindung, die durch Methanolabspaltung gebildet wird ist festzustellen, dass die Hydroxygruppe zwischen Keto-Gruppe und Furanring lokalisiert ist. Des Weiteren muss die Hydroxygruppe  $\alpha$ -ständig zur Keto-Gruppe liegen, da ansonsten mit TMSH keine vollständige Derivatisierung aufgrund zu geringer Acidität der Hydroxy-Gruppe möglich wäre. Eine entsprechende Substanz mit freier Hydroxygruppe ist mittels GC-MS nicht nachweisbar.

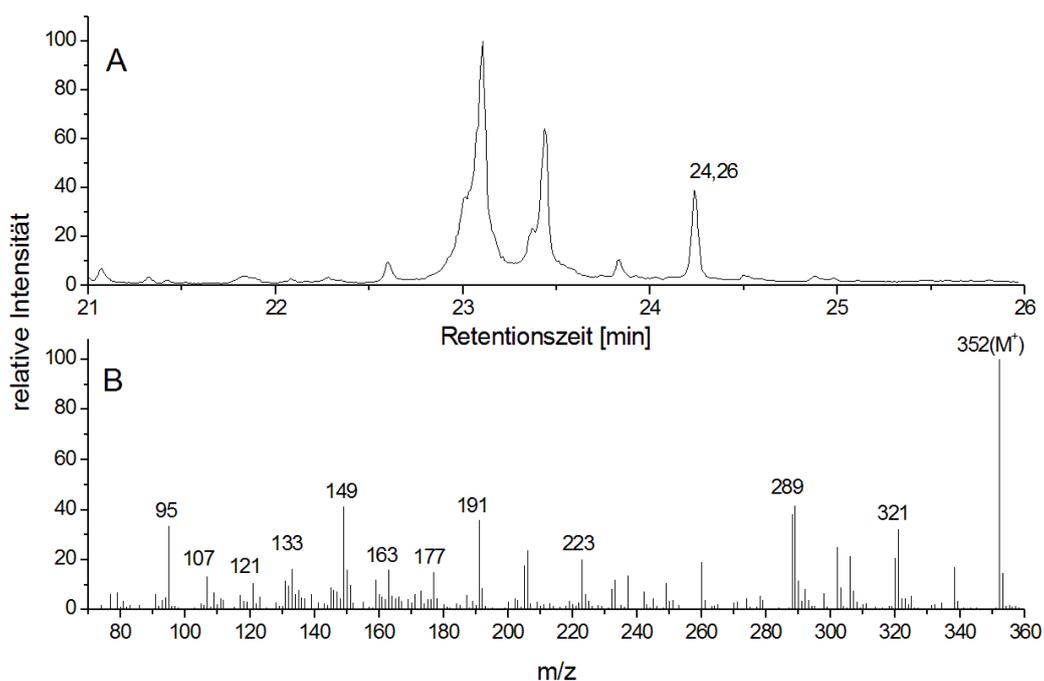


Abbildung 3.4.: GC-MS-Chromatogramm (Totalionenstrom; TIC) von HPLC-Peak A1 der oxidativen Umsetzung von 8,10-FFA mit Wi-RLM nach Methylierung mit TMSH (A), Peak RT = 24,26 min ist als Produkt von 8,10-FFA nachweisbar; Massenspektrum von RT = 24,26 min (B); Molekülion  $m/z = 352$ , EI-Ionisierung, IE = 70 eV; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

Das GC-MS-Chromatogramm (Abb. 3.7 (A)) von HPLC-Peak A2 (Abb. 3.1) zeigt nach Methylierung zwei Produktpeaks, die der Muttersubstanz zuzuordnen sind. Die Produkte

### 3. Ergebnisse

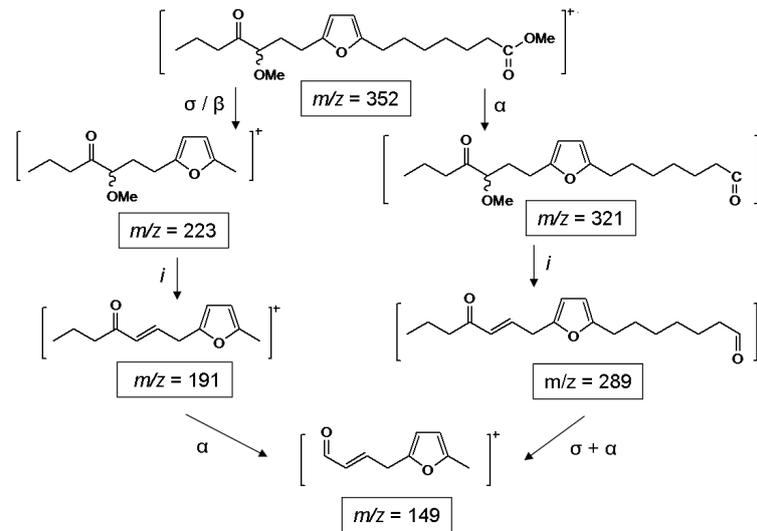


Abbildung 3.5.: Strukturvorschlag und spezifische Fragmente des oxidativen Metaboliten von 8,10-FFA aus HPLC-Peak A1 nach Methylierung mit TMSH, Molekülion  $m/z = 352$  (RT = 24,26 min); EI-Ionisierung, IE = 70 eV

fragmentieren auf vergleichbare Weise. Jedoch weisen sie unterschiedliche Molekülionen auf. Das Massenspektrum des Peaks bei RT = 22,59 min (Abb. 3.7 (B)) zeigt ein Molekülion von  $m/z = 338$ , das Massenspektrum des Peaks bei RT = 23,02 min (Abb. 3.7 (C)) ein Molekülion von  $m/z = 324$ .

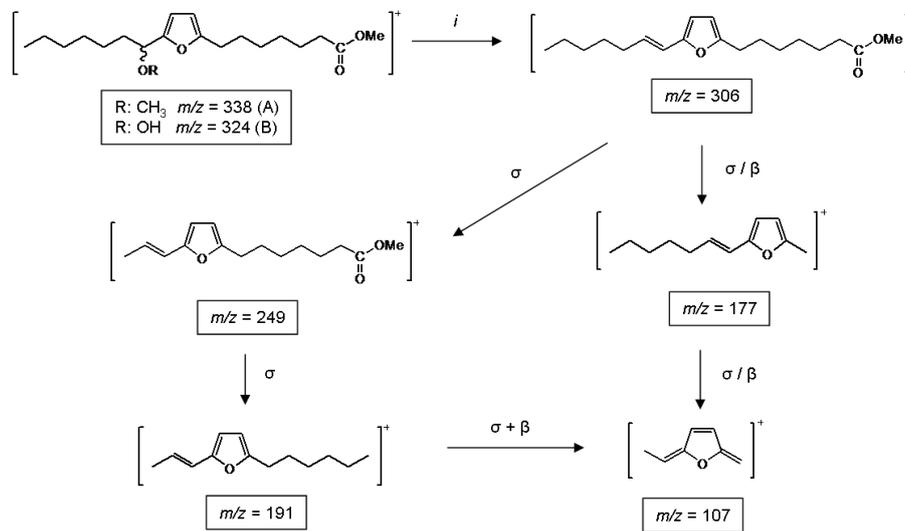


Abbildung 3.6.: Strukturvorschlag und Fragmentierungsschema für den oxidativen Metaboliten von 8,10-FFA aus HPLC-Peak A2 nach Methylierung mit TMSH; R = CH<sub>3</sub>: vollständig methyliert, Molekülion  $m/z = 338$  (RT = 22,59 min); R = H: eine freie Hydroxygruppe, Molekülion  $m/z = 324$  (RT = 23,02 min); EI-Ionisierung, IE = 70 eV

### 3. Ergebnisse

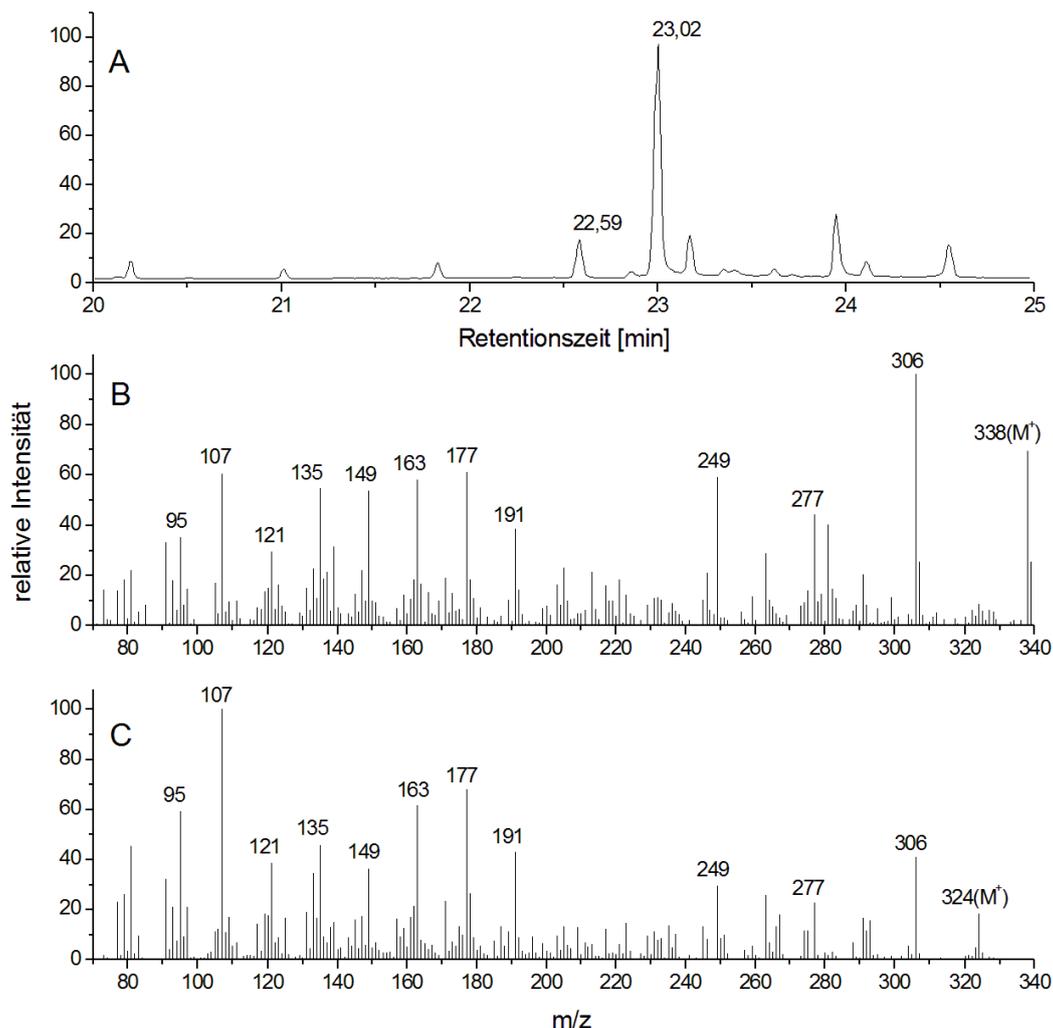


Abbildung 3.7.: GC-MS-Chromatogramm (TIC) von HPLC-Peak A2 der oxidativen Umsetzung von 8,10-FFA mit Wi-RLM nach Methylierung mit TMSH (A), Peak RT = 22,59 min und Peak RT = 23,02 min sind als Produkte von 8,10-FFA nachweisbar; Massenspektrum von RT = 22,59 min (B), Molekülion  $m/z = 338$ ; Massenspektrum von RT = 23,02 min (C), Molekülion  $m/z = 324$ ; EI-Ionisierung, IE = 70 eV; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

Dies lässt den Schluss zu, dass in A2 ein Produkt von 8,10-FFA vorliegt, das an der Alkylkette hydroxyliert ist (Abb. 3.6). Da TMSH die Hydroxygruppe an der Alkylkette wegen ihrer zu geringen Acidität nicht vollständig derivatisiert, sind zwei Peaks zu detektieren. Dabei weist die nicht vollständig derivatisierte Verbindung ein Molekülion von  $m/z = 324$ , das vollständig derivatisierte Produkt hingegen, aufgrund der zusätzlichen Methylgruppe, ein Molekülion von  $m/z = 338$  auf. Eine Wasser bzw. Methanolabspaltung führt dabei zu den Fragmenten  $m/z = 306$ . Die weitere Fragmentierung verläuft bei intaktem Furanring ähnlich wie bei 8,10-FFA. Aufgrund der Fragmente  $m/z = 191$  und  $m/z = 177$ , die eine

### 3. Ergebnisse

Doppelbindung am Alkylrest aufweisen, ist die Aussage möglich, dass die Hydroxygruppe dort lokalisiert ist. Die genaue Position dieser ist jedoch nicht zu bestimmen, da die durch Abspaltung der Hydroxygruppe entstandene Doppelbindung mittels MS nicht lokalisierbar ist.

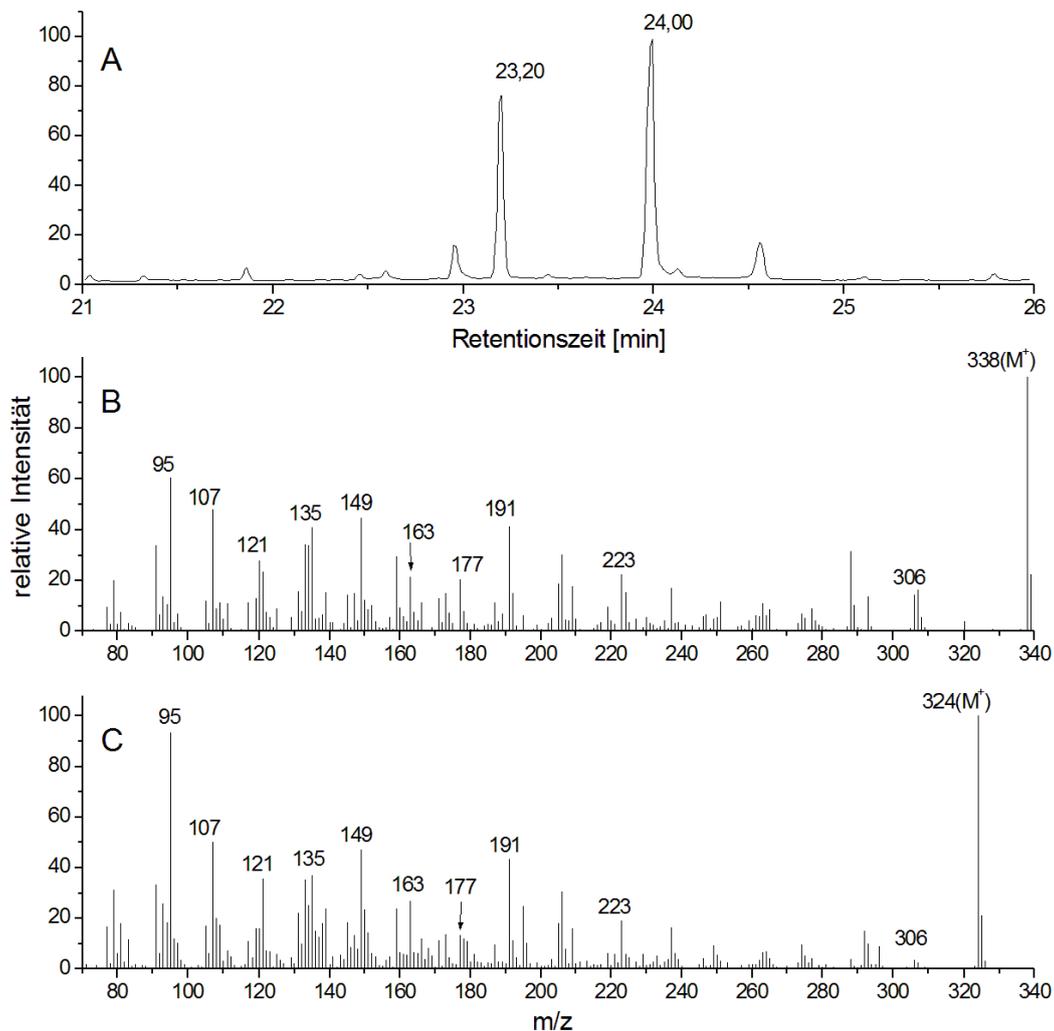


Abbildung 3.8.: GC-MS-Chromatogramm (TIC) von HPLC-Peak A3 der oxidativen Umsetzung von 8,10-FFA mit Wi-RLM nach Methylierung mit TMSH (A), Peak RT = 23,20 min und Peak RT = 24,00 min sind als Produkte von 8,10-FFA nachweisbar; Massenspektrum von RT = 23,20 min (B), Molekülion  $m/z = 338$ ; Massenspektrum von RT = 24,00 min (C), Molekülion  $m/z = 324$ ; EI-Ionisierung, IE = 70 eV; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

Wie bei der GC-MS-Analyse von HPLC-Peak A2 sind auch bei HPLC-Peak A3 (Abb. 3.1) nach Methylierung im GC-MS-Chromatogramm zwei Peaks zu detektieren (Abb. 3.8 (A)), welche die Molekülionen  $m/z = 338$  (RT = 23,20 min, Abb. 3.8 (B)) und  $m/z = 324$  (RT = 24,00 min, Abb. 3.8 (C)) aufweisen. Es handelt sich hier demnach ebenfalls um

### 3. Ergebnisse

ein einfach an der Alkylkette hydroxyliertes Produkt von 8,10-FFA. Die Derivatisierung verläuft, wie für HPLC-Peak A2 beschrieben, nicht vollständig (Abb. 3.9). Aufgrund des gebildeten Fragments  $m/z = 223$  ist auch hier die Aussage möglich, dass die Hydroxygruppe an der Alkylkette lokalisiert ist. Ebenso ist dieses Fragment in Verbindung mit der Tatsache, dass die Intensität des Fragments  $m/z = 177$  geringer ist, ein möglicher Hinweis darauf, dass die Hydroxygruppe hier im Vergleich zu A2 zum Alkylende hin verschoben sein könnte. Die daraus resultierende veränderte Position der Doppelbindung nach induktiver Methanolabsplattung führt zu einer veränderten Fragmentierung. Die genaue Position der Hydroxygruppe ist auch bei A3 nicht zu bestimmen.

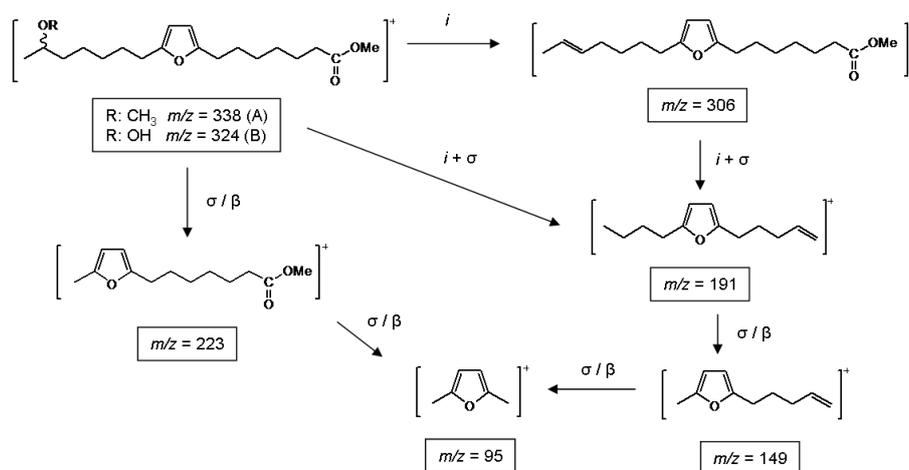


Abbildung 3.9.: Strukturvorschlag und Fragmentierungsschema für den oxidativen Metaboliten von 8,10-FFA aus HPLC-Peak A3 nach Methylierung mit TMSH; R = CH<sub>3</sub>: vollständig methyliert, Molekülion  $m/z = 338$  (RT = 23,20 min); R = H: eine freie Hydroxygruppe, Molekülion  $m/z = 324$  (RT = 24,00 min); EI-Ionisierung, IE = 70 eV

Um eine vollständige Derivatisierung zu erreichen wird von den HPLC-Peaks A2 und A3 zusätzlich eine GC-MS-Analyse nach Silylierung mit BSTFA durchgeführt. In den GC-MS-Chromatogrammen von HPLC-Peak A2 (Abb. 3.10 (A)) und A3 (Abb. 3.11 (A)) ist wie erwartet jeweils ein Produktpeak nachweisbar, welcher der Muttersubstanz zugeordnet werden kann. Beide weisen das Molekülion  $m/z = 464$  auf (Abb. 3.10 (B) und Abb. 3.11 (B)), was dem Masse-Ladungs-Verhältnis einer einfach hydroxylierten 8,10-FFA nach Silylierung entspricht. Durch Abspaltung des Trimethylsilylrests wird bei beiden das Fragment  $m/z = 364$  gebildet. Die weiteren Fragmente stimmen weitestgehend mit denen für HPLC-Peak A2 (Abb. 3.6) und A3 (Abb. 3.9) nach Methylierung dargestellten überein. Demnach liegen in A2 und A3 zwei einfach am Alkylrest hydroxylierte Metaboliten von 8,10-FFA vor, die sich in der Position der Hydroxygruppe unterscheiden.

### 3. Ergebnisse

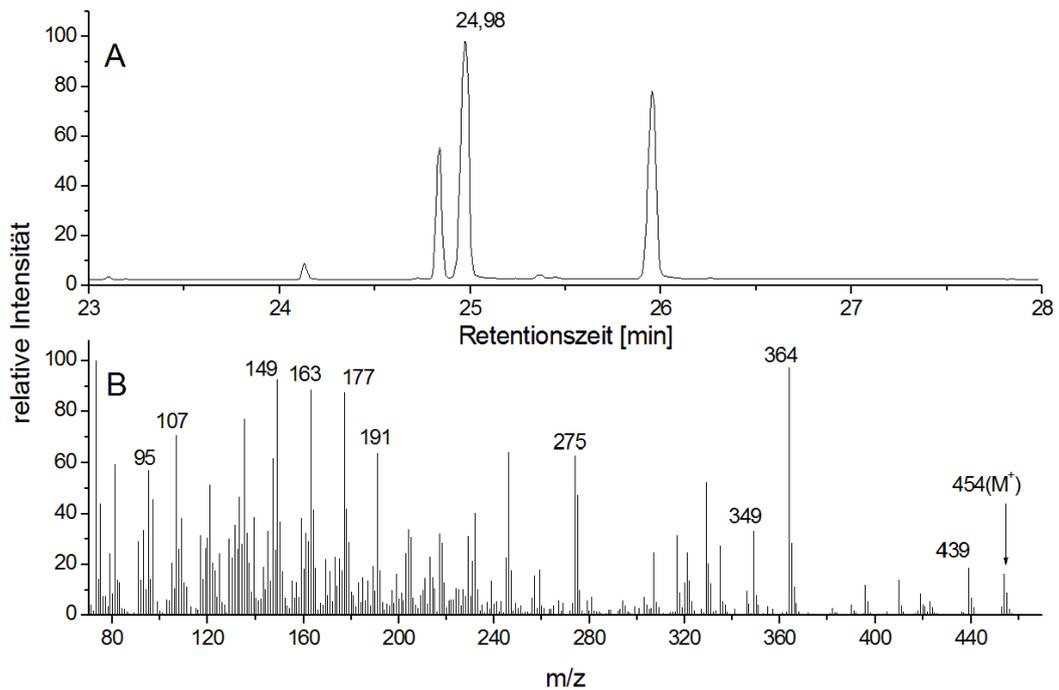


Abbildung 3.10.: GC-MS-Chromatogramm (TIC) von HPLC-Peak A2 der oxidativen Umsetzung von 8,10-FFA mit Wi-RLM nach Silylierung mit BSTFA (A), Peak RT =24,98 min ist als Produkt von 8,10-FFA nachweisbar; Massenspektrum von RT =24,98 min (B), Molekülion  $m/z = 454$ ; EI-Ionisierung, IE = 70 eV; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

### 3. Ergebnisse

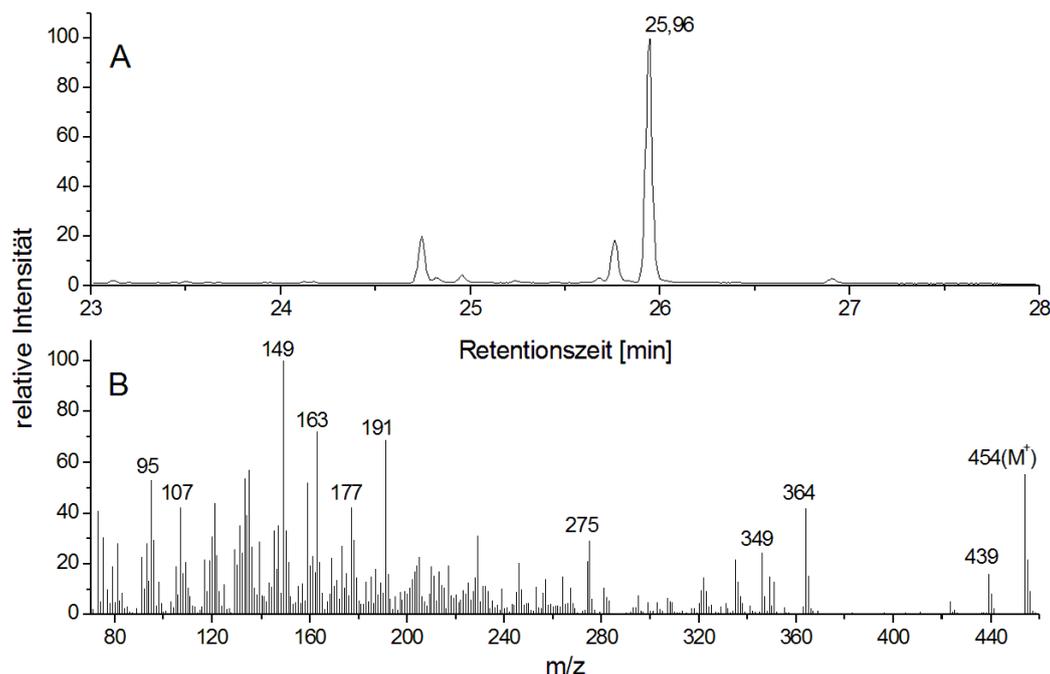


Abbildung 3.11.: GC-MS-Chromatogramm (TIC) von HPLC-Peak A3 der oxidativen Umsetzung von 8,10-FFA mit Wi-RLM nach Silylierung mit BSTFA (A), Peak RT = 25,96 min ist als Produkt von 8,10-FFA nachweisbar; Massenspektrum von RT = 25,96 min (B), Molekülion  $m/z = 454$ ; EI-Ionisierung, IE = 70 eV; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

Bei der GC-MS-Analyse des HPLC-Peaks A6 (Abb. 3.1) ist, unabhängig von der Derivatisierungsmethode, keine Zuordnung eines Produkts von 8,10-FFA und somit keine Aufklärung der Struktur der gebildeten Verbindung möglich.

Das GC-MS-Chromatogramm von HPLC-Peak A8 (Abb. 3.1) zeigt nach Methylierung zwei Peaks, die Produkten von 8,10-FFA zuzuordnen sind (Abb. 3.12 (A)). Der Peak bei RT = 21,87 min weist ein Molekülion von  $m/z = 338$  auf (Abb. 3.12 (B)). Demzufolge handelt es sich um einen einfach hydroxyliertes Produkt von 8,10-FFA. Aufgrund des stabilen Basisions von  $m/z = 253$ , das durch Abspaltung des Alkylrests gebildet wird, muss die Hydroxylierungsposition am intakten Furanring liegen (3.14 (A)). Der Peak bei RT = 22,92 min besitzt ein Molekülion von  $m/z = 324$  (Abb. 3.12 (C)). Dies ist hier jedoch nicht auf unvollständige Methylierung zurückzuführen, wie bei der GC-MS-Analyse von A2 und A3. Hydroxygruppen an aromatischen Systemen werden vollständig durch TMSH methyliert. Durch Keto-Enol-Tautomerie liegt hier jedoch zusätzlich die Ketoform der Verbindung aus Abbildung 3.14 (A) vor (Abb. 3.14 (B)). Da die Ketogruppe nicht derivatisiert werden kann ergibt sich für die Ketoform die Ketoverbindung das Molekülion  $m/z = 324$ . Das Basision  $m/z = 207$  entsteht dabei durch Abspaltung des Alkylrests und des Methylrests

### 3. Ergebnisse

des FSME. Das Fragment  $m/z = 177$  ist ein Hinweis darauf, dass sich die Hydroxygruppe an der  $\beta_2$ -Position des Furanrings befindet.

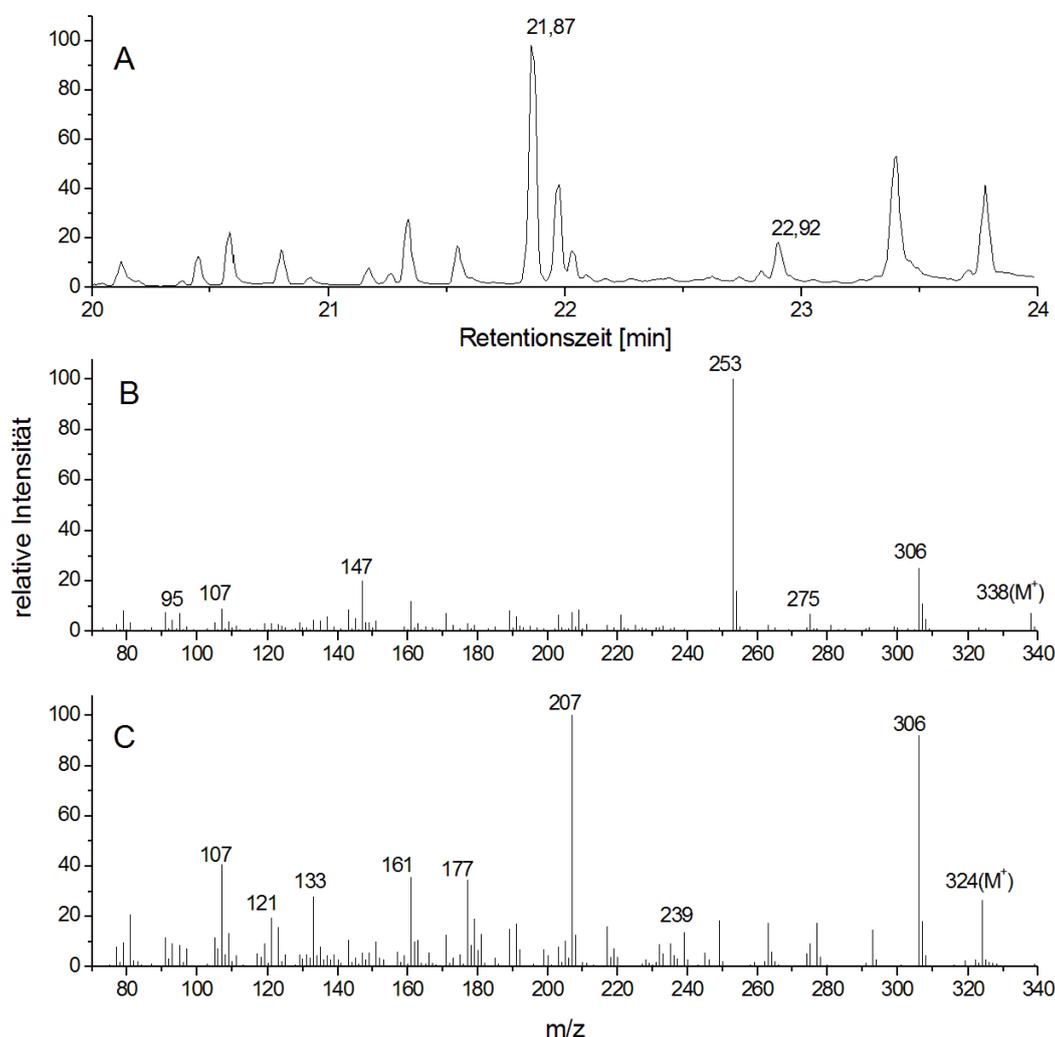


Abbildung 3.12.: GC-MS-Chromatogramm (TIC) von HPLC-Peak A8 der oxidativen Umsetzung von 8,10-FFA mit Wi-RLM nach Methylierung mit TMSH (A), Peak RT = 21,87 min und Peak RT = 22,92 min sind als Produkte von 8,10-FFA nachweisbar; Massenspektrum von RT = 21,87 min (B), Molekülion  $m/z = 338$ ; Massenspektrum von RT = 22,92 min (C), Molekülion  $m/z = 324$ ; EI-Ionisierung, IE = 70 eV; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

Die beiden Produktpeaks von 8,10-FFA mit RT = 21,83 min und RT = 22,93 min im GC-MS-Chromatogramm (Abb. 3.13 (A)) von HPLC-Peak A9 (Abb. 3.1) weisen ebenfalls die Molekülionen  $m/z = 338$  und  $m/z = 324$  auf. Die Basisionen besitzen hier jedoch ein Masse-Ladungs-Verhältnis von  $m/z = 209$  (Abb. 3.13 (B)) bzw.  $m/z = 195$  (Abb. 3.13 (C)). Demzufolge handelt es sich ebenfalls um ein am Furanring hydroxyliertes

### 3. Ergebnisse

Produkt von 8,10-FFA (Abb. 3.14 (C)) und seine entsprechende Ketoform (Abb. 3.14 (D)). Die Hydroxylierungsposition liegt hier jedoch an der  $\beta_1$ -Position des Furanrings. Dies kann durch das Fragment  $m/z = 205$ , das aus der Ketoform entsteht, bekräftigt werden.

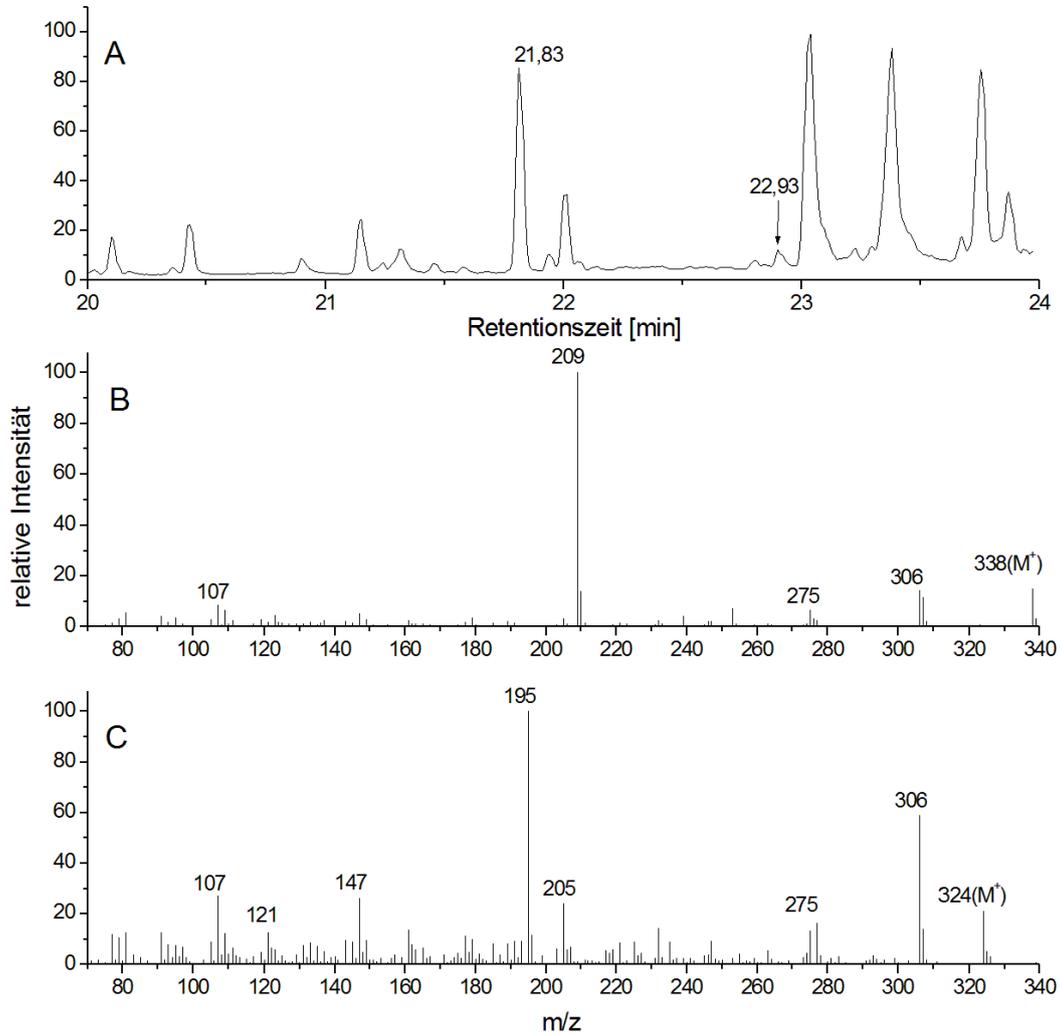


Abbildung 3.13.: GC-MS-Chromatogramm (TIC) von HPLC-Peak A9 der oxidativen Umsetzung von 8,10-FFA mit Wi-RLM nach Methylierung mit TMSH (A), Peak RT = 21,83 min und Peak RT = 22,93 min sind als Produkte von 8,10-FFA nachweisbar; Massenspektrum von RT = 21,83 min (B), Molekülion  $m/z = 338$ ; Massenspektrum von RT = 22,93 min (C), Molekülion  $m/z = 324$ ; EI-Ionisierung, IE = 70 eV; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

### 3. Ergebnisse

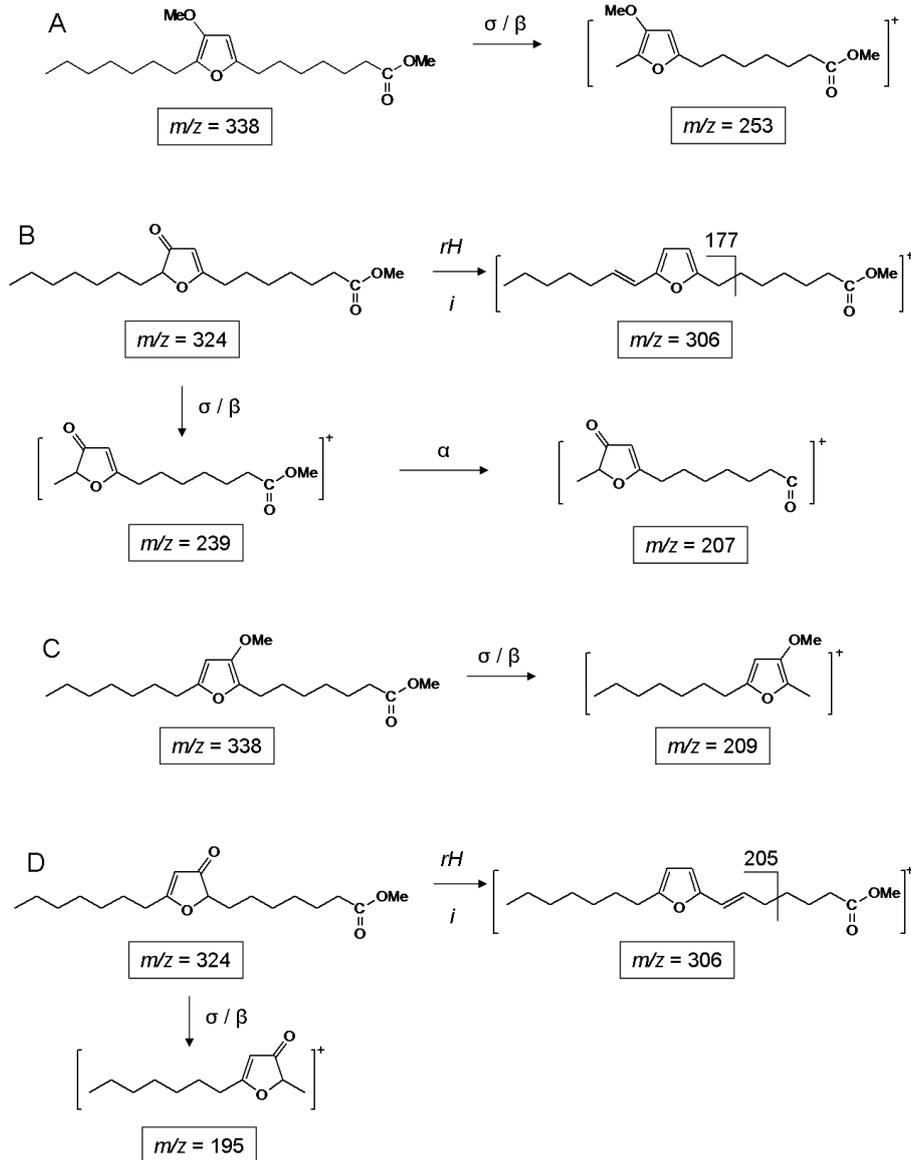


Abbildung 3.14.: Strukturen und Fragmentierungsschemata für die Produkte von 8,10-FFA aus HPLC-Peak A8: Enolverbindung (A), Molekülion  $m/z = 338$  (RT = 21,87 min); Ketoverbindung (B), Molekülion  $m/z = 324$  (RT = 22,92 min); und aus HPLC-Peak A9: Enolverbindung (C), Molekülion  $m/z = 338$  (RT = 21,83 min); Ketoverbindung (D), Molekülion  $m/z = 324$  (RT = 22,93 min) nach Methylierung mit TMSH; EI-Ionisierung, IE = 70 eV

Da mit Hilfe der Re-Analysen von A8 und A9 (s. A.1.6, Abb. A.8 (A) und (B)) gezeigt werden kann, dass in den HPLC-Fraktionen tatsächlich nur eine Substanz vorliegt, ist anzunehmen, dass 8,10-FFA durch oxidative Umsetzung mit RLM am Furanring epoxidiert wird. Die Epoxide, die unter den HPLC-Bedingungen stabil zu sein scheinen, reagieren

### 3. Ergebnisse

unter Temperatureinwirkung im Injektor der GC-MS zu einfach am Furanring hydroxylierten Reaktionsprodukten, bzw. zu deren Ketoverbindungen. Die Derivatisierung mit TMSH findet ebenfalls unter Temperatureinwirkung direkt im Injektor der GC-MS statt.

Um diese Annahme zu bestätigen wurde eine chemo-enzymatische Epoxidierung von 8,10-FFA durchgeführt (s. 6.2.3.1). Der Reaktionsansatz wurde anschließend mittels HPLC-DAD fraktioniert und die gebildeten Produkte mittels GC-MS nach Methylierung mit TMSH analysiert.

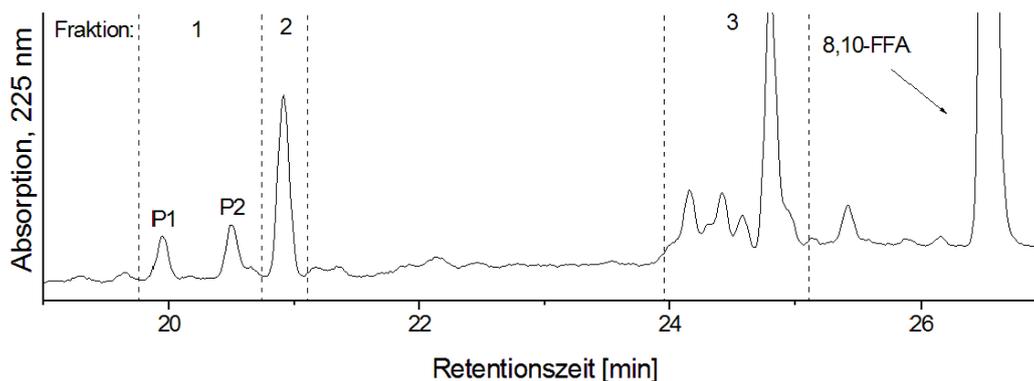


Abbildung 3.15.: HPLC-DAD-Chromatogramm der chemo-enzymatischen Epoxidierung von 8,10-FFA, Fraktionen 1 bis 3 werden mittels GC-MS analysiert; HPLC-DAD-Bedingungen s. 6.2.1.1; P1 und P2 sind Epoxidierungsprodukte von 8,10-FFA

Das Elutionsprofil des Epoxidierungsansatzes von 8,10-FFA zeigt mehrere Produktpeaks (Abb. 3.15). Aufgrund der Retentionszeiten von 19,8 min und 20,4 min besteht die Annahme, dass es sich bei den Produktpeaks P1 und P2 in Fraktion 1 um die analogen Peaks zu A8 und A9 (Abb. 3.1) aus der oxidativen Umsetzung von 8,10-FFA handelt. Die GC-MS-Analyse nach Methylierung zeigt einen 8,10 FFA zuzuordnenden Produktpeak bei  $RT = 20,91$  min (Abb. 3.16). Dieser weist ein Molekülion mit  $m/z = 338$  auf. Es handelt sich hierbei um einen Doppelpeak, in dem sowohl ein Massenspektrum mit dem Basision  $m/z = 209$ , wie auch mit dem Basision  $m/z = 253$  nachweisbar ist. Dabei dominiert die Substanz mit dem Basision  $m/z = 209$ , was damit zu begründen ist, dass in der gesammelten Fraktion 1 nach Re-Analyse mittels HPLC P2 in größeren Mengen detektierbar ist (s. A.1.6, Abb. A.8 (G)). Es stimmen sowohl die Retentionszeiten bei der HPLC-Analyse von P1 und P2, wie auch die Massenspektren und Strukturen mit denen für die Enolverbindungen aus A8 und A9 (Abb. 3.13 (A) und (B)) überein.

### 3. Ergebnisse

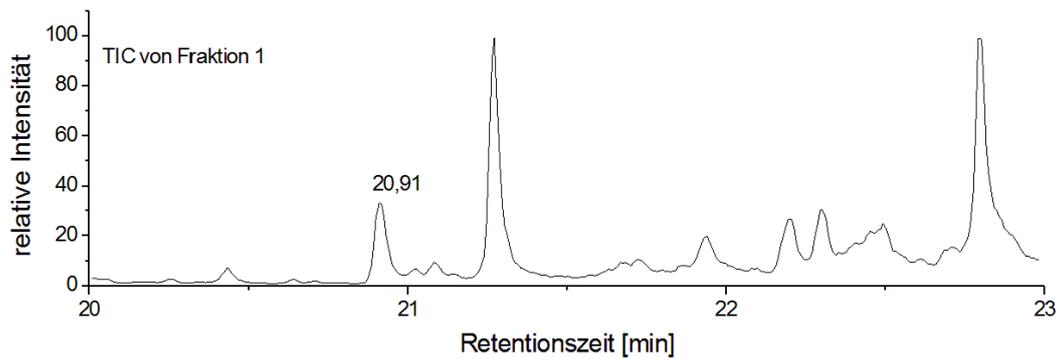


Abbildung 3.16.: GC-MS-Chromatogramm (TIC) von HPLC-Fraktion 1 der chemoenzymatischen Epoxidierung von 8,10-FFA nach Methylierung mit TMSH; Peak RT = 20,91 min (Molekülion  $m/z = 338$ ) ist als Produktpeak von 8,10-FFA nachweisbar; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

Die Ketoverbindungen sind nicht detektierbar, da diese nur zu geringen Anteilen aus den Enolverbindungen gebildet werden und hier nur geringe Mengen der Epoxidierungsprodukte vorliegen. Daher liegt die Menge der Ketoverbindungen vermutlich unterhalb der Nachweisgrenze.

In Fraktion 2 sind keine aus 8,10-FFA gebildeten Produkte nachweisbar. In Fraktion 3 sind nach Methylierung in der GC-MS-Analyse ungesättigte 8,10-FFAs (Molekülion  $m/z = 306$ ) mit den Basisionen  $m/z = 177$  (Abb. 3.18 (B)) und  $m/z = 205$  (Abb. 3.18 (C)) in den Peaks mit RT = 20,98 min und RT = 21,04 min (Abb. 3.18 (A)) nachweisbar. Diese entstehen aus Dioxoenfettsäuren, die durch Oxidation aus 8,10-FFA gebildet werden, welche in der GC-MS unter Temperatureinwirkung recyclisieren (Abb. 3.17). Die Strukturen und Bildung der charakteristischen Fragmente sind für RT = 20,98 min in Abbildung 3.19 (A) und für RT = 21,04 min in Abbildung 3.19 (B) dargestellt.

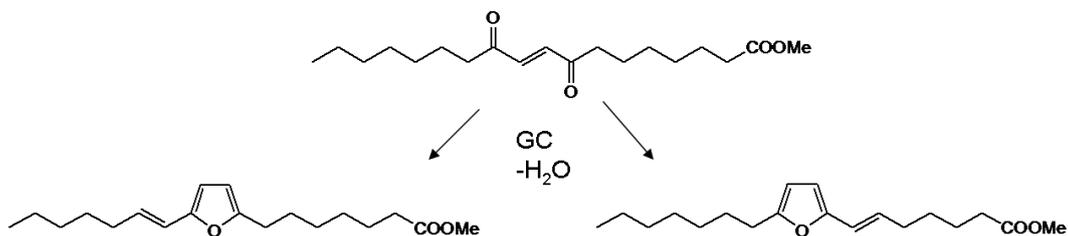


Abbildung 3.17.: Entstehung von ungesättigten 8,10-FFAs durch Recyclisierung der Dioxoenfettsäure in der GC-MS-Analyse

### 3. Ergebnisse

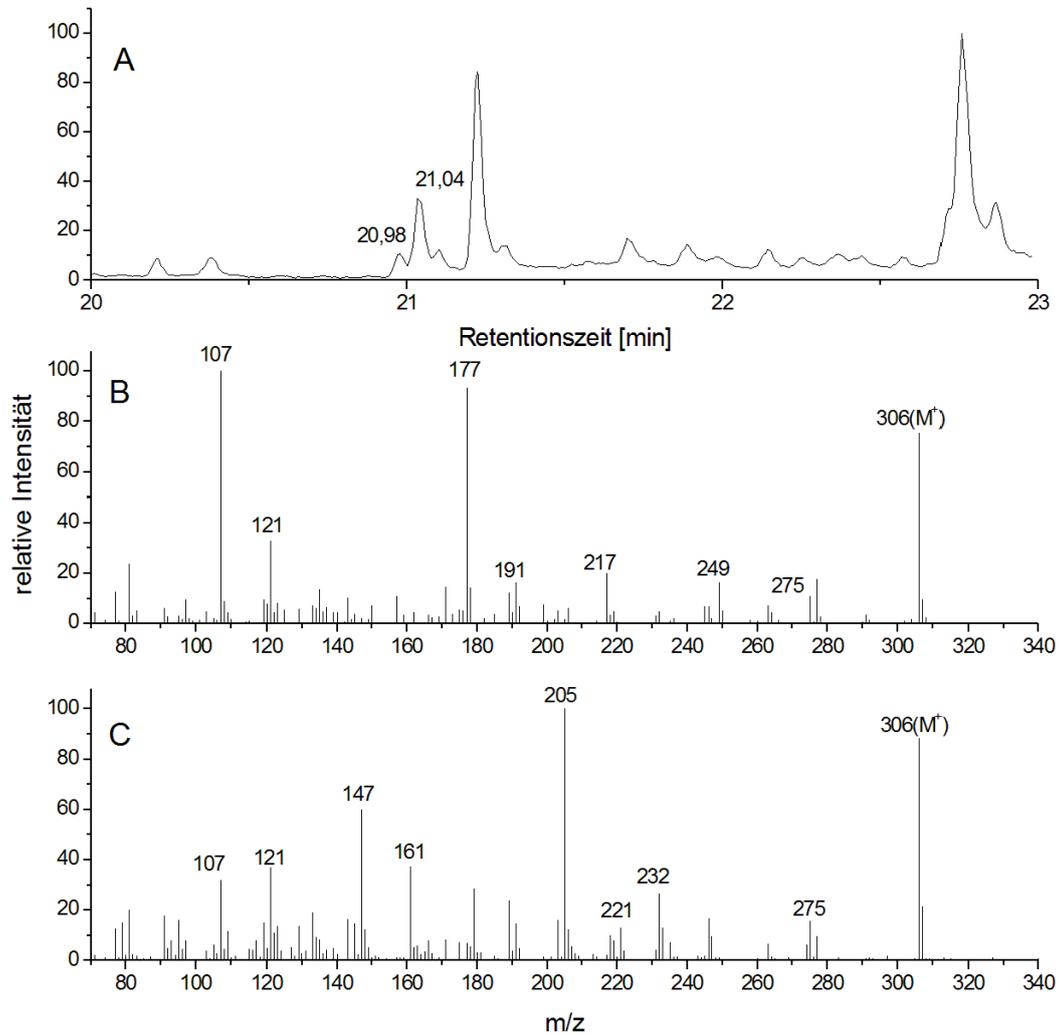


Abbildung 3.18.: GC-MS-Chromatogramm (TIC) von HPLC-Fraktion 3 der chemoenzymatischen Epoxidierung von 8,10-FFA nach Methylierung mit TMSH (A); Peak RT = 20,98 min und Peak RT = 21,04 min sind als Produkte von 8,10-FFA nachweisbar; Massenspektrum von RT = 20,98 min (B), Molekülion  $m/z = 306$ ; Massenspektrum von RT = 21,04 min (C), Molekülion  $m/z = 306$ ; EI-Ionisierung, IE = 70 eV; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

### 3. Ergebnisse

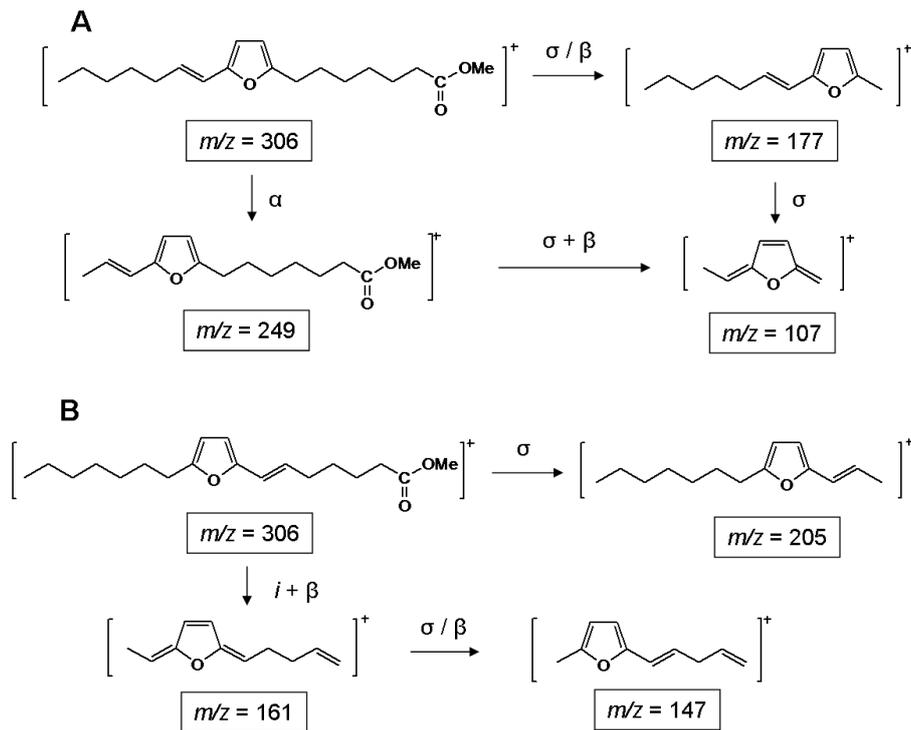


Abbildung 3.19.: Strukturen und spezifische Fragmente der ungesättigten 8,10-FFAs von RT = 20,98 min (A; 12,13-ungesättigte 8,10-FFA) und RT = 21,04 min (B; 6,7-ungesättigte 8,10-FFA) aus HPLC-Fraktion 3 der chemo-enzymatischen Epoxidierung von 8,10-FFA nach Methylierung mit TMSH; EI-Ionisierung, IE = 70 eV

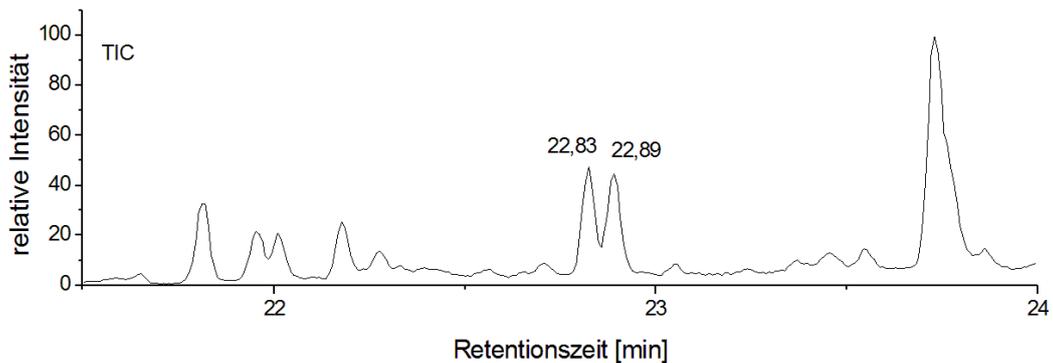


Abbildung 3.20.: GC-MS-Chromatogramm (TIC) der chemo-enzymatischen Dioxoendstellung aus 8,10-FFA nach Methylierung mit TMSH; Peak RT = 22,83 min (Molekülion  $m/z = 306$ ) und Peak RT = 22,89 min (Molekülion  $m/z = 306$ ) sind als Produkte von 8,10-FFA nachweisbar; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

### 3. Ergebnisse

Um zu zeigen, dass es sich bei den am Furanring hydroxylierten 8,10-FFAs und nicht bei den Dioxoenfettsäuren um die Reaktionsprodukte der Epoxidierung handelt, wurde zusätzlich eine chemo-enzymatische Darstellung der Dioxoenfettsäuren aus 8,10-FFA durchgeführt (s. 6.2.3.2). Bei dieser Methode dient das Hydroperoxid von C 18:2 als Cosubstrat. Die Reaktion verläuft über einen radikalischen Mechanismus, bei dem kein Epoxid gebildet wird. In der GC-MS-Analyse des Reaktionsansatzes sind nach Methylierung zwei Peaks zu detektieren, deren Massenspektren mit denen in Abbildung 3.19 (A) und (B) dargestellten übereinstimmen. Demnach stellen die am Furanring hydroxylierten 8,10-FFAs die in der GC-MS nachweisbaren Epoxidierungsprodukte dar.

Da nach chemo-enzymatischer Epoxidierung von 8,10-FFA mittels GC-MS die selben Reaktionsprodukte wie in den HPLC-Peaks A8 und A9 der oxidativen Umsetzung von 8,10-FFA nachgewiesen werden können, ist die Aussage möglich, dass aus 8,10-FFA Epoxide als oxidative Metaboliten entstehen. Diese Epoxide sind mittels GC-MS nicht direkt nachweisbar. Als Reaktionsprodukte entstehen am Furanring einfach hydroxylierte FFAs, die durch Keto-Enol-Tautomerie teilweise in ihrer Ketoform vorliegen (Abb. 3.21). Die Bildung der Dioxoenfettsäuren findet durch oxidative Umsetzung mit RLM im Gegensatz zur chemo-enzymatischen Epoxidierung nicht statt.

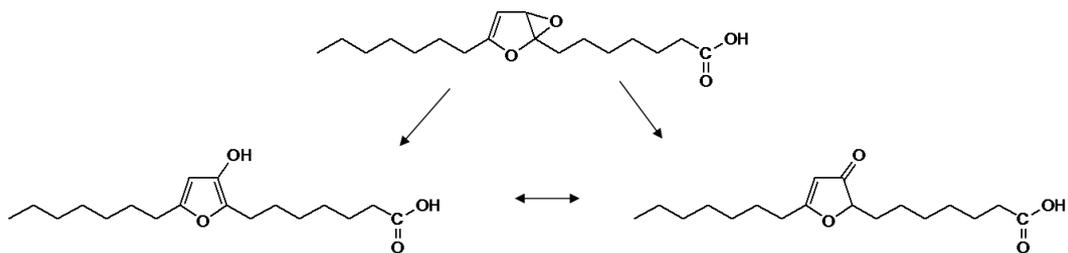
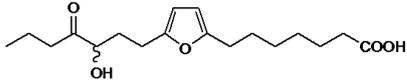
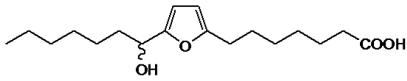
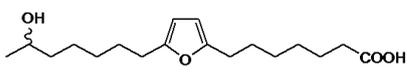
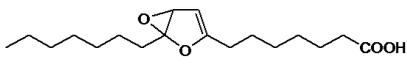
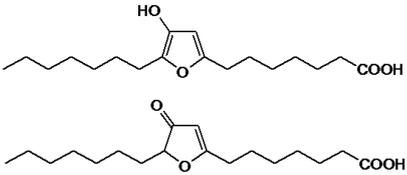
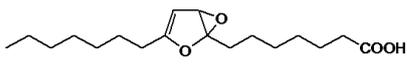
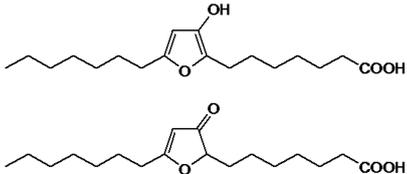


Abbildung 3.21.: Bildung der mittels GC-MS nachweisbaren Reaktionsprodukte aus einem Epoxid von 8,10-FFA

### 3. Ergebnisse

Die durch oxidative Metabolisierung in RLM männlicher Wi-Ratten entstehenden Metaboliten aus 8,10-FFA bzw. deren in der GC-MS nachweisbaren Reaktionsprodukte sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1.: Strukturvorschläge für oxidative Metaboliten und Reaktionsprodukte von 8,10-FFA aus den HPLC-Peaks A1, A2, A3, A6, A8 und A9

HPLC-Peak	oxidativer Metabolit	Reaktionsprodukt aus GC-MS-Analyse
A1		
A2		
A3		
A6	nicht identifiziert	
A8		
A9		

Abschließend wurde der Einfluss verschiedener RLM auf die gebildeten Produkte der oxidativen Umsetzung von 8,10-FFA betrachtet. Dazu wurden RLM unbehandelter und mit Aroclor 1254 behandelter männlicher Wi-Ratten verwendet. Die Behandlung der Ratten mit Aroclor hat eine Induktion von CYPs zur Folge. Da nicht alle Isoenzyme der CYP-Familie in gleichem Maß induziert werden, kann es zu einer veränderten oxidativen Metabolisierung kommen.

Das HPLC-Chromatogramm der oxidativen Umsetzung von 8,10-FFA mit induzierten Wi-RLM zeigt (Abb. 3.22), das im Vergleich zur Inkubation mit nicht induzierten Wi-RLM

### 3. Ergebnisse

(Abb. 3.1) weitere Peaks detektiert werden können. Die Bildung des Peak A6 geht dabei zurück. Des Weiteren hat die Induktion der CYPs zur Folge, dass der Umsatz von 8,10-FFA mit induzierten RLM von 39% auf 65% ansteigt. Die Übereinstimmung der bei beiden Umsetzungen gebildeten Peaks A1 bis A3, A6, A8 und A9 kann mittels Cochromatographie bestätigt werden.

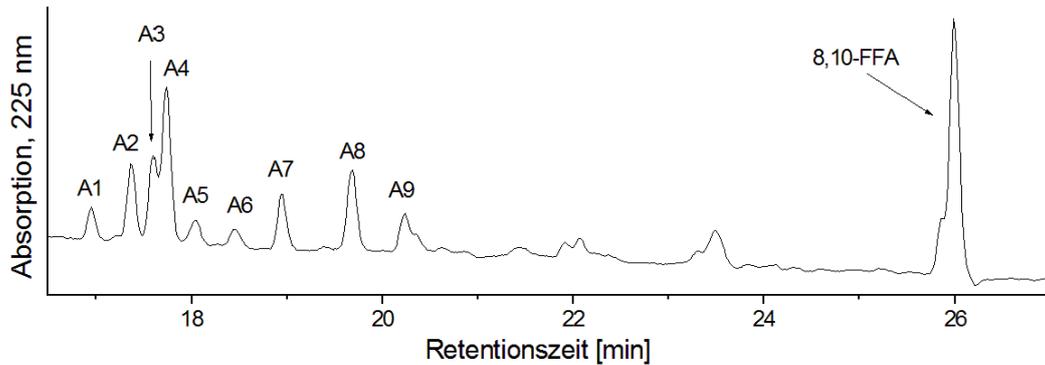


Abbildung 3.22.: HPLC-DAD-Chromatogramm der oxidativen Umsetzung von 8,10-FFA mit RLM von mit Aroclor 1254 behandelten männlichen Wi-Ratten;  $c(\text{FFA}) = 100 \mu\text{M}$ ;  $t = 60 \text{ min}$ ;  $c(\text{Protein}) = 1 \text{ mg/ml}$ ; HPLC-DAD-Bedingungen s. 6.2.1.1

#### 3.1.1.2. 9,11-Furanfettsäure

Im HPLC-Chromatogramm der Umsetzung von 9,11-FFA mit nicht induzierten Wi-RLM sind gegenüber der Kontrolle zusätzlich die Peaks B1 bis B3, B6 bis B8 und B10 zu detektieren (Abb. 3.23). Das Elutionsprofil ist dabei mit dem von der Inkubation von 8,10-FFA mit nicht induzierten Wi-RLM vergleichbar (Abb. 3.1).

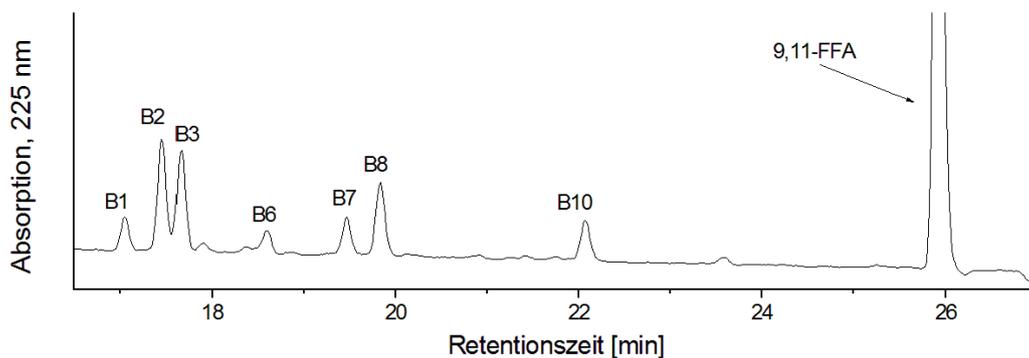


Abbildung 3.23.: HPLC-DAD-Chromatogramm der oxidativen Umsetzung von 9,11-FFA mit RLM männlicher Wi-Ratten;  $c(\text{FFA}) = 100 \mu\text{M}$ ;  $t = 60 \text{ min}$ ;  $c(\text{Protein}) = 1 \text{ mg/ml}$ ; HPLC-DAD-Bedingungen s. 6.2.1.1

### 3. Ergebnisse

Da 9,11-FFA gegenüber 8,10-FFA einen um eine Position in Richtung Alkylende verschobenen Furanring aufweist, sind die spezifischen Fragmente nach Abspaltung des Säurerests um 14 amu kleiner, nach Abspaltung des Alkylrests um 14 amu größer (Abb. 3.24).

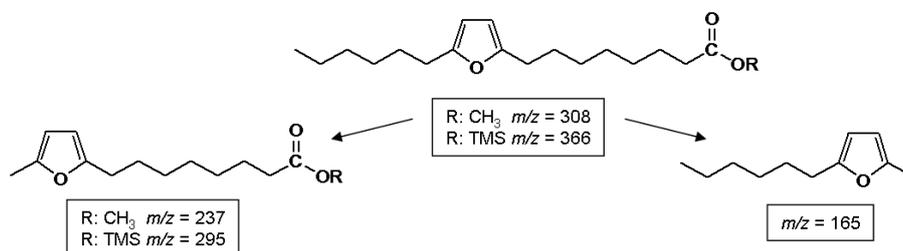


Abbildung 3.24.: Spezifische Fragmente von 9,11-FFA aus der GC-MS-Analyse nach Methylierung mit TMSH bzw. Silylierung mit BSTFA, EI-Ionisierung, IE = 70 eV

HPLC-Peak B1 (Abb. 3.23) aus der oxidativen Umsetzung von 9,11-FFA weist eine vergleichbare Retentionszeit wie HPLC-Peak A1 (s. 3.1.1.1, Abb. 3.1) von 8,10-FFA auf. Das GC-MS-Chromatogramm dieser Fraktion (s. A.1.5; Abb. A.1) zeigt nach Methylierung ebenfalls ein der Muttersubstanz zuzuordnendes Produkt (RT = 24,36 min) mit einem Molekülion von  $m/z = 352$  (Abb. 3.25). Es handelt sich dabei, wie in 3.1.1.1 für A1 beschrieben, um einen Metaboliten von 9,11-FFA, der eine Hydroxy- und eine Ketogruppe aufweist. Die Fragmentierung der Verbindung aus B1 (Abb. 3.25) ist ähnlich mit der des Produkts aus A1. Die veränderte Position des Furanrings von 9,11-FFA hat jedoch zur Folge, dass das Fragment  $m/z = 177$  hier das spezifische Fragment darstellt und dem entsprechend mit höherer Intensität nachgewiesen werden kann. Keto- und Hydroxygruppe sind hier ebenfalls am Alkylrest lokalisiert. Die Fragmente  $m/z = 163$  und  $m/z = 135$  sind ein Hinweis dafür, dass sich die Ketogruppe am Kohlenstoffatom C17 der Alkylkette befinden könnte. Die Hydroxygruppe ist benachbart zur Ketogruppe lokalisiert. Nur so ist eine vollständige Methylierung mit TMSH möglich. Eine entsprechende Verbindung nach unvollständiger Derivatisierung, mit freier Hydroxygruppe ist nicht nachweisbar.

Die GC-MS-Chromatogramme von HPLC-Peak B2 und HPLC-Peak B3 (Abb. 3.23) zeigen nach Methylierung jeweils zwei Peaks (s. A.1.5; Abb. A.2 (A), Abb. A.2 (C)), die aufgrund ihrer Fragmente 9,11-FFA als Produkte zuzuordnen sind. Wie bei der Analyse der entsprechenden HPLC-Peaks A2 und A3 (s. 3.1.1.1, Abb. 3.7 und Abb. 3.8) ist jeweils ein Produkt mit einem Molekülion  $m/z = 338$  (RT = 22,63 min (aus B2) und RT = 23,23 min (aus B3)) und  $m/z = 324$  (RT = 23,06 min (aus B2) und RT = 24,02 min (aus B3)) nachweisbar. Aufgrund vergleichbarer Massenspektren der jeweiligen Peaks aus einer HPLC-Fraktion handelt es sich bei den in B2 und B3 nachweisbaren Verbindungen um einfach hydroxylierte 9,11-FFAs. Die unterschiedlichen Molekülionen resultieren wie beschrieben (s. 3.1.1.1)

### 3. Ergebnisse

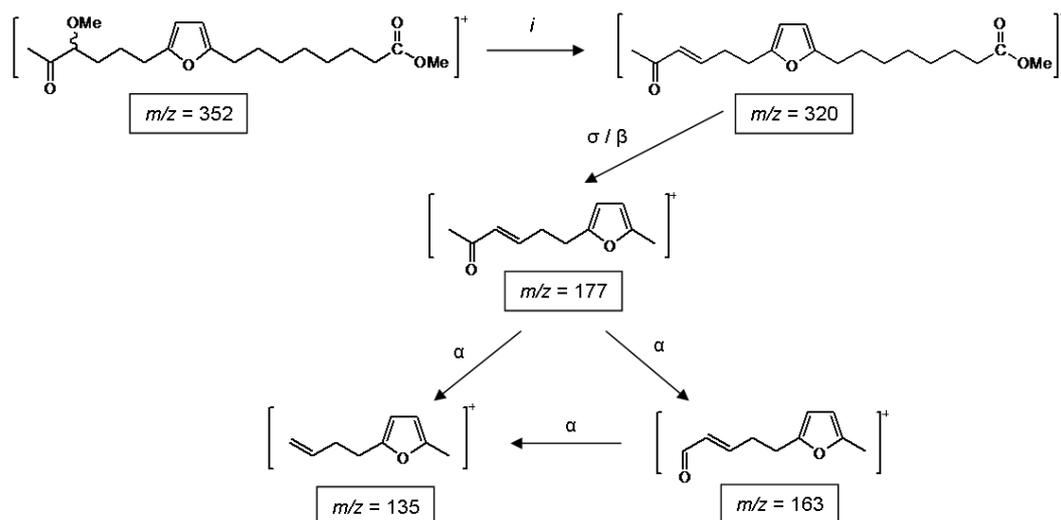


Abbildung 3.25.: Strukturvorschlag und Fragmentierungsschema für den oxidativen Metaboliten von 9,11-FFA aus HPLC-Peak B1, nach Methylierung mit TMSH; Molekülion  $m/z = 352$  (RT = 24,36 min), EI-Ionisierung, IE = 70 eV

aus der nicht vollständig ablaufenden Methylierung der aliphatischen Hydroxygruppe. Die wichtigsten Fragmente einer einfach hydroxylierten 9,11-FFA nach vollständiger Methylierung sind in Abbildung 3.26 dargestellt. Es lässt sich lediglich anhand des Fragments  $m/z = 163$  die Aussage treffen, dass die Hydroxygruppe sowohl bei B2 als auch bei B3 am Alkylrest lokalisiert ist. Die genaue Position dieser lässt sich weder für B2 noch B3 bestimmen.

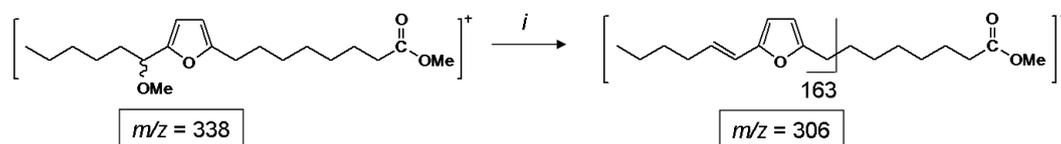


Abbildung 3.26.: Struktur und spezifische Fragmente für einen einfach an der Alkylkette hydroxylierten Metaboliten von 9,11-FFA nach vollständiger Methylierung aus HPLC-Peak B2 oder B3; Molekülion  $m/z = 338$ , EI-Ionisierung; IE = 70 eV

Mit einer zusätzlichen GC-MS-Analyse der HPLC-Peaks B2 und B3 nach Silylierung mit BSTFA kann bestätigt werden, dass diese Fraktionen jeweils nur einen aus 9,11-FFA gebildeten Metaboliten enthalten. Die Peaks mit RT = 24,91 min (s. A.1.5, Abb. A.2 (B)) und RT = 25,94 min (s. A.1.5, Abb. A.2 (D)) aus dieser Analyse weisen dementsprechend je ein Molekülion von  $m/z = 454$  auf, was dem Masse-Ladungs-Verhältnis einer einfach hydroxylierten 9,11-FFA nach Silylierung entspricht. Die gebildeten Fragmente entsprechen weitestgehend denen der GC-MS-Analyse von B2 und B3 nach Methylierung.

### 3. Ergebnisse

Demnach sind in den HPLC-Peaks B2 und B3 jeweils ein am Alkylrest einfach hydroxylierter Metabolit von 9,11-FFA nachweisbar, die sich in der Position der Hydroxygruppe unterscheiden.

Bei der GC-MS-Analyse des HPLC-Peaks B6 ist, unabhängig von der Derivatisierungsmethode, keine Zuordnung eines Produkts von 9,11-FFA und somit keine Aufklärung der Struktur der gebildeten Verbindung möglich.

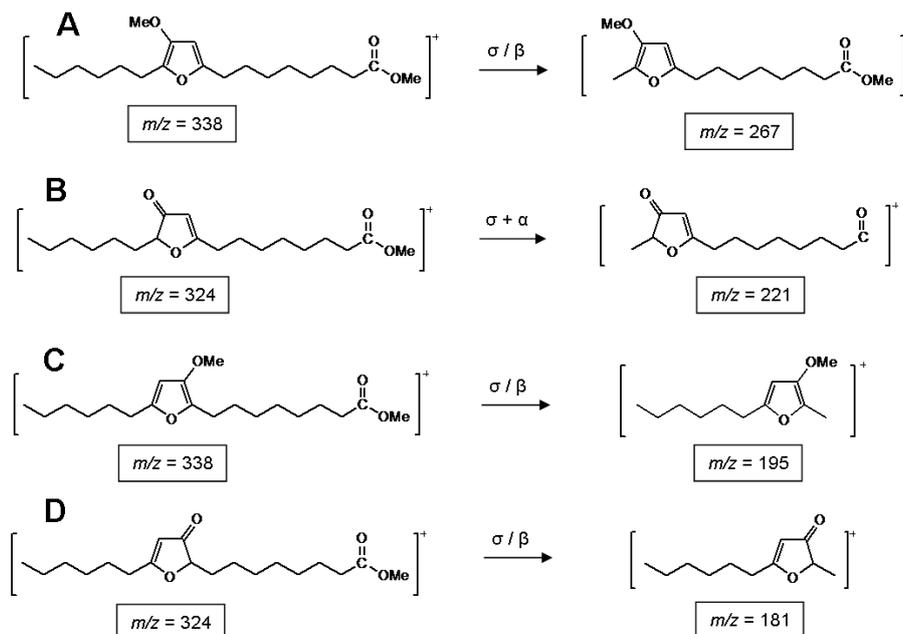


Abbildung 3.27.: Strukturen und Basisionen für die Produkte von 9,11-FFA aus HPLC-Peak B7: Enolverbindung (A), Molekülion  $m/z = 338$  (RT = 21,93 min); Ketoverbindung (B), Molekülion  $m/z = 324$  (RT = 22,96 min); und aus HPLC-Peak B8: Enolverbindung (C), Molekülion  $m/z = 338$  (RT = 21,86 min); Ketoverbindung (D), Molekülion  $m/z = 324$  (RT = 22,96 min); nach Methylierung mit TMSH; EI-Ionisierung, IE = 70 eV

In den GC-MS-Chromatogrammen von HPLC-Peak B7 und B8 (Abb. 3.23) sind nach Methylierung jeweils zwei Peaks detektierbar (s. A.1.5, Abb. A.3 (A) und (B)), die als Produkte aus der Muttersubstanz gebildet werden. Analog zur GC-MS-Analyse von A8 und A9 (s. 3.1.1.1) handelt es sich bei den Substanzen mit den Molekülionen  $m/z = 338$  (RT = 21,93 min (aus B7) und RT = 21,86 min (aus B8)) um einfach am Furanring hydroxylierte Produkte von 9,11-FFA. Die Substanzen mit den Molekülionen  $m/z = 324$  (RT = 22,96 min (aus B7) und RT = 22,96 min (aus B8)) sind die entsprechenden Ketoverbindungen. Die Verbindungen aus B7 und B8 unterscheiden sich hier wie in 3.1.1.1 ebenfalls durch Substituenten an unterschiedlichen  $\beta$ -Positionen am Furanring. Es handelt sich um

### 3. Ergebnisse

die Reaktionsprodukte der jeweiligen Epoxide von 9,11-FFA, die in der GC-MS-Analyse nachweisbar sind. Die gebildeten Basisionen aus B8 sind in Abbildung 3.27 (A) und (B) und aus B9 in Abbildung 3.27 (C) und (D) dargestellt.

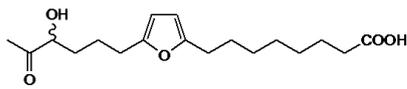
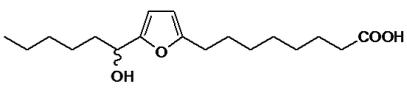
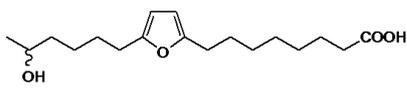
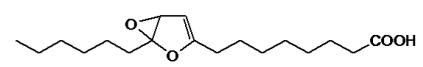
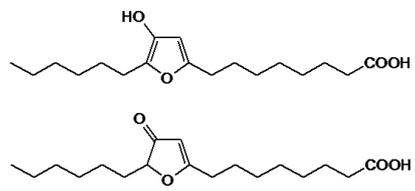
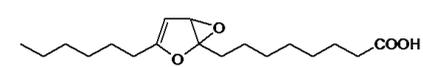
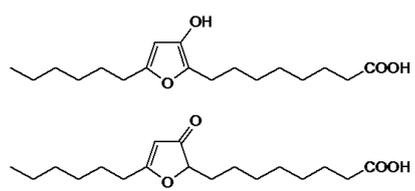
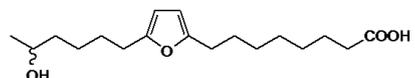
Die GC-MS-Analyse des HPLC-Peaks B10 (Abb. 3.23) nach Methylierung zeigt zwei Peaks (s. A.1.5, Abb. A.4 (A)) mit den Molekülionen  $m/z = 338$  und  $m/z = 324$ , die Produkte von 9,11-FFA darstellen. Beide Substanzen stimmen in ihren Fragmentierungsmustern (Abb. 3.26) und ihren Retentionszeiten mit denen in der GC-MS-Analyse von B3 nachgewiesenen Verbindungen überein (s. A.1.5, Abb. A.2 (C)). Wegen der abweichenden Retentionszeit in der HPLC-Analyse kann jedoch ausgeschlossen werden, dass die bei der oxidativen Umsetzung gebildeten Produkte identisch sind. Es wird hier ebenfalls in ergänzender Weise eine GC-MS-Analyse von B10 nach Silylierung mit BSTFA durchgeführt. Im GC-MS-Chromatogramm dieser Analyse (s. A.1.5, Abb. A.4 (B)) ist ein Peak nachweisbar, der wegen der gebildeten Fragmente der Muttersubstanz zugeordnet werden kann. Die Retentionszeit und das Molekülion von  $m/z = 424$  stimmen jedoch nicht mit dem Ergebnis der GC-MS-Analyse von B3 überein.

Zusätzlich ist dem detektierten Molekülion nach Silylierung keine sinnvolle Struktur eines oxidativen Metaboliten von 9,11-FFA zuzuordnen. Demnach muss es sich bei den in B10 nachgewiesenen Verbindungen sowohl nach Methylierung als auch nach Silylierung um Reaktionsprodukte handeln, die in der GC-MS gebildet werden. Eine Charakterisierung des Metaboliten von 9,11-FFA aus B10 ist somit mittels GC-MS nicht möglich.

### 3. Ergebnisse

Die nach oxidativer Umsetzung mit RLM unbehandelter männlicher Wi-Ratten gebildeten Metaboliten bzw. deren in der GC-MS nachweisbaren Reaktionsprodukte sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2.: Strukturvorschläge für oxidative Metaboliten und Reaktionsprodukte von 9,11-FFA aus den HPLC-Peaks B1, B2, B3, B6, B7, B8 und B10

HPLC-Peak	oxidativer Metabolit	Reaktionsprodukt aus GC-MS-Analyse
B1		
B2		
B3		
B6	nicht identifiziert	
B7		
B8		
B10	nicht identifiziert	 nicht identifiziert

Wie bei 8,10-FFA wurde auch hier der Einfluss nicht induzierter und induzierter RLM auf die Bildung der Metaboliten untersucht. Im HPLC-Chromatogramm der oxidativen Umsetzung von 9,11-FFA mit Aroclor induzierten Wi-RLM (Abb. 3.28) ist zu sehen, dass im Vergleich zur Inkubation mit unbehandelten Wi-RLM (Abb. 3.23) weitere Peaks de-

### 3. Ergebnisse

tektiert werden können. Des Weiteren kommt es zu einer Umkehrung des Verhältnisses bei der gebildeten Menge der Peaks B7 und B8. Es handelt sich hierbei um die beiden Epoxide von 9,11-FFA (s. 3.1.1.2, Tab. 3.2). Außerdem hat die Induktion der CYPs eine Steigerung des Umsatzes von 9,11-FFA von 38% mit unbehandelten Mikrosomen auf 61% mit induzierten Mikrosomen zur Folge. Die Übereinstimmung der bei beiden Umsetzungen gebildeten Peaks B1 bis B3, B6 bis B8 und B10 kann mittels Cochromatographie bestätigt werden.

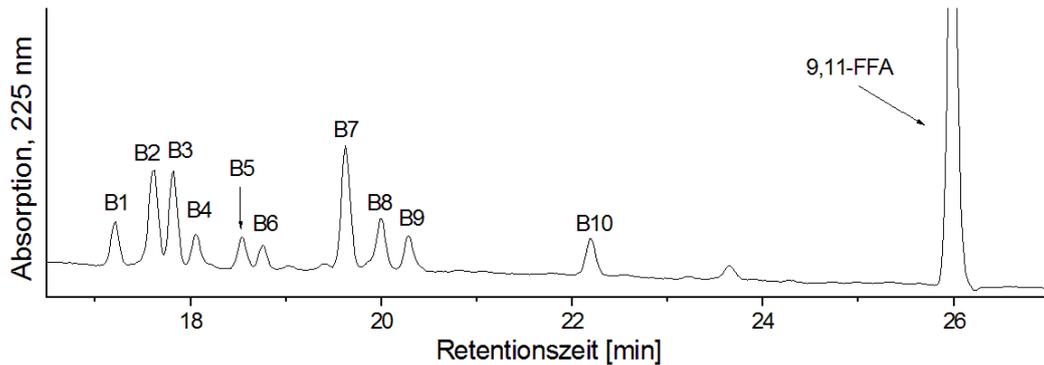


Abbildung 3.28.: HPLC-DAD-Chromatogramm der oxidativen Umsetzung von 9,11-FFA mit RLM von mit Aroclor 1254 behandelten Wi-Ratten;  $c(\text{FFA}) = 100 \mu\text{M}$ ;  $t = 60 \text{ min}$ ;  $c(\text{Protein}) = 1 \text{ mg/ml}$ ; HPLC-DAD-Bedingungen s. 6.2.1.1

#### 3.1.1.3. 10,12-Furanfettsäure

Das Elutionsprofil (Abb. 3.29) der oxidativen Umsetzung von 10,12-FFA mit RLM unbehandelter Wi-Ratten zeigt gegenüber der Kontrolle zusätzlich die Peaks C3, C5, C6 und

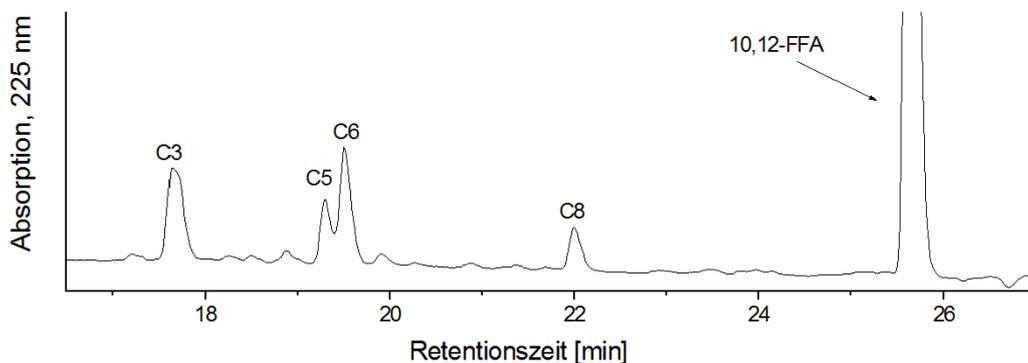


Abbildung 3.29.: HPLC-DAD-Chromatogramm der oxidativen Umsetzung von 10,12-FFA mit RLM von unbehandelten männlichen Wi-Ratten;  $c(\text{FFA}) = 100 \mu\text{M}$ ;  $t = 60 \text{ min}$ ;  $c(\text{Protein}) = 1 \text{ mg/ml}$ ; HPLC-DAD-Bedingungen s. 6.2.1.1

### 3. Ergebnisse

C8. Es ist hier eine geringere Anzahl an Peaks als bei den Inkubationen von 8,10- und 9,11-FFA zu detektieren.

Da der Furanring bei 10,12-FFA um eine weitere Position zum Alkylende hin verschoben ist, sind in der GC-MS-Analyse die in Abbildung 3.30 dargestellten spezifischen Fragmente nach Methylierung bzw. Silylierung nachweisbar.

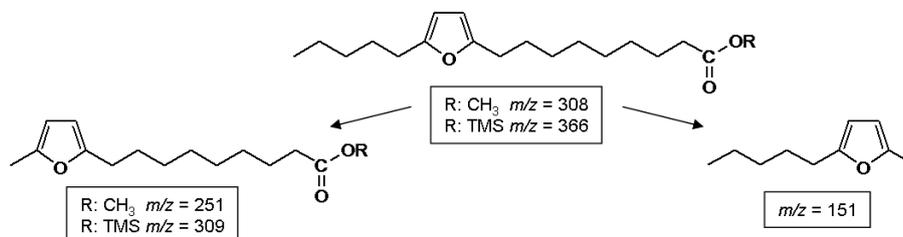


Abbildung 3.30.: Spezifische Fragmente von 10,12-FFA aus der GC-MS-Analyse nach Methylierung mit TMSH bzw. Silylierung mit BSTFA, EI-Ionisierung, IE = 70 eV

Im GC-MS-Chromatogramm von HPLC-Peak C3 (Abb. 3.29) sind nach Methylierung vier Peaks nachweisbar (s. A.1.5, Abb. A.5 (A)), die der Muttersubstanz zuzuordnen sind. Dabei weisen die Peaks mit RT = 22,65 min und RT = 23,26 min ein Molekülion von  $m/z = 338$ , die Peaks mit RT = 23,09 min und RT = 24,07 min ein Molekülion von  $m/z = 324$  auf. Wie bei den Analysen von A2, A3 (s. 3.1.1.1), B2 und B3 (s. 3.1.1.2), die in HPLC und GC-MS vergleichbare Retentionszeiten zeigen (Abb. 3.1 und Abb. 3.23), handelt es sich um einfach hydroxylierte Produkte von 10,12-FFA, bei denen die Methylierung mit TMSH nicht vollständig verläuft. Eine Auftrennung der beiden Produkte mittels HPLC, wie es bei den anderen FFAs möglich war, ist hier nicht möglich, weswegen es sich bei C3 um einen Doppelpeak handelt. Für die Metaboliten ist aufgrund des gebildeten Fragments  $m/z = 149$  (Abb. 3.31) die Aussage möglich, dass sich die Hydroxylierungspositionen am Alkylrest der 10,12-FFA befinden. Die genaue Bestimmung der Positionen der Hydroxygruppen ist auch hier nicht möglich. Die zusätzliche GC-MS-Analyse von C3 nach Silylierung mit BSTFA (s. A.1.5, Abb. A.5 (B)) bestätigt, dass in der Fraktion zwei

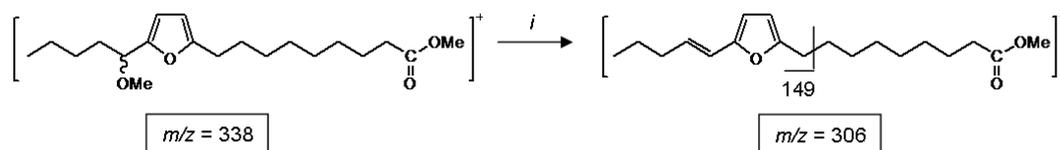


Abbildung 3.31.: Struktur und spezifische Fragmente für einen einfach an der Alkylkette hydroxylierten Metaboliten von 10,12-FFA nach vollständiger Methylierung aus HPLC-Peak C3; Molekülion  $m/z = 338$ , EI-Ionisierung; IE = 70eV

### 3. Ergebnisse

einfach an der Alkylkette hydroxylierte Metaboliten von 10,12-FFA vorliegen. Es sind hier zwei Peaks (RT = 25,02 min und RT = 26,04 min) mit den Molekülonen  $m/z = 454$  mit dem entsprechenden Fragmentierungsmuster zu detektieren.

In den GC-MS-Chromatogrammen der HPLC-Peaks C5 und C6 (Abb. 3.29) sind nach Methylierung jeweils zwei Peaks detektierbar (s. A.1.5, Abb. A.6 (A) und (B)), die der Muttersubstanz als Produkte zuzuordnen sind. Wie bei den Analysen von A8, A9 (s. 3.1.1.1), B7 und B8 (s. 3.1.1.2) handelt es sich um einfach am Furanring hydroxylierte Produkte von 10,12-FFA (RT = 22,12 min (aus C5) und RT = 21,94 min (aus C6), Molekülon  $m/z = 338$ ) und ihre entsprechenden Ketoverbindungen (RT = 23,00 min (aus C5) und RT = 23,04 min (aus C6), Molekülon  $m/z = 324$ ). Die gebildeten Basisionen aus C5 sind in Abbildung 3.32 (A) und (B) und aus C6 in Abbildung 3.32 (C) und (D) dargestellt. Es handelt sich auch hier, wie bei 8,10- (s. 3.1.1.1) und 9,11-FFA (s. 3.1.1.2) um Reaktionsprodukte von Epoxiden, die in der GC-MS-Analyse nachweisbar sind. Anhand dieser Verbindungen kann gezeigt werden, dass auch aus 10,12-FFA durch oxidative Metabolisierung Epoxide entstehen.

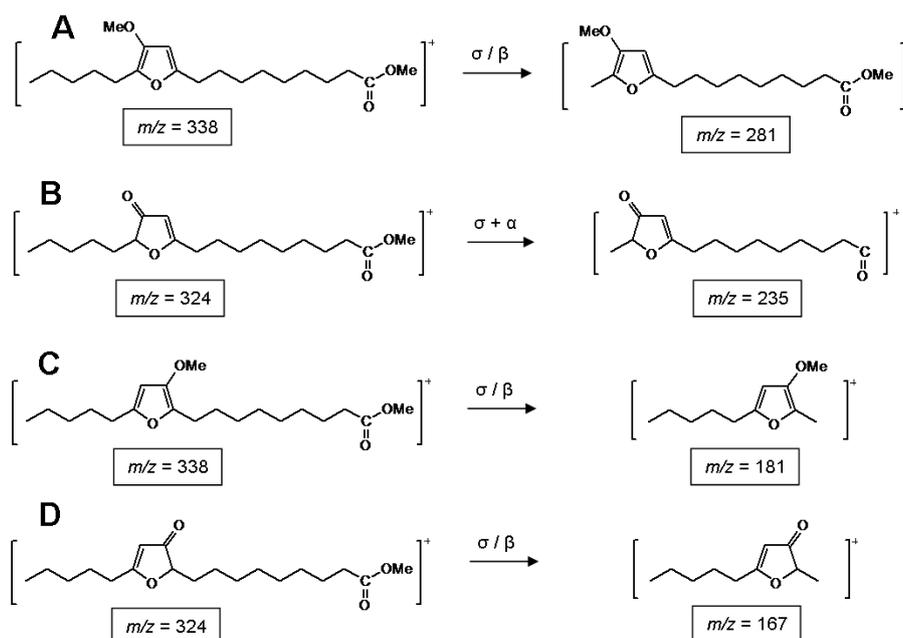
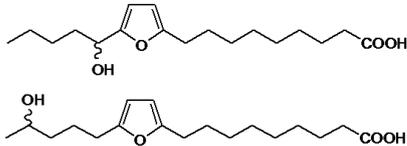
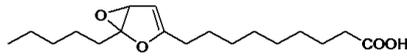
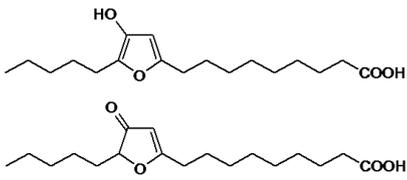
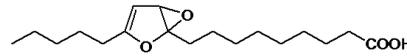
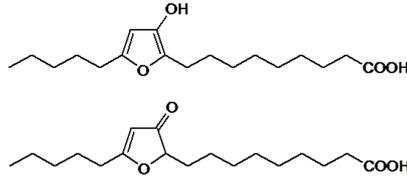
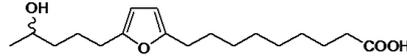


Abbildung 3.32.: Strukturen und Basisionen für die Produkte von 10,12-FFA aus HPLC-Peak C5: Enolverbindung (A), Molekülon  $m/z = 338$  (RT = 22,12 min); Ketoverbindung (B), Molekülon  $m/z = 324$  (RT = 23,00 min); und aus HPLC-Peak C6: Enolverbindung (C), Molekülon  $m/z = 338$  (RT = 21,94 min); Ketoverbindung (D), Molekülon  $m/z = 324$  (RT = 23,04 min) nach Methylierung mit TMSH; EI-Ionisierung, IE = 70 eV

### 3. Ergebnisse

Analog zur Analyse von Peak B10 (Abb. 3.23), der eine vergleichbare Retentionszeit wie Peak C8 (Abb. 3.29) aufweist, sind nach Methylierung im GC-MS-Chromatogramm von C8 zwei Substanzen mit den Molekülonen  $m/z = 338$  (RT = 23,24 min) und  $m/z = 324$  (RT = 24,04 min) nachweisbar (s. A.1.5, Abb. A.7 (A)). Diese stimmen sowohl in den Retentionszeiten wie auch in der Fragmentierung mit den Verbindungen mit RT = 23,26 min und RT = 24,07 min aus C3 überein (Abb. A.5 (A)). Nach Silylierung mit BSTFA ist wie bei B10 in der GC-MS eine der Muttersubstanz zuzuordnende Verbindung mit einem Molekülion  $m/z = 424$  (s. A.1.5, Abb. A.7 (B), RT = 26,94 min) zu detektieren. Da wegen der abweichenden Retentionszeit von C8 in der HPLC-Analyse nicht dieselbe Verbindung wie in C3 vorliegen kann, und da die GC-MS-Analyse nach Silylierung ein abweichendes Ergebnis liefert, handelt es sich bei den nachgewiesenen Verbindungen um Reaktionsprodukte die aus C8 in der GC-MS entstehen. Demnach wird auch hier ein Produkt aus 10,12-FFA gebildet, welches mittels GC-MS nicht zu charakterisieren ist.

Tabelle 3.3.: Strukturvorschläge für oxidative Metaboliten und Reaktionsprodukte von 10,12-FFA aus den HPLC-Peaks C3, C5, C6 und C8

HPLC-Peak	oxidativer Metabolit	Reaktionsprodukt aus GC-MS-Analyse
C3		
C5		
C6		
C8	nicht identifiziert	 nicht identifiziert

### 3. Ergebnisse

Die nach oxidativer Umsetzung mit RLM männlicher Wi-Ratten gebildeten Metaboliten bzw. deren in der GC-MS nachweisbaren Reaktionsprodukte von 10,12-FFA sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

10,12-FFA wurde wie 8,10- und 9,11-FFA in vergleichender Weise mit RLM unbehandelter Wi-Ratten und mit Aroclor 1254 behandelter Wi-Ratten umgesetzt. Auch hier ist bei der Umsetzung mit Aroclor induzierten Wi-RLM die Bildung weiterer Produkte zu beobachten (Abb. 3.33). Wie bei 9,11-FFA wird das Verhältnis der gebildeten Menge der Epoxide (C5 und C6) von 10,12-FFA umgekehrt. Die Umsetzung mit induzierten Mikrosomen hat ebenfalls eine Steigerung des Umsatzes von 10,12-FFA von 35% auf 65% zur Folge. Die Übereinstimmung der bei beiden Umsetzungen gebildeten Peaks C3, C5, C6 und C8 kann mittels Cochromatographie bestätigt werden.

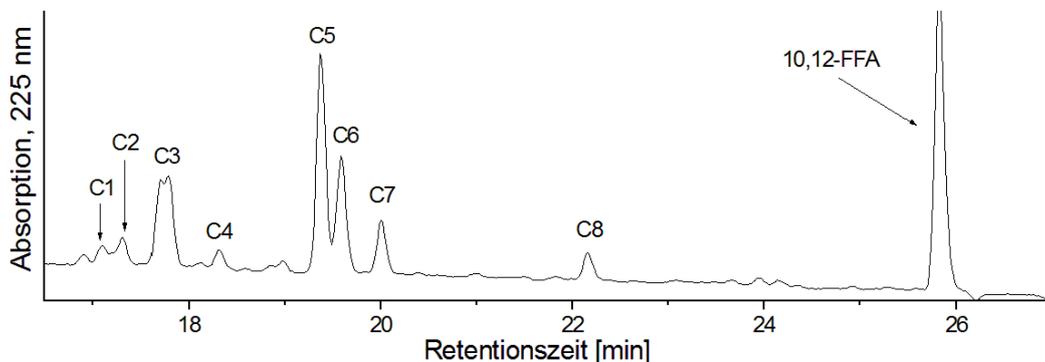


Abbildung 3.33.: HPLC-DAD-Chromatogramme der oxidativen Umsetzung von 10,12-FFA mit RLM von mit Aroclor 1254 behandelten Wi-Ratten;  $c(\text{FFA}) = 100 \mu\text{M}$ ;  $t = 60 \text{ min}$ ;  $c(\text{Protein}) = 1 \text{ mg/ml}$ ; HPLC-DAD-Bedingungen s. 6.2.1.1

#### Fazit der mikrosomalen Umsetzungen

Zusammenfassend lässt sich zu den oxidativen Umsetzungen von 8,10-, 9,11- und 10,12-FFA sagen, dass aus allen drei FFAs Epoxide gebildet werden. Von den Epoxiden sind jeweils nur die Reaktionsprodukte in der GC-MS nachweisbar. Des Weiteren werden aus 8,10- und 9,11-FFA je ein Metabolit gebildet, der eine Keto- und eine Hydroxygruppe am Alkylrest aufweist. Aus allen FFAs werden zwei einfach am Alkylrest hydroxylierte Metaboliten gebildet. Die Charakterisierung der sich entsprechenden Produkte von 9,11- und 10,12-FFA aus B10 und C8 ist nicht möglich.

3.1.2.  $\beta$ -Oxidation von Furanfettsäuren

Eine weitere im Körper ablaufende Stoffwechselreaktion ist die  $\beta$ -Oxidation von FAs, die in den Mitochondrien von Säugerzellen stattfindet. Diese werden dabei unter Freisetzung von  $\text{FADH}_2$  und  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , die der Atmungskette zugeführt werden, zu Ac-CoA abgebaut.

Um die  $\beta$ -Oxidation von FFAs zu untersuchen wurde ein zellfreies *in vitro* System mit Rattenlebermitochondrien angewendet. Dazu wurden  $100 \mu\text{M}$  8,10- bzw. 10,12-FFA mit Rattenlebermitochondrien männlicher Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten), mit einer Proteinkonzentration von  $800 \mu\text{g/ml}$ , umgesetzt (s. 6.2.2.2). Nach der Inkubation erfolgte eine Verseifung, um Ac-CoA abzuspalten. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mittels HPLC-DAD sowie nach Methylierung mit TMSH mittels GC-MS analysiert.

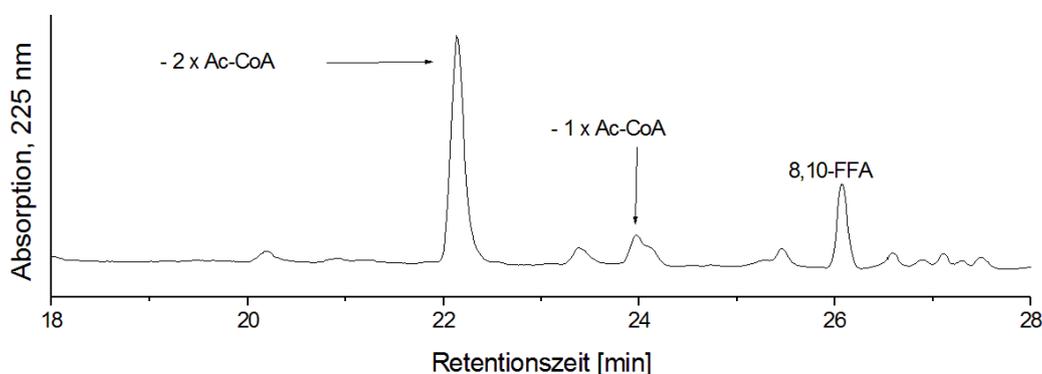


Abbildung 3.34.: HPLC-DAD-Chromatogramm der  $\beta$ -Oxidation mit Lebermitochondrien männlicher SD-Ratten von 8,10-FFA;  $c(\text{FFA}) = 100 \mu\text{M}$ ;  $c(\text{Protein}) = 800 \mu\text{g/ml}$ ;  $t = 24 \text{ h}$ ; HPLC-DAD-Bedingungen s. 6.2.1.1

In der HPLC-Analyse des  $\beta$ -Oxidation-Ansatzes von 8,10-FFA sind zwei Peaks detektierbar (Abb. 3.34), die nach Methylierung mittels GC-MS als Abbauprodukte der FFA zu identifizieren sind. Diese sind zum einen 8,10-FFA nach Abspaltung einer Ac-CoA-Einheit mit dem Molekülion  $m/z = 280$  (Abb. 3.35 (A)), zum anderen 8,10-FFA nach Abspaltung zweier Ac-CoA-Einheiten mit dem Molekülion  $m/z = 252$  (Abb. 3.35 (B)). Die Fragmentierungsschemata der beiden Abbauprodukte sind in Abbildung 3.37 (A) und (B) dargestellt. Eine weitere Verkürzung des Säurerests findet nicht statt, sodass diese Verbindung das kleinste Abbauprodukt darstellt. Außer den beiden  $\beta$ -Oxidationsprodukten sind je eine 8,10-FFA mit einer Ketogruppe und einer Hydroxygruppe, in  $\beta$ -Stellung zur Carboxylgruppe, nachweisbar. Bei diesen nur in Spuren im Reaktionsansatz vorkommenden Verbindungen handelt es sich um Zwischenprodukte, die im Verlauf der  $\beta$ -Oxidation gebildet werden. Eine Keto- oder Hydroxyverbindung des ersten  $\beta$ -Oxidationsprodukts kann nicht

### 3. Ergebnisse

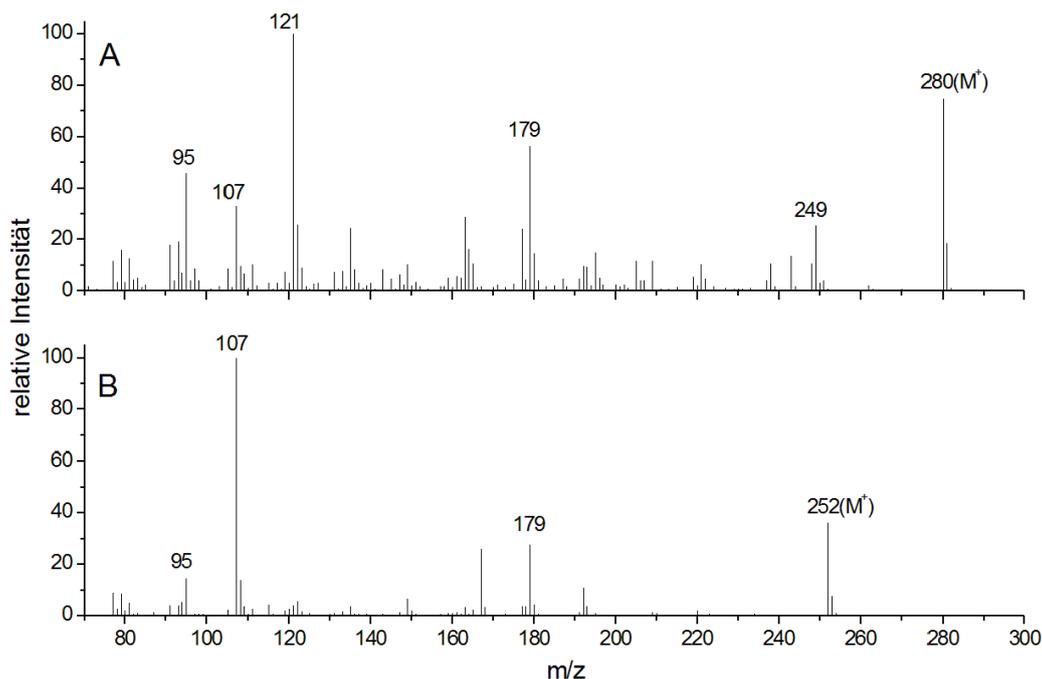


Abbildung 3.35.: Massenspektren der beiden  $\beta$ -Oxidationsprodukte von 8,10-FFA nach Methylierung mit TMSH; nach Abspaltung einer Acetyl-CoA-Einheit (A), Molekülion  $m/z = 280$ ; nach Abspaltung zweier Acetyl-CoA-Einheiten (B), Molekülion  $m/z = 252$ ; EI-Ionisierung, IE = 70eV

nachgewiesen werden. Es ist davon auszugehen, dass diese Intermediate in zu geringen Mengen im Reaktionsansatz vorliegen.

Im HPLC-Chromatogramm der Umsetzung von 10,12-FFA sind im Gegensatz zu 8,10-FFA drei Peaks zu detektieren (Abb. 3.36), die nach Methylierung mittels GC-MS als  $\beta$ -Oxidationsprodukte dieser zu identifizieren sind. Da bei 10,12-FFA der Furanring im Vergleich zu 8,10-FFA um zwei Positionen zum Alkylende hin verschoben ist, kann eine dritte Ac-CoA-Einheit abgespalten werden. Somit bleibt bei 10,12-FFA ebenfalls ein aus drei Kohlenstoffatomen bestehender Säurerest am Furanring bestehen. Die drei Abbauprodukte weisen entsprechend die Molekülionen  $m/z = 280$ ,  $m/z = 252$  und  $m/z = 224$  auf. Eine Unterscheidung gegenüber den Abbauprodukten von 8,10-FFA erfolgt anhand des für 10,12-FFA spezifischen Fragments  $m/z = 151$  (s. 3.1.1.3, Abb. 3.30). Auch hier sind die Keto- und Hydroxyverbindung von 10,12-FFA, die als Zwischenprodukte der  $\beta$ -Oxidation entstehen, nachweisbar.

### 3. Ergebnisse

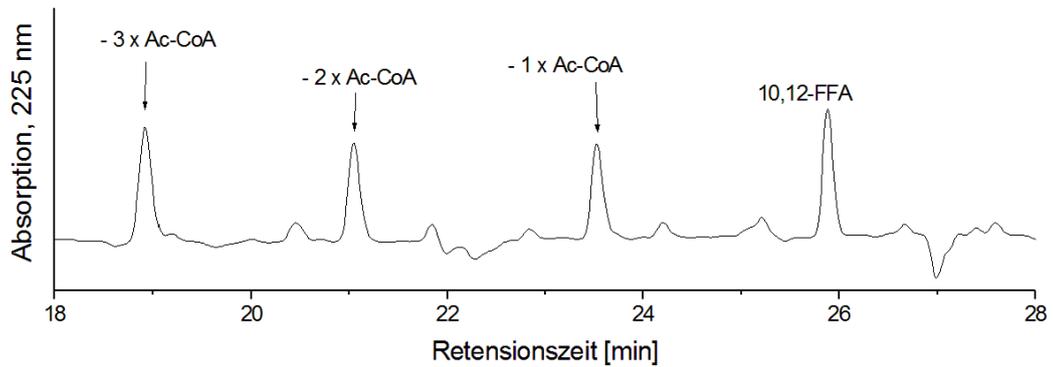


Abbildung 3.36.: HPLC-DAD-Chromatogramm der  $\beta$ -Oxidation mit Lebermitochondrien männlicher SD-Ratten von 10,12-FFA;  $c(\text{FFA}) = 100 \mu\text{M}$ ;  $c(\text{Protein}) = 800 \mu\text{g/ml}$ ;  $t = 24 \text{ h}$ ; HPLC-DAD-Bedingungen s. 6.2.1.1

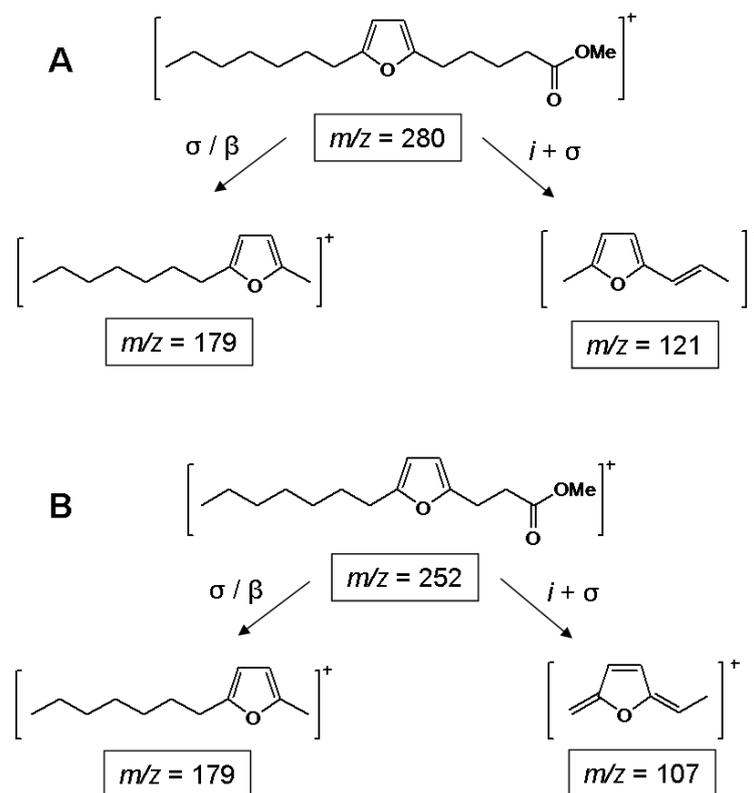


Abbildung 3.37.: Strukturen und spezifische Fragmente der beiden  $\beta$ -Oxidationsprodukte von 8,10-FFA nach Methylierung mit TMSH; nach Abspaltung einer Acetyl-CoA-Einheit (A); nach Abspaltung zweier Acetyl-CoA-Einheiten (B); EI-Ionisierung, IE = 70 eV

### 3. Ergebnisse

Alle  $\beta$ -Oxidationsprodukte von 8,10- und 10,12-FFA, sowie die nachweisbaren Intermediate der  $\beta$ -Oxidation, sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tabelle 3.4.: Strukturen der  $\beta$ -Oxidationsprodukte von 8,10- und 10,12-FFA nach  $\beta$ -Oxidation mit Lebermitochondrien männlicher SD-Ratten

8,10-FFA	10,12-FFA
- 1 x Acetyl-CoA	
- 2 x Acetyl-CoA	
- 3 x Acetyl-CoA	
Zwischenprodukte	

Sowohl bei 8,10-FFA als auch bei 10,12-FFA wird der Säurerest durch  $\beta$ -Oxidation bis auf drei Kohlenstoffatome verkürzt. Aufgrund der verschiedenen Positionen des Furanrings und der daraus resultierenden unterschiedlichen Kettenlänge des Säurerests, sind bei 8,10-FFA zwei, bei 10,12-FFA drei  $\beta$ -Oxidationsprodukte nachweisbar. Der Furanring sowie der Alkylrest der FFAs werden durch die  $\beta$ -Oxidation nicht beeinflusst.

### 3.2. Toxizität von Furanfettsäuren

Genotoxische Substanzen können zu DNA-Strangbrüchen und/oder zur Schädigung des Spindelapparats in Zellen führen. Die Folge können DNA-Fragmente oder auch ganze Chromosomen sein, die nach der Mitose, umgeben von einer Kernmembran, außerhalb des Zellkerns vorliegen. Diese werden als Mikrokerne (MN) bezeichnet. Da es von FFAs

### 3. Ergebnisse

keine Daten zu deren genotoxischer Wirkung gibt, war es die Absicht die Auswirkungen dieser Verbindungen mit Hilfe des *in vitro* MN-Tests zu betrachten.

Um zunächst festlegen zu können, in welchen Konzentrationen und unter welchen Inkubationsbedingungen die FFAs für den MN-Test einzusetzen sind, musste die cytotoxische Wirkung der FFAs untersucht werden.

#### 3.2.1. Cytotoxizität von Furanfettsäuren

Zur Untersuchung der cytotoxischen Wirkung von 8,10- und 10,12-FFA wurde der MTT-Assay, wie in 6.2.4.1 beschrieben, durchgeführt. Es wird dabei der Redox-Status der Zelle anhand der Aktivität der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase bestimmt. Die Bestimmung der Cytotoxizität wurde mit Lungenfibroblasten des männlichen Chinesischen Hamsters (V79-Zellen) durchgeführt. Da diese keinen oxidativen Metabolismus aufweisen kann damit die Cytotoxizität der Substanz selbst und nicht etwaiger gebildeter Metaboliten beurteilt werden. Um den Einfluss von fetalem Kälberserum (FKS), das als Wachstumsfaktor in der Zellkultur eingesetzt wird, auf die cytotoxische Wirkung zu betrachten, wurde mit und ohne FKS im Medium inkubiert. Die dargestellten Werte beziehen sich auf eine substanzfreie Negativkontrolle.

Wie in Abbildung 3.38 zu erkennen ist, sinkt die Viabilität von V79-Zellen nach 6 h Inkubation mit FKS-freiem Medium bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  8,10-FFA auf unter 70%. 10,12-FFA wirkt bereits bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  cytotoxisch und senkt nach 6 h Inkubation die Viabilität von V79-Zellen auf unter 50% ab.

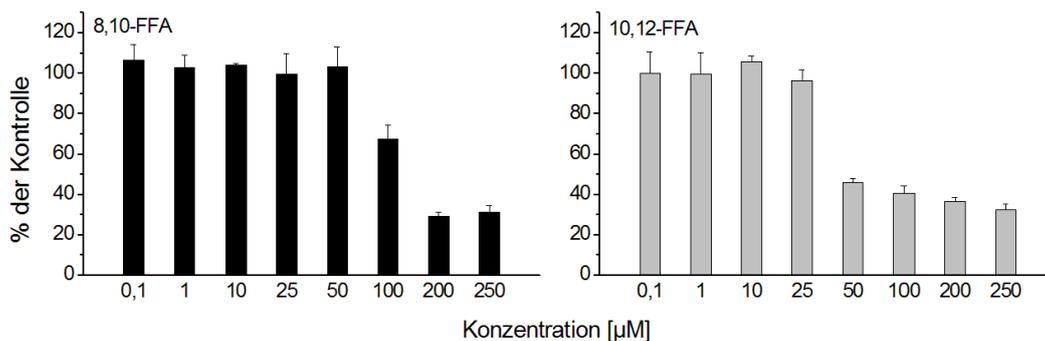


Abbildung 3.38.: MTT-Assay mit V79-Zellen, mit 8,10- und 10,12-FFA, 6 h Inkubation mit FKS-freiem Medium; angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  S.D.; alle Werte werden auf die DMSO-Kontrolle bezogen

Werden nach erfolgter sechsstündiger Inkubation die V79-Zellen für 24 h substanzfrei nachinkubiert (Abb. 3.39), so wirkt sich 8,10-FFA bereits ab einer Konzentration von

### 3. Ergebnisse

50  $\mu\text{M}$  cytotoxisch aus. Unter diesen Bedingungen, die bei der Durchführung des MN-Tests angewendet werden, waren ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  an 10,12-FFA nahezu keine lebenden V79-Zellen mehr auszumachen.

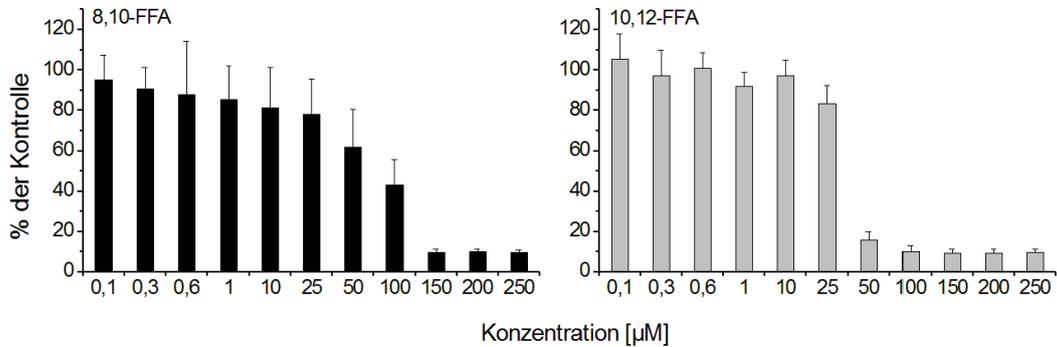


Abbildung 3.39.: MTT-Assay mit V79-Zellen, mit 8,10- und 10,12-FFA, 6 h Inkubation mit FKS-freiem Medium, 24 h Nachinkubation mit substanzfreiem Medium (10% FKS (V/V)); angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  S.D.; alle Werte werden auf die DMSO-Kontrolle bezogen

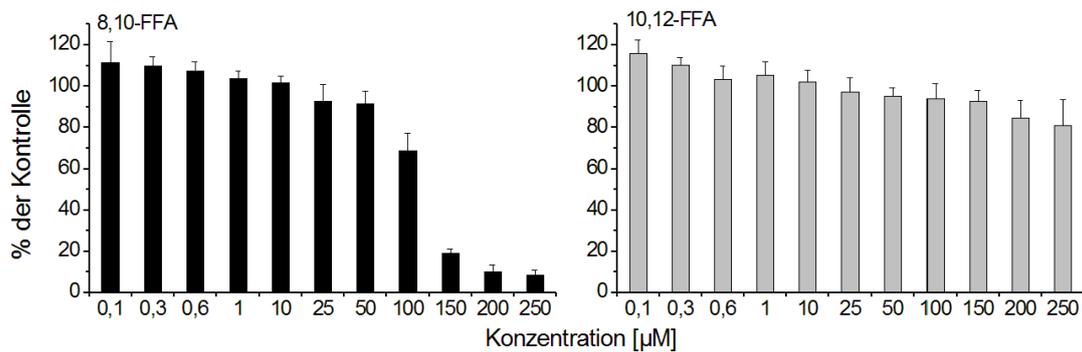


Abbildung 3.40.: MTT-Assay mit V79-Zellen, mit 8,10- und 10,12-FFA, 6 h Inkubation mit FKS-haltigem Medium (10% FKS (V/V)), 24 h Nachinkubation mit substanzfreiem Medium (10% FKS (V/V)); angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  S.D.; alle Werte werden auf die DMSO-Kontrolle bezogen

Wird zur Inkubation FKS-haltiges Medium verwendet (Abb. 3.40), so ist bei 8,10-FFA erst ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eine cytotoxische Wirkung festzustellen. Bei 10,12-FFA bleibt bis zu einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  unter diesen Bedingungen eine cytotoxische Wirkung aus.

### 3.2.2. Genotoxizität von Furanfettsäuren

Die genotoxische Wirkung von FFAs wurde mit Hilfe des MN-Tests, wie in 6.2.4.2 beschrieben, untersucht. Als Modell dienten V79-Zellen, da diese, wie in 3.2.1 beschrieben, keinen oxidativen Metabolismus aufweisen. Somit liegen die eingesetzten FFAs unverändert in den Zellen vor, und es kann die Genotoxizität der Muttersubstanz beurteilt werden. Die Inkubation erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen 8,10- und 10,12-FFA für 6 h mit FKS-freiem oder FKS-haltigem Medium. Es erfolgte eine substanzfreie Nachinkubation, da mindestens ein Zellzyklus notwendig ist, damit sich MN ausbilden können.

Bei 8,10-FFA kann nach einer Inkubationsdauer von 6 h mit FKS-freiem Medium bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  keine genotoxische Wirkung festgestellt werden (Abb. 3.41). Weder die Zahl der MN nimmt zu, noch ändert sich die Mitose-Rate.

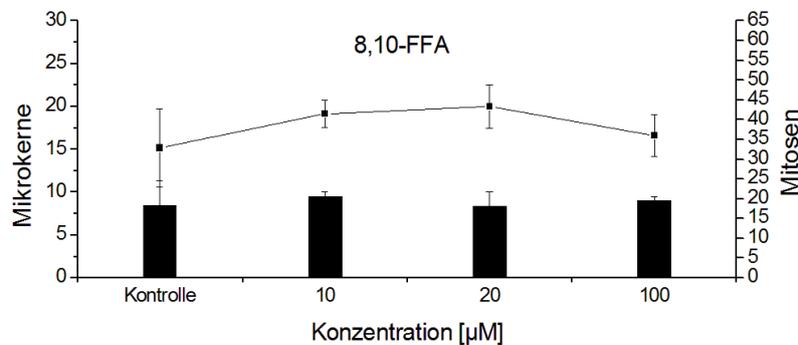


Abbildung 3.41.: MN-Test in V79-Zellen, mit 8,10-FFA, MN (Balken) und Mitosen (Linie) sind pro 1000 Zellen angegeben, 6 h Inkubation mit FKS-freiem Medium, 24 h Nachinkubation mit substanzfreiem Medium (10% FKS (V/V)); angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  S.D.

Bei 10,12-FFA kommt es hingegen zu einer signifikanten Zunahme der MN ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  (Abb. 3.42). Ab einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  ist außerdem ein signifikanter Rückgang der Mitosen festzustellen. Inkubationen mit höheren Konzentrationen an 10,12-FFA führen zu keinem auswertbaren Ergebnis. Dies steht zum einen im Zusammenhang mit der hohen cytotoxischen Wirkung von 10,12-FFA, wenn zusätzlich eine substanzfreie Nachinkubation durchgeführt wird (s. 3.2.1, Abb. 3.39). Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass 10,12-FFA in die Membranlipide der V79-Zellen eingebaut wird, was wiederum zur Folge haben kann, dass durch diese Veränderung die adhärenente Wirkung verloren geht. Die Zellen sind in Folge dessen nicht mehr in der Lage an Oberflächen anzuwachsen, was ein Absterben der V79-Zellen zur Folge hätte.

### 3. Ergebnisse

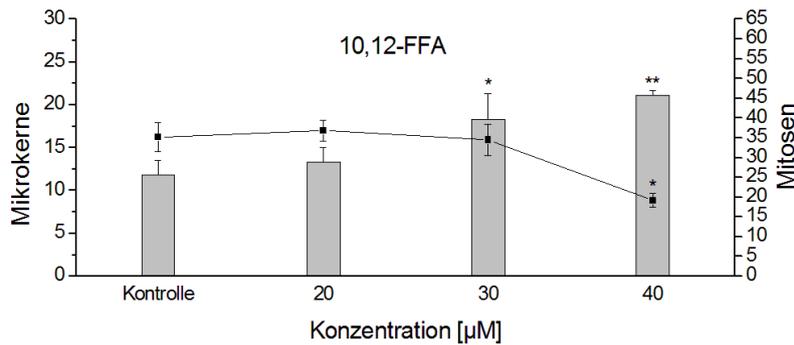


Abbildung 3.42.: MN-Test in V79-Zellen, mit 10,12-FFA, MN (Balken) und Mitosen (Linie) sind pro 1000 Zellen angegeben, 6 h Inkubation mit FKS-freiem Medium, 24 h Nachinkubation mit substanzfreiem Medium (10% FKS (V/V)); angegeben sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  S.D.; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (ANOVA-Test)

Alle Inkubationen von V79-Zellen mit 10,12-FFA in FKS-haltigem Medium (nicht dargestellt) zeigen keinerlei Wirkung auf Mitosen und die MN-Bildung.

#### Fazit der Untersuchungen zur Toxizität der Furanfettsäuren

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass FFAs kein ausgeprägtes genotoxisches Potential aufweisen. Unter dem Einfluss von 8,10-FFA ist *in vitro* keine Zunahme der MN festzustellen, und die Behandlung von kultivierten Zellen mit 10,12-FFA führt nur zu einem marginalen Anstieg der Anzahl der MN. Diese Zunahme der MN unter Einwirkung von 10,12-FFA korreliert mit der höheren Cytotoxizität von 10,12-FFA im Vergleich zu 8,10-FFA. Ebenso kann ein Zusammenhang zwischen der höheren Cytotoxizität von 10,12-FFA und der Tatsache, dass der MN-Test bei Konzentrationen von über 40 µM an 10,12-FFA nicht mehr auswertbar ist, hergestellt werden. Sowohl bei der Untersuchung der Genotoxizität als auch bei der Untersuchung der Cytotoxizität kommt es in Anwesenheit von FKS im Inkubationsmedium zu einer Abschwächung der Effekte.

#### 3.3. Einfluss von Fettsäuren auf Lipide von Zellen

Methylsubstituierte FFAs kommen in der Natur in vielen Speicher- und Membranlipiden von tierischen und pflanzlichen Organismen vor (s. 1.1.1, Tab. 1.2). Des Weiteren ist zu beobachten, dass kultivierte Zellen unter dem Einfluss großer Mengen an FFA teilweise ihre adhärenzte Wirkung verlieren, was mit Veränderungen in der Membranstruktur zusammenhängen kann. Es wurde daher der Einfluss der FFAs auf Speicher- und Membranlipide in

### 3. Ergebnisse

Zellen untersucht. Dazu wurden sowohl V79-Zellen als auch humane Colocarzinomzellen (HT-29-Zellen) und humane Lebercarcinomzellen (HepG2-Zellen) eingesetzt (s. 6.2.6).

#### 3.3.1. Einbau von Fettsäuren in Lipide von V79-Zellen

Zunächst wurde die Lipidzusammensetzung von V79-Zellen ohne Zugabe von Substrat analysiert. Dazu erfolgte eine Extraktion der Zellen mit anschließender Fraktionierung mittels Festphasenextraktion (SPE) (s. 6.2.5.1), um vier Lipidfraktionen voneinander zu trennen: die Fraktion der Phospholipide (PL), die Fraktion der freien Fettsäuren (FA), die Fraktion der Cholesterylester (CE) sowie eine Fraktion, die Triglyceride (TG) und das freie Cholesterol (ChOL) enthält. PL und ChOL stellen dabei die Membranlipide dar, CEs und TGs sind Speicherlipide. Freie FAs liegen im Cytosol vor. Das FA-Muster der Lipidfraktionen wurde nach Derivatisierung mittels GC-FID bestimmt (s. 6.2.1.3).

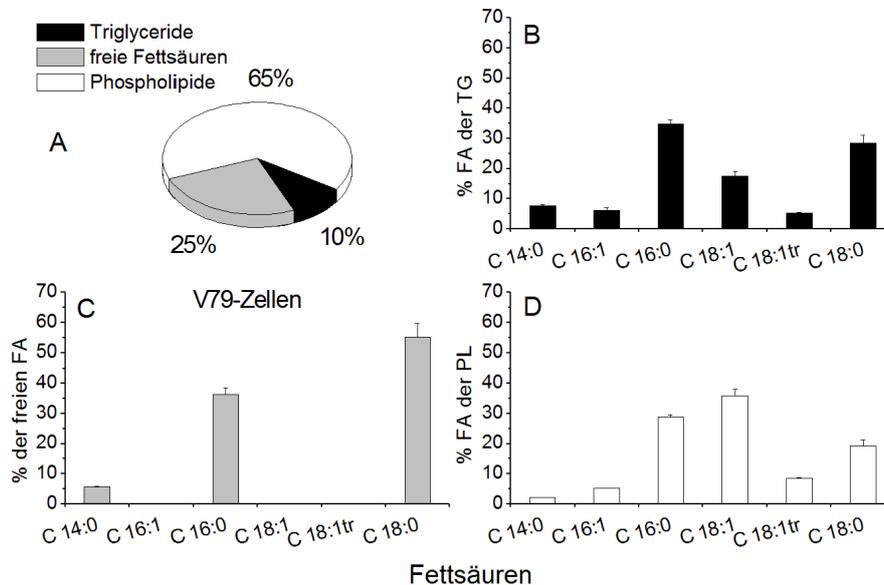


Abbildung 3.43.: Verteilung der Gesamtmenge an Fettsäuren auf die einzelnen Lipidfraktionen von V79-Zellen (A); Fettsäuremuster der Triglyceride von V79-Zellen (B); freie Fettsäuren in V79-Zellen (C); Fettsäuremuster der Phospholipide in V79-Zellen (D); berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der einzelnen Lipidfraktionen; dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

Aus Abbildung 3.43 (A) geht hervor, dass die FAs der PLs und somit der Membranlipide, zwei Drittel der FAs von V79-Zellen ausmachen. Der Anteil der FAs in Speicherlipiden

### 3. Ergebnisse

von V79-Zellen ist mit 10% der Gesamtmenge der FAs gering. Die Speicherlipide setzen sich ausschließlich aus TGs zusammen, CEs sind keine nachweisbar. Die restlichen 25% der FAs liegen frei in der Zelle vor. Palmitin- (C 16:0) und Stearinsäure (C 18:0) sind dabei die Hauptbestandteile der TGs (Abb. 3.43 (B)), während in den PLs C 16:0 und Ölsäure (C 18:1) dominant sind (Abb. 3.43 (D)). In freier Form liegen ausschließlich gesättigte FAs vor (Abb. 3.43 (C))

Unerwartet ist das Vorkommen von Vaccensäure (C 18:1tr11), da diese auf natürlichem Weg nur von Wiederkäuern gebildet wird (Hughes et al., 1982). Der Einsatz von FKS als Wachstumsfaktor in der Zellkultur bewirkt das Vorkommen von C 18:1tr11 in kultivierten V79-Zellen. Die Stoffmengen der in 1 ml FKS nachweisbaren FAs sind in Tabelle 3.5 wiedergegeben. Die im FKS vorhandene C 18:1tr11 wird von den Zellen in Speicher- (Abb. 3.43 (B)) und Membranlipide (Abb. 3.43 (D)) eingebaut. Linolsäure (C 18:2) ist, obwohl sie im FKS in vergleichbaren Mengen wie C 18:1tr11 vorliegt, in den Lipidfraktionen von V79-Zellen nicht nachweisbar.

Tabelle 3.5.: Stoffmengen der Fettsäuren in 1 ml FKS in den Gesamtlipiden, Triglyceriden (TG), Phospholipiden (PL), Cholesterylester (CE) und freie Fettsäuren (freie FA), berechnet mit der Kalibrierung von C 18:1 (s. 6.2.1.4; Abb. 6.4) unter Berücksichtigung der Wiederfindungen der SPE-Methode für die einzelnen Lipidfraktionen (s. 6.2.5.1; Tab. 6.4); angegeben sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

FA in Fraktion [nmol]	Gesamtlipide	TG	PL	freie FA	CE
Gesamt-FA	107,7 $\pm$ 7,8	17,4 $\pm$ 1,5	41,8 $\pm$ 6,4	23,1 $\pm$ 4,4	25,4 $\pm$ 1,6
C 14:0	5,8 $\pm$ 0,6	1,9 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,6	n.n.
C 16:1	7,7 $\pm$ 0,5	2,5 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,0	0,9 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,3
C 16:0	36,9 $\pm$ 1,9	6,3 $\pm$ 0,5	15,0 $\pm$ 1,0	8,2 $\pm$ 1,6	7,4 $\pm$ 0,2
C 18:2	5,4 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,6
C 18:1	14,3 $\pm$ 0,4	2,7 $\pm$ 0,4	3,8 $\pm$ 0,5	2,2 $\pm$ 0,6	5,6 $\pm$ 0,1
C 18:1tr11	4,7 $\pm$ 0,6	0,4 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,1
C 18:0	32,9 $\pm$ 3,4	3,1 $\pm$ 0,3	17,1 $\pm$ 4,2	9,0 $\pm$ 0,8	3,7 $\pm$ 0,3

Wie bereits in 3.2.1 gezeigt werden konnte, sinkt die cytotoxische Wirkung von FFAs in Anwesenheit von FKS im Medium, was zu der Annahme führt, dass FKS FFAs z.B. in Lipoproteine einlagert. Die FFAs stehen in der Folge der Zelle nicht mehr zur Verfügung. Daher wurde bei der Untersuchung des Einbaus von FFAs in die Lipide von V79-Zellen zunächst der Einfluss von FKS im Inkubationsmedium auf die freie Verfügbarkeit der eingesetzten FFAs untersucht. Dazu wurde eine Inkubation für 6 h ( $c(\text{FFA}) = 50 \mu\text{M}$ ) mit und ohne FKS im Inkubationsmedium durchgeführt und anschließend der Anteil der FFAs an den gesamten FAs Zellen und im Medium bestimmt (s. 6.2.6.1).

### 3. Ergebnisse

Nach einer Inkubationsdauer von 6 h ist festzustellen, dass sowohl von 8,10- als auch von 10,12-FFA bei Inkubation mit FKS-freiem Medium ein größerer Anteil in die Lipidfraktionen der V79-Zellen eingebaut wird als bei Inkubation mit FKS-haltigem Medium (Abb. 3.44 (A)). Ebenso zeigt die im Kulturmedium verbliebene Menge der jeweiligen FFA die Auswirkungen des FKS auf (Abb. 3.44 (B)). Nach 6 h Inkubation verbleiben von der gesamten nachweisbaren Menge der FFAs zwischen 6 und 10% in FKS-freiem Medium. Bei Anwesenheit von FKS im Medium steigen die Werte auf bis mehr als 50% an. Generell sind größere Mengen von 10,12-FFA in den Lipide der V79-Zellen nachweisbar als von 8,10-FFA. Da die Anwesenheit von FKS im Kulturmedium zur Folge hat, dass nur ein verminderter Teil der eingesetzten FFAs frei verfügbar ist, werden für alle weiteren Versuche Inkubationen mit FKS-freiem Medium durchgeführt.

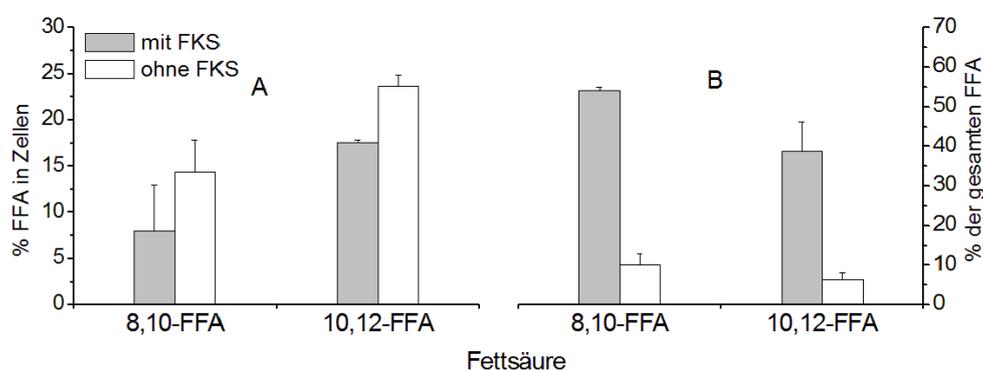


Abbildung 3.44.: Prozentualer Anteil der Furanfettsäuren relativ zur Gesamtmenge der Fettsäuren von V79-Zellen (A); prozentualer Anteil der Furanfettsäuren im Kulturmedium an den gesamten nachweisbaren Furanfettsäuren in Zellen und Medium (B) nach 6 h Inkubation mit und ohne FKS im Kulturmedium;  $c(\text{FFA}) = 50 \mu\text{M}$ ; berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der Lipidfraktionen und des Mediums; dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

Als Nächstes wurde der zeitliche Verlauf des Einbaus der FFAs in die Lipide von V79-Zellen untersucht. Hierfür wurden wie in 6.2.6.1 beschrieben Inkubationen von V79-Zellen mit  $50 \mu\text{M}$  8,10- oder 10,12-FFA über einen Zeitraum von jeweils 1, 3 und 6 h mit FKS-freiem Medium durchgeführt.

Betrachtet man den Anteil an FFAs in den jeweiligen Lipidfraktionen, so wird bestätigt, was bereits bei der Untersuchung der Verfügbarkeit der FFAs im Medium nach einer Inkubationsdauer von 6 h zu sehen war (Abb. 3.45): 10,12-FFA ist in größeren Mengen in den Lipidfraktionen von V79-Zellen nachweisbar als 8,10-FFA. Dabei ist der Anteil von beiden FFAs in der TG-Fraktion größer als in der PL-Fraktion. Freie FFAs sind nicht nachweisbar und FFA-haltige CEs werden nicht gebildet. Der maximale Anteil an eingebauten FFAs ist

### 3. Ergebnisse

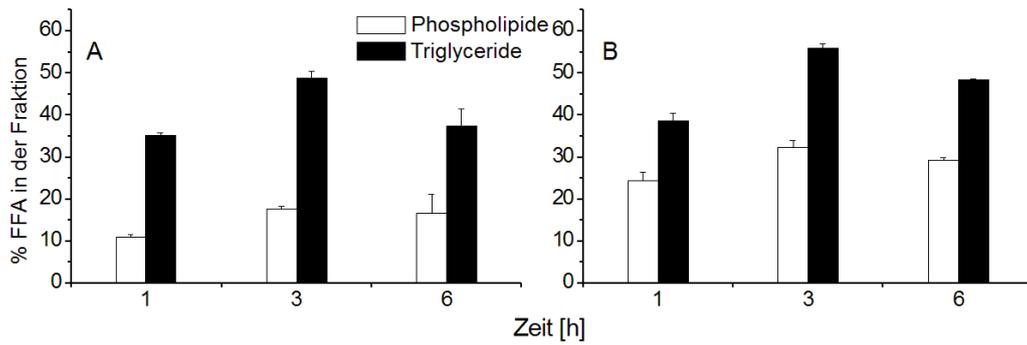


Abbildung 3.45.: Zeitabhängigkeit des prozentualen Anteils an eingebauten Furanfettsäuren relativ zu der Gesamtmenge an Fettsäuren in den Lipidfraktionen der Phospholipide und Triglyceride von V79-Zellen nach Inkubation mit 8,10-FFA (A) und 10,12-FFA (B);  $c(\text{FFA}) = 50 \mu\text{M}$ ; berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der Lipidfraktionen; dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

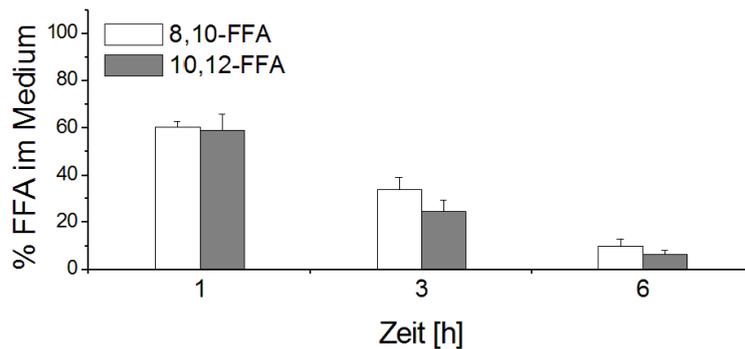


Abbildung 3.46.: Zeitabhängigkeit des prozentualen Anteils der Furanfettsäuren im Kulturmedium relativ zur nachgewiesenen Gesamtmenge an Furanfettsäuren in Zellen und Medium;  $c(\text{FFA}) = 50 \mu\text{M}$ ; berechnet anhand der Peakflächen der in Zellen und Medium mittels GC-FID detektierten FFA-Methylester; dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

in der TG- und der PL-Fraktion bereits nach einer Inkubationsdauer von 3 h erreicht. Die FAs der PL-Fraktion bestehen nach dieser Zeit zu 18% aus 8,10- bzw. zu 32% aus 10,12-FFA. Die Anteile an 8,10- und 10,12-FFA in der PL-Fraktion sind nach 6 h mit denen nach 3 h vergleichbar. Bereits nach 1 h Inkubation liegen die Werte in der PL-Fraktion nahe dem Maximum. Die FAs der TG-Fraktion weisen nach 3 h Inkubation einen Anteil von 49% 8,10- bzw. 56% 10,12-FFA auf. Nach 6 h Inkubation ist hier ein minimaler Rückgang der Anteile an FFAs zu erkennen. Die 6 h-Werte sind nach 1 h Inkubation in

### 3. Ergebnisse

den TG-Fractionen bereits näherungsweise erreicht. Obwohl die FFAs im Medium im Laufe der Zeit weiter abnehmen (Abb. 3.46) ist keine Zunahme der Anteile der FFAs zwischen 3 h und 6 h festzustellen. Dies ist damit zu begründen, dass die Zellzahl und somit die Gesamtmenge an FAs in den Lipidfraktionen, in diesem Zeitraum zunimmt.

Der Einbau der FFAs bei einer Inkubationsdauer von 3 h wurde neben 8,10- und 10,12-FFA auch mit 9,11-FFA untersucht. Die Inkubationsbedingungen waren hier identisch.

Die Fettsäureverteilungen der FFA-haltigen Lipidfraktionen von V79-Zellen nach einer Inkubationsdauer von 3 h zeigen, dass in den Fraktionen der PLs (Abb. 3.47 (A), (C) und (E)) C 16:0, C 18:0 und C 18:1 am stärksten durch die FFAs substituiert werden. In den

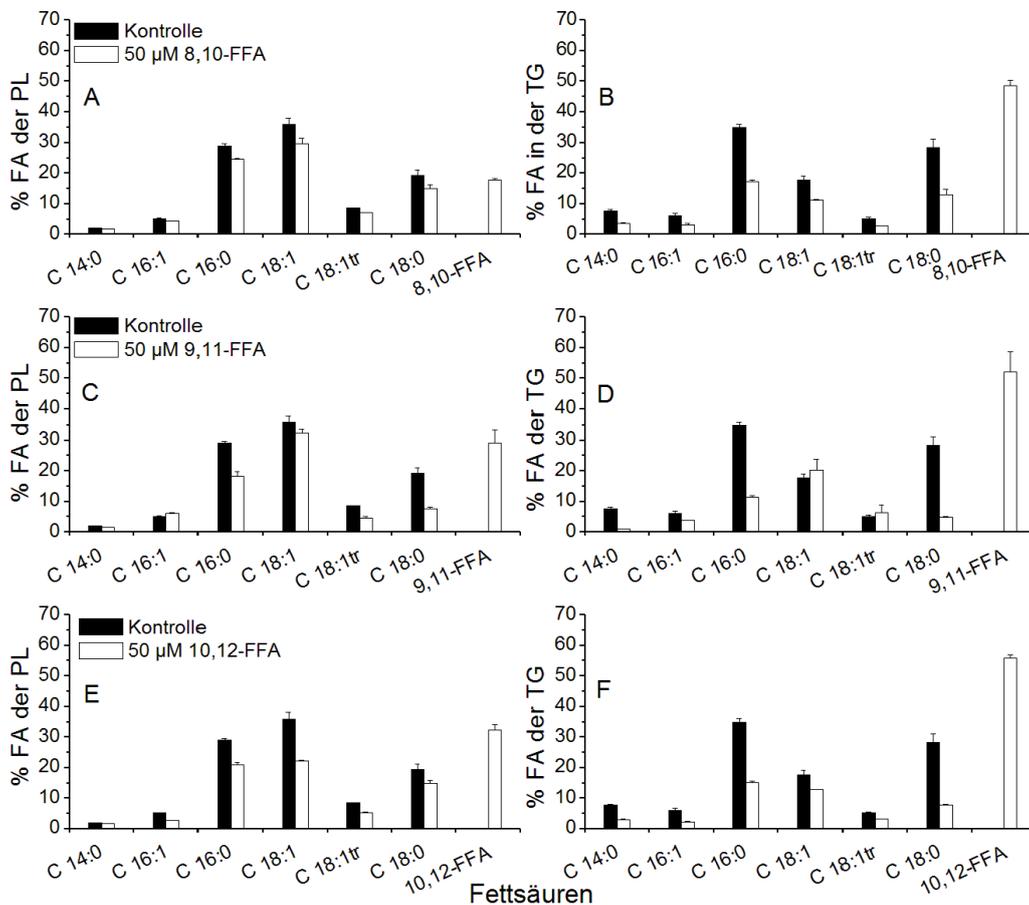


Abbildung 3.47.: Fettsäureverteilung nach Inkubation mit 8,10-FFA in Phospholipiden (A) und Triglyceriden (B), nach Inkubation mit 9,11-FFA in Phospholipiden (C) und Triglyceriden (D) und nach Inkubation mit 10,12-FFA in Phospholipiden (E) und Triglyceriden (F) von V79-Zellen;  $c(\text{FFA}) = 50 \mu\text{M}$ ;  $t = 3 \text{ h}$ ; berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der Lipidfraktionen; dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

### 3. Ergebnisse

Fraktionen der TGs (Abb. 3.47 (B), (D) und (F)) sind überwiegend C 16:0 und C 18:0 von der Substitution durch die eingesetzten FFAs betroffen.

Der in der TG-Fraktion nachweisbare Anteil von 9,11-FFA (Abb. 3.47 (D)) ist wie bei 8,10- und 10,12-FFA (Abb. 3.47 (B) und (F)) größer als der in die PL-Fraktion eingebaute Anteil (Abb. 3.47 (A), (C) und (E)). Die nachgewiesenen Anteile an 9,11-FFA von 29% in den PLs und 52% TGs von V79-Zellen liegen zwischen den Werten von 8,10- und 10,12-FFA.

Durch die Supplementierung von FFAs im Inkubationsmedium kommt es außerdem zu einer Veränderung in der Verteilung der FAs auf die Lipidfraktionen der PLs, TGs und der freien FAs nach 3 h (Tab. 3.6). Die Gesamtmenge der FAs der TG-Fraktion nimmt unter dem Einfluss von 8,10-FFA gegenüber der Kontrolle um ca. 60% zu. Die Inkubation mit 9,11- und 10,12-FFA führt zu einer Zunahme der FAs in der TG-Fraktion von mehr als 100%. Als Kontrolle wird die Verteilung der FAs auf die Lipidfraktionen der nicht inkubierten V79-Zellen (Abb. 3.43 (A)) herangezogen.

Tabelle 3.6.: Verteilung der Fettsäuren von V79-Zellen auf die Lipidfraktionen der Phospholipide, Triglyceride und freien Fettsäuren nach 3 h Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  8,10-, 9,11- bzw. 10,12-FFA; c(FFA) = 50  $\mu\text{M}$ ; berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der einzelnen Lipidfraktionen

Lipidfraktion	Kontrolle	8,10-FFA	9,11-FFA	10,12-FFA
TG	10%	16%	21%	20%
PL	65%	62%	58%	60%
freie FA	25%	22%	21%	20%

Um einen Vergleich zu bekommen, wie FFAs im Verhältnis zu einer natürlich vorkommenden FA in Membran- und Speicherlipide von V79-Zellen eingebaut werden, wurden V79-Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  C 18:2 für 3 h inkubiert (s. 6.2.6.1). C 18:2 wurde gewählt, da sie in V79-Zellen nicht nachweisbar ist und eine natürlich vorkommende essentielle FA mit einem vergleichbaren Grundgerüst wie die eingesetzten FFAs darstellt.

Nach einer Inkubationsdauer von 3 h mit FKS-freiem Medium ist zu erkennen, dass die FAs der PL-Fraktion (Abb. 3.48 (A)) zu ungefähr 40% aus C 18:2 bestehen. Der Anteil von C 18:2 an den FAs der TG-Fraktion (Abb. 3.48 (B)) liegt mit 60% wie bei den Inkubationen mit FFAs darüber. Der Anteil der in V79-Zellen nachgewiesenen C 18:2 liegt somit über den für die FFAs bestimmten Anteilen.

### 3. Ergebnisse

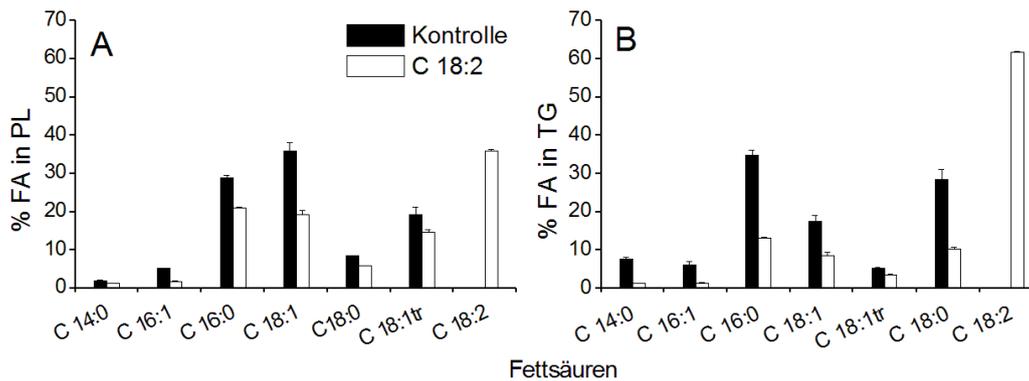


Abbildung 3.48.: Fettsäureverteilung in den Fraktionen der Phospholipide (A) und Triglyceride (B) von V79-Zellen nach Inkubation mit Linolsäure;  $c(\text{C } 18:2) = 50 \mu\text{M}$ ,  $t = 3 \text{ h}$ ; berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der Lipidfraktionen; dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

Bei der Inkubation mit C 18:2 kommt es wie bei den Inkubationen mit FFAs zu einem Anstieg der in der TG-Fraktion gebundenen FAs (Tab. 3.7). Die TG-Fraktion nimmt unter dem Einfluss von C 18:2 stärker zu als es bei 8,10-, 9,11- und 10,12-FFA der Fall ist (Tab. 3.6).

Tabelle 3.7.: Verteilung der Fettsäuren von V79-Zellen auf die Lipidfraktionen der Phospholipide, Triglyceride und freien Fettsäuren nach 3 h Inkubation mit  $50 \mu\text{M}$  Linolsäure;  $c(\text{C } 18:2) = 50 \mu\text{M}$ ; berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der einzelnen Lipidfraktionen

Lipidfraktion	Kontrolle	C 18:2
TG	10%	36%
PL	65%	46%
freie FA	25%	18%

#### 3.3.2. Einbau von Furanfettsäuren in Lipide von HT-29-Zellen

Da durch Nahrungsaufnahme FFAs in den Darm gelangen und dort Einfluss auf die Lipidzusammensetzung von Zellen nehmen können, war die Absicht ein *in vitro*-System mit Darmzellen einzusetzen. Hierfür wurde der Einbau von FFAs in HT-29-Zellen, bei denen es sich um humane Colocarcinomzellen handelt, betrachtet. Die Inkubationen wurden für

### 3. Ergebnisse

3 h mit FKS-freiem Medium, mit Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  8,10-, 9,11- und 10,12-FFA durchgeführt (s. 6.2.6.1). Die Fraktionierung der Zellen und die Bestimmung der FA-Muster der Fraktionen erfolgte wie in 3.3.1 für V79-Zellen beschrieben.

Wie in 3.3.1 wird zunächst das FA-Muster der Lipidfraktionen sowie die Verteilung der FAs auf die Lipidfraktionen von HT-29-Zellen (Abb. 3.49) betrachtet. Der Anteil an FAs in der PL-Fraktion in HT-29-Zellen ist vergleichbar mit dem bei V79-Zellen. Auch hier liegen ca. zwei Drittel der FAs der Zelle in den Membranlipiden vor (Abb. 3.49 (A)). HT-29-Zellen weisen jedoch einen wesentlich höheren Gehalt an Speicherlipiden als V79-Zellen auf. Diese bestehen auch bei dieser Zelllinie ausschließlich aus TGs. CEs sind nicht nachweisbar. Der Anteil der freien FAs ist in HT-29-Zellen kleiner, als in V79-Zellen. Die FA-Muster der einzelnen Lipidfraktionen (Abb. 3.49 (B), (C) und (D)) der HT-29-Zellen sind vergleichbar mit denen der V79-Zellen (s. 3.3.1, Abb. 3.43 (B), (C) und (D)).

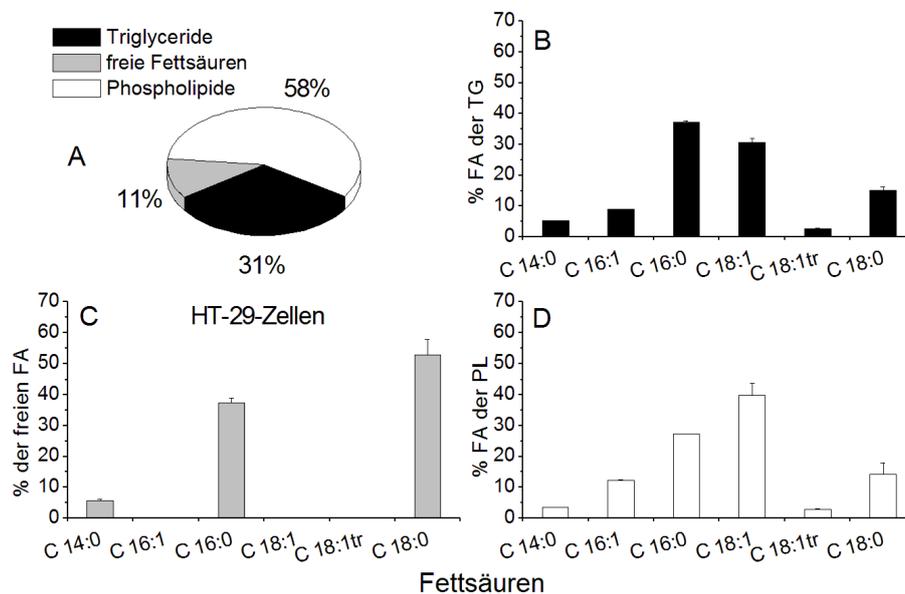


Abbildung 3.49.: Verteilung der Gesamtmenge an Fettsäuren auf die einzelnen Lipidfraktionen von HT-29-Zellen (A); Fettsäuremuster der Triglyceride von HT-29-Zellen (B); freie Fettsäuren in HT-29-Zellen (C); Fettsäuremuster der Phospholipide in HT-29-Zellen (D); berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der einzelnen Lipidfraktionen; dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

Werden HT-29-Zellen wie in 3.3.1 für 3 h mit FFAs inkubiert ist festzustellen, dass der in den Lipidfraktionen der PLs und TGs nachweisbare Anteil an FFAs von 10,12-FFA über 9,11-FFA zu 8,10-FFA hin abnimmt (Abb. 3.50). Freie FFAs sind nicht nachweisbar und

### 3. Ergebnisse

FFA-haltige CEs werden nicht gebildet. Wie in Abbildung 3.50 (B), (D) und (F) dargestellt ist, bestehen die FAs der TG-Fraktion nach 3 h Inkubation zu 30% aus 8,10-, zu 40% aus 9,11-FFA bzw. zu 45% aus 10,12-FFA. In den Fraktionen der PLs (Abb. 3.50 (A), (C) und (E)) sind die Anteile an den FAs der Lipidfraktion mit 10% für 8,10-, 15% für 9,11-FFA und 15% für 10,12-FFA geringer. Im Vergleich zu V79-Zellen (s. 3.3.1) wird in HT-29-Zellen ein entsprechend geringerer Anteil der FAs in den Lipidfraktionen durch FFAs substituiert. In den Fraktionen der PLs von HT-29-Zellen wird überwiegend C 18:1 und in den Fraktionen der TGs C 16:0 und C 18:1 durch die eingesetzten FFAs substituiert.

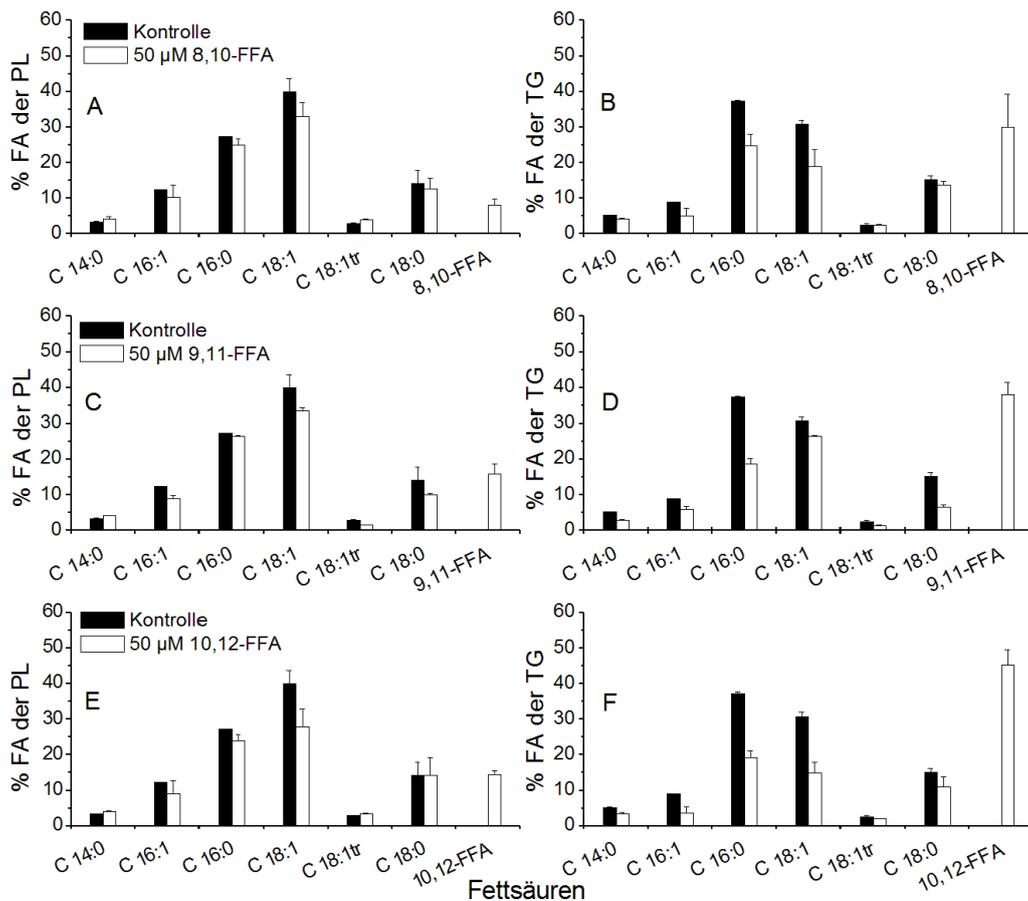


Abbildung 3.50.: Fettsäureverteilung nach Inkubation mit 8,10-FFA in Phospholipiden (A) und Triglyceriden (B), nach Inkubation mit 9,11-FFA in Phospholipiden (C) und Triglyceriden (D) und nach Inkubation mit 10,12-FFA in Phospholipiden (E) und Triglyceriden (F) von HT-29-Zellen;  $c(\text{FFA}) = 50 \mu\text{M}$ ;  $t = 3 \text{ h}$ ; berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der einzelnen Lipidfraktionen; dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

### 3. Ergebnisse

In Tabelle 3.8 ist wiedergegeben, wie sich die Verteilung der FAs auf die Lipidfraktionen von HT-29-Zellen unter dem Einfluss von 8,10-, 9,11- und 10,12-FFA verändern. Wie bei V79-Zellen kommt es zu einer Zunahme der TG-Fraktion. Diese ist jedoch nicht so ausgeprägt wie bei V79-Zellen. Als Kontrolle dienen nicht inkubierte HT-29-Zellen (Abb. 3.49 (A)).

Tabelle 3.8.: Verteilung der Fettsäuren von HT-29-Zellen auf die Lipidfraktionen der Phospholipide, Triglyceride und freien Fettsäuren nach 3 h Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  8,10-, 9,11- bzw. 10,12-FFA;  $c(\text{FFA}) = 50 \mu\text{M}$ ;  $t = 3\text{h}$ ; berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der einzelnen Lipidfraktionen

Lipidfraktion	Kontrolle	8,10-FFA	9,11-FFA	10,12-FFA
TG	31%	34%	39%	42%
PL	58%	56%	51%	48%
freie FA	11%	10%	10%	10%

#### 3.3.3. Einbau von Furanfettsäuren in Lipide von HepG2-Zellen

FAs werden nach der Resorption im Darm in Form von TGs in Lipoproteine eingelagert. Freie FAs werden an Albumin gebunden. Auf diese Weise können sie im Blut transportiert werden. Dadurch gelangen sie in die Leber, wo in den Hepatocyten ein Großteil des FA-Stoffwechsels stattfindet. Es war daher von Interesse den Einbau von FFAs in HepG2-Zellen, einer humanen Lebercarcinomzelllinie, zu untersuchen. Die Inkubationen wurden für 3 h mit FKS-freiem Medium, mit Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  8,10-, 9,11- und 10,12-FFA durchgeführt (s. 6.2.6.1). Die Fraktionierung der Zellen und die Bestimmung der FA-Muster der Fraktionen erfolgte wie in 3.3.1 für V79-Zellen beschrieben.

Die Betrachtung der FA-Muster der Lipidfraktionen und der Verteilung der FAs auf die Lipidfraktionen von HepG2-Zellen (Abb. 3.51) dient auch hier als Ausgangspunkt für die Untersuchungen. Im Vergleich zu den beiden anderen beiden Zelllinien (V79, HT-29) liegt bei HepG2-Zellen nur ein Drittel der Gesamtmenge an FAs in der Fraktion der PLs vor (Abb. 3.51 (A)). Dafür weisen sie einen hohen Anteil an Speicherlipiden auf. 56% der FAs liegen gebunden in Form von TGs und 3% in Form von CEs vor. Der in den TG- und PL-Fraktionen enthaltene Anteil an C 18:1tr11 (Abb. 3.51 (B) und (D)) ist größer als bei V79- und HT-29-Zellen. Es liegen bei HepG2-Zellen außerdem auch ungesättigte FAs frei vor (Abb. 3.51 (C)).

### 3. Ergebnisse

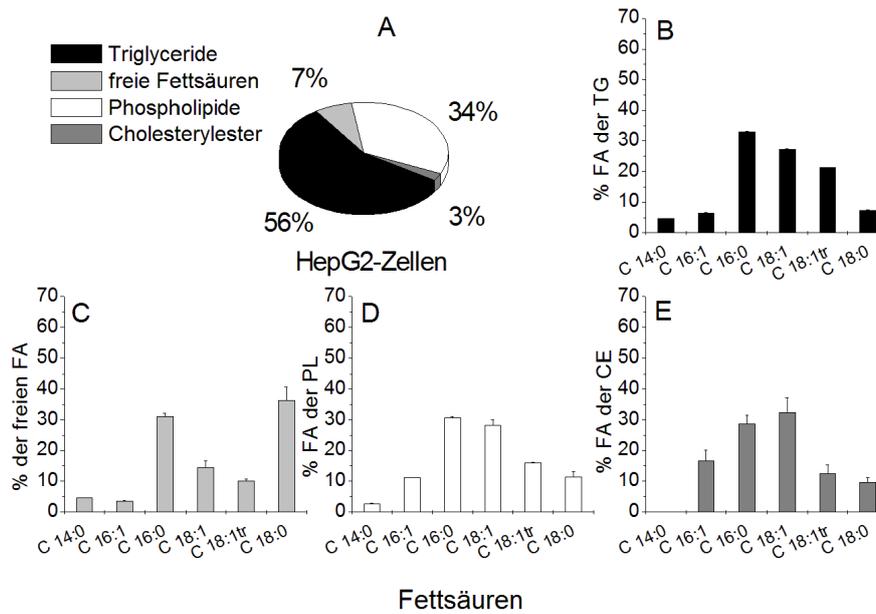


Abbildung 3.51.: Verteilung der Gesamtmenge an Fettsäuren auf die einzelnen Lipidfraktionen von HepG2-Zellen (A); Fettsäuremuster der Triglyceride von HepG2-Zellen (B); freie Fettsäuren in HepG2-Zellen (C); Fettsäuremuster der Phospholipide in HepG2-Zellen (D); Fettsäuremuster der Cholesterylester in HepG2-Zellen (E); berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der einzelnen Lipidfraktionen; dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

Aus Abbildung 3.52 geht hervor, dass nach 3 h Inkubation bei HepG2-Zellen 10,12-FFA und 9,11-FFA ebenfalls zu größeren Anteilen in den Lipiden der Zellen nachweisbar sind als 8,10-FFA. Freie FFAs sind nicht zu detektieren und in CEs werden keine FFAs eingebaut. Nach 3 h Inkubation bestehen die TG-Fraktionen (Abb. 3.50 (B), (D) und (F)) zu 9% aus 8,10-, zu 17% aus 9,11-FFA bzw. zu 18% aus 10,12-FFA. In den PLs (Abb. 3.50, (A), (C) und (E)) ist nur ein Anteil von 5% 8,10-, 7% 9,11-FFA bzw. 10% 10,12-FFA an den FAs der Fraktionen nachweisbar. In HepG2-Zellen wird im Vergleich zu V79- und HT-29-Zellen der geringste Anteil an FAs durch FFAs substituiert. Von der Substitution durch FFAs am stärksten betroffen sind in der PL-Fraktion C 18:0 und C 18:1, sowie in der TG-Fraktion C 16:0, C 18:1 und C 18:1tr11.

Im Gegensatz zu V79- und HT-29-Zellen führen die Inkubationen mit FFAs jedoch nicht zu einer Zunahme der FAs in der TG-Fraktion sondern zu einer Zunahme der FAs in der PL-Fraktion (Tab. 3.9).

### 3. Ergebnisse

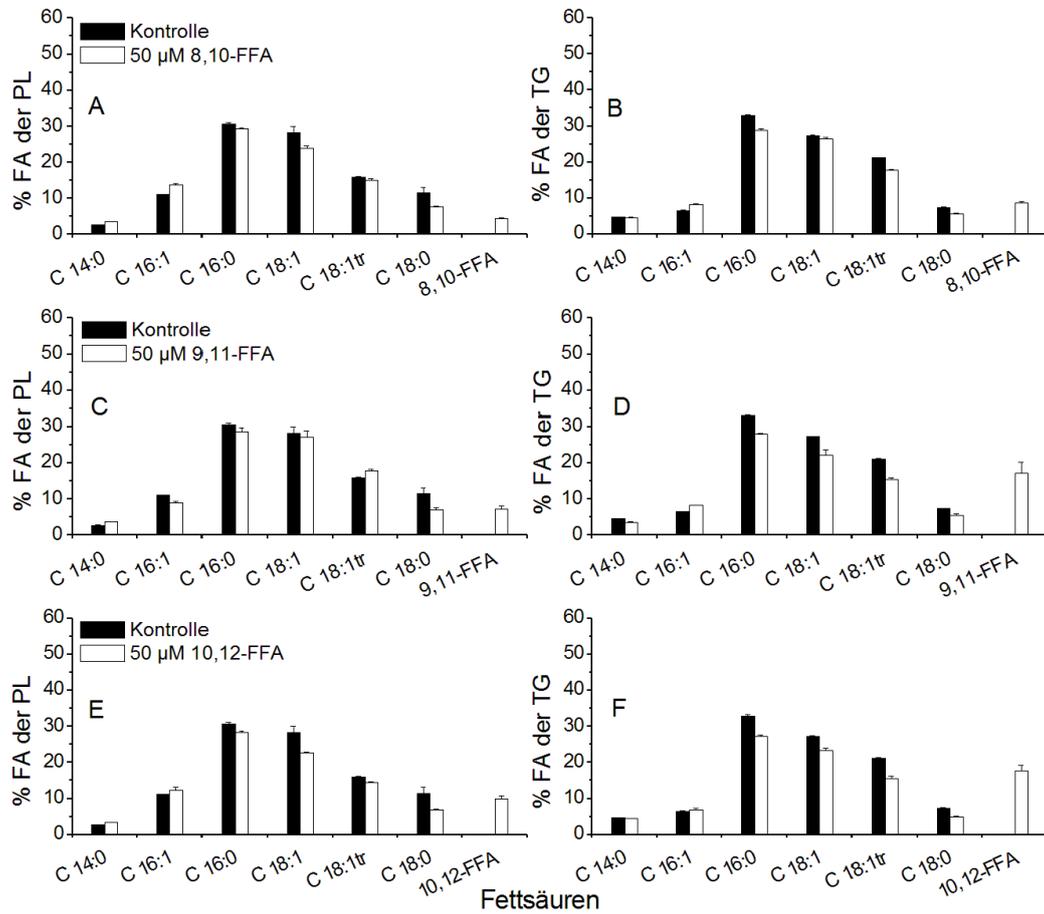


Abbildung 3.52.: Fettsäureverteilung nach Inkubation mit 8,10-FFA in Phospholipiden (A) und Triglyceriden (B), nach Inkubation mit 9,11-FFA in Phospholipiden (C) und Triglyceriden (D) und nach Inkubation mit 10,12-FFA in Phospholipiden (E) und Triglyceriden (F) von HepG2-Zellen;  $c(\text{FFA}) = 50 \mu\text{M}$ ;  $t = 3 \text{ h}$ ; berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der einzelnen Lipidfraktionen; dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

### 3. Ergebnisse

Tabelle 3.9.: Verteilung der Fettsäuren von HepG2-Zellen auf die Lipidfraktionen der Phospholipide, Triglyceride und freien Fettsäuren nach 3 h Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  8,10- bzw. 10,12-FFA;  $c(\text{FFA}) = 50 \mu\text{M}$ ; berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der einzelnen Lipidfraktionen

Lipidfraktion	Kontrolle	8,10-FFA	9,11-FFA	10,12-FFA
TG	56%	44%	46%	45%
PL	34%	45%	46%	45%
freie FA	7%	8%	5%	7%
CE	3%	3%	3%	3%

#### 3.3.4. Gegenüberstellung der eingesetzten Zelllinien

Im folgenden Abschnitt werden Parameter wie Volumina, Gesamtmenge an FAs pro  $10^6$  Zellen, das Verhältnis von PL/ChOL und die absolute Menge an eingebauten FFAs in den Lipidfraktionen der einzelnen Zelllinien gegenübergestellt. Dadurch ist es möglich den Einbau der FFAs in die verschiedenen Zelllinien zu vergleichen.

Betrachtet man die Gesamtmenge an FAs in  $10^6$  Zellen, so ist zu sehen, dass sich die Absolutgehalte an FAs deutlich unterscheiden (Abb. 3.53). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die verwendeten Zelllinien unterschiedliche Volumina und Durchmesser aufweisen (Tab. 3.10).

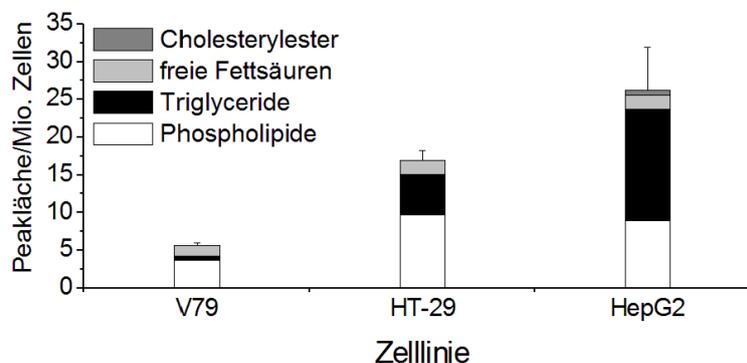


Abbildung 3.53.: Gesamtmenge an Fettsäuren in  $10^6$  V79-, HT-29- und HepG2-Zellen in den vier Lipidfraktionen der PL, freien FA, CE und TG; dargestellt sind die Mittelwerte der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus zwei unabhängigen GC-FID-Analysen der einzelnen Lipidfraktionen  $\pm$  Schwankungsbreite

### 3. Ergebnisse

Tabelle 3.10.: Durchmesser und Volumina von V79-, HT-29- und HepG2-Zellen

Zelllinie	V79	HT-29	HepG2
Durchmesser [ $\mu\text{m}$ ]	10,9	14,4	15,0
Volumen [ $10^{-13}$ l]	6,7	15,7	17,7

HT-29- und HepG2-Zellen weisen größere Durchmesser und Volumina als V79-Zellen auf. Die gesamten Oberflächen der Membranen sind daher größer, was sich in einer erhöhten Menge an FAs in der Fraktion der PLs zeigt. Bei vergleichbarem Zelldurchmesser besitzen beide Zelllinien eine vergleichbare Absolutmenge an FAs in der PL-Fraktion. Außerdem sind bei den HT-29- und HepG2-Zellen die Gehalte an Speicherlipiden deutlich höher als bei den V79-Zellen. Normiert man die Peakflächen der FAs pro  $10^6$  Zellen zusätzlich auf das Volumen der Zellen (Abb. 3.54), so sieht man, dass der Anteil an Membranlipiden bei allen drei Zelllinien vergleichbar ist. V79-Zellen weisen bezogen auf das Volumen den geringsten Gehalt an Gesamtfettsäuren auf, was auf den geringen Anteil an Speicherlipiden zurückzuführen ist.

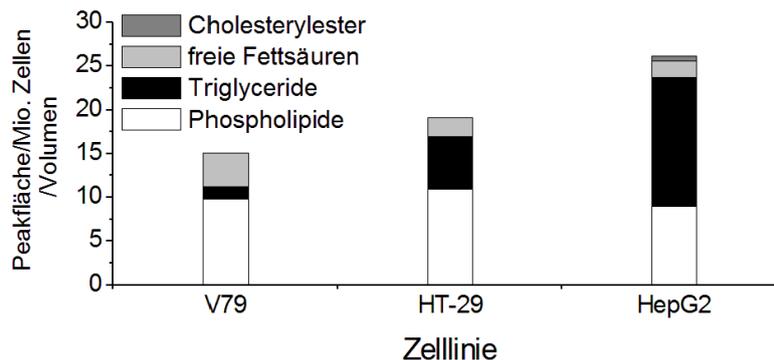


Abbildung 3.54.: Gesamtmenge an Fettsäuren in  $10^6$  V79-, HT-29- und HepG2-Zellen in den vier Lipidfraktionen der PL, freien FA, CE und TG, normiert auf das Volumen der Zellen

In Tabelle 3.11 sind die Verhältnisse der PLs zum freien ChOL in den Membranen der eingesetzten Zelllinien wiedergegeben. Diese werden wie in 6.2.1.4 beschrieben aus den Peakflächen der FSMEs der PL-Fraktion und des freien ChOLs mit Hilfe eines Responsefaktors berechnet. Es ist zu sehen, dass V79- und HT-29-Zellen ein vergleichbares PL/ChOL-Verhältnis besitzen. HepG2-Zellen hingegen weisen einen höheren Anteil an PLs in den Membranen auf. Wie in den Abschnitten 3.3.1, 3.3.2 und 3.3.3 gezeigt wurde, verändern sich bei allen drei Zelllinien bei einer Inkubation von 3 h mit FFAs die Anteile der Lipidfraktionen an der Gesamtmenge der FAs. Dies hat bei V79- und HT-29-Zellen, bei denen

### 3. Ergebnisse

es zu einer Zunahme des Anteils der TG-Fraktion kommt (Tab. 3.6 und Tab. 3.8), nur eine marginale Wirkung auf das PL/ChOL-Verhältnis zur Folge. HepG2-Zellen, bei denen der Anteil der PL-Fraktion an den Gesamtlipiden nach Inkubation mit den FFAs stark zunimmt (Tab. 3.9), zeigen nach 3 h Inkubation mit FFAs eine Erhöhung des PL/ChOL-Verhältnisses.

Tabelle 3.11.: Mengenverhältnis von Phospholipiden zu freiem Cholesterol in den Membranen von V79-, HT-29- und HepG2-Zellen; berechnet anhand der in 6.2.1.4 angegebenen Formel

Verhältnis PL/ChOL	V79-Zellen	HT-29-Zellen	HepG2-Zellen
Kontrolle	3,5:1	4,0:1	5,9:1
8,10-FFA	3,7:1	4,1:1	7,4:1
9,11-FFA	3,8:1	4,2:1	8,0:1
10,12-FFA	3,7:1	4,3:1	8,6:1

### 3. Ergebnisse

Vergleicht man das Vermögen der eingesetzten Zelllinien FFAs in ihre Speicher- und Membranlipide einzubauen wird deutlich, dass in V79-Zellen der größte Anteil der gesamten FAs durch FFAs substituiert wird (Abb. 3.55). 10,12-FFA in den Membranen macht nach 3 h Inkubation annähernd ein Drittel der FAs der gesamten Zellen aus. Dabei ist der größere Anteil der FFAs in den Membranen gebunden. Die Anteile an 9,11-FFA in V79-Zellen liegen in den Lipidfraktionen nach 3 h Inkubation auf einem vergleichbaren Niveau. Die Anteile von 8,10-FFA an den gesamten FAs der Zellen sind sowohl in der TG-Fraktion als auch in der PL-Fraktion nach 3 h geringer als die Anteile von 9,11- und 10,12-FFA.

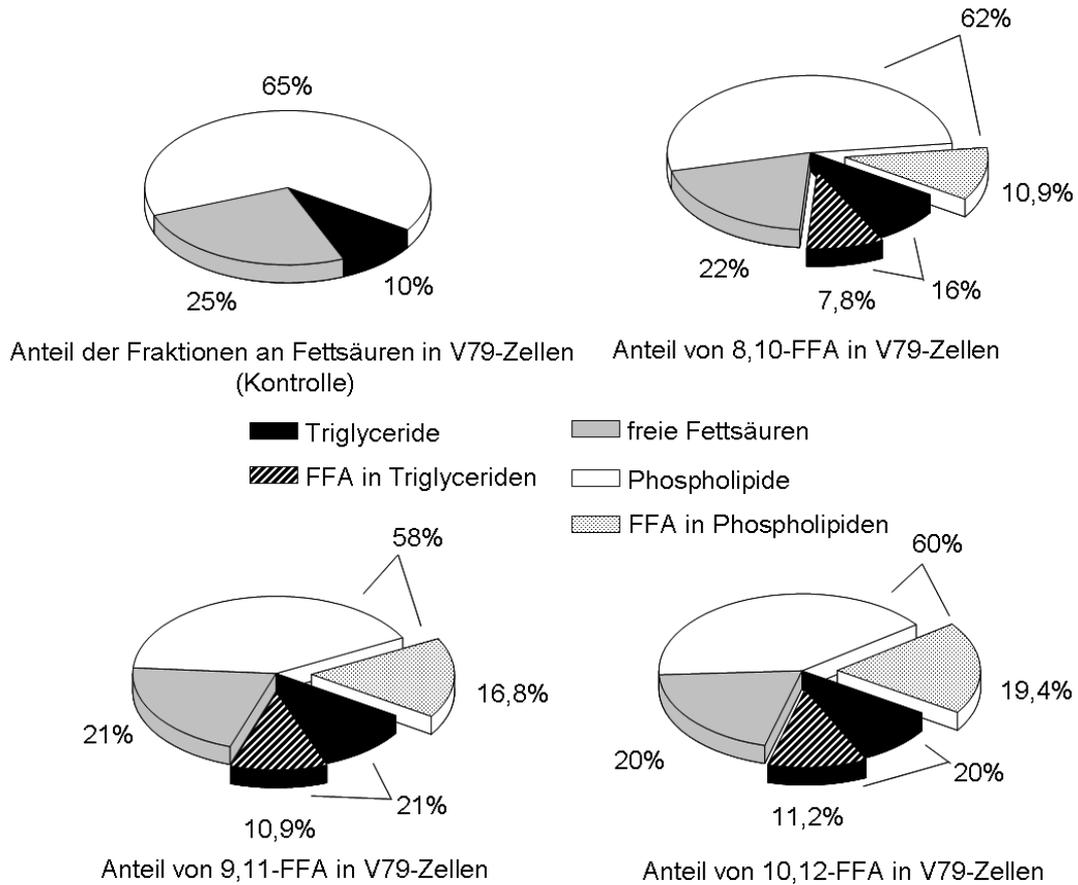


Abbildung 3.55.: Prozentualer Anteil der 8,10-, 9,11- und 10,12- FFA in den Fraktionen bezogen auf die Gesamtmenge an Fettsäuren von V79-Zellen nach 3 h Inkubation ohne FKS;  $c(\text{FFA}) = 50 \mu\text{M}$ ; berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der Lipidfraktionen

Bei HT-29-Zellen ist der in den PL enthaltene Anteil der FFAs an den gesamten FAs der Zelle deutlich geringer, als bei V79-Zellen (Abb. 3.56). So betragen die in die PL-Fractionen eingebaute Anteil der FFAs nur zwischen 5% und 8% der gesamten FAs der Zellen. Wie in 3.3.1 und 3.3.2 gezeigt wurde ist in HT-29-Zellen der Anteil der FFAs in den TG-Fractionen

### 3. Ergebnisse

vergleichbar mit dem in V79-Zellen. Da die TG-Fraktion bereits bei nicht inkubierten HT-29-Zellen deutlich größer ist als bei V79-Zellen und in Folge der Inkubation zusätzlich zunimmt, ist der Anteil der FFAs, die in der TG-Fraktion gebunden sind an den gesamten FAs der HT-29-Zellen mit 10% bis 19% jedoch höher als in V79-Zellen. Der Anteil der FFAs an den gesamten FAs von HT-29-Zellen ist dennoch geringer als bei V79-Zellen.

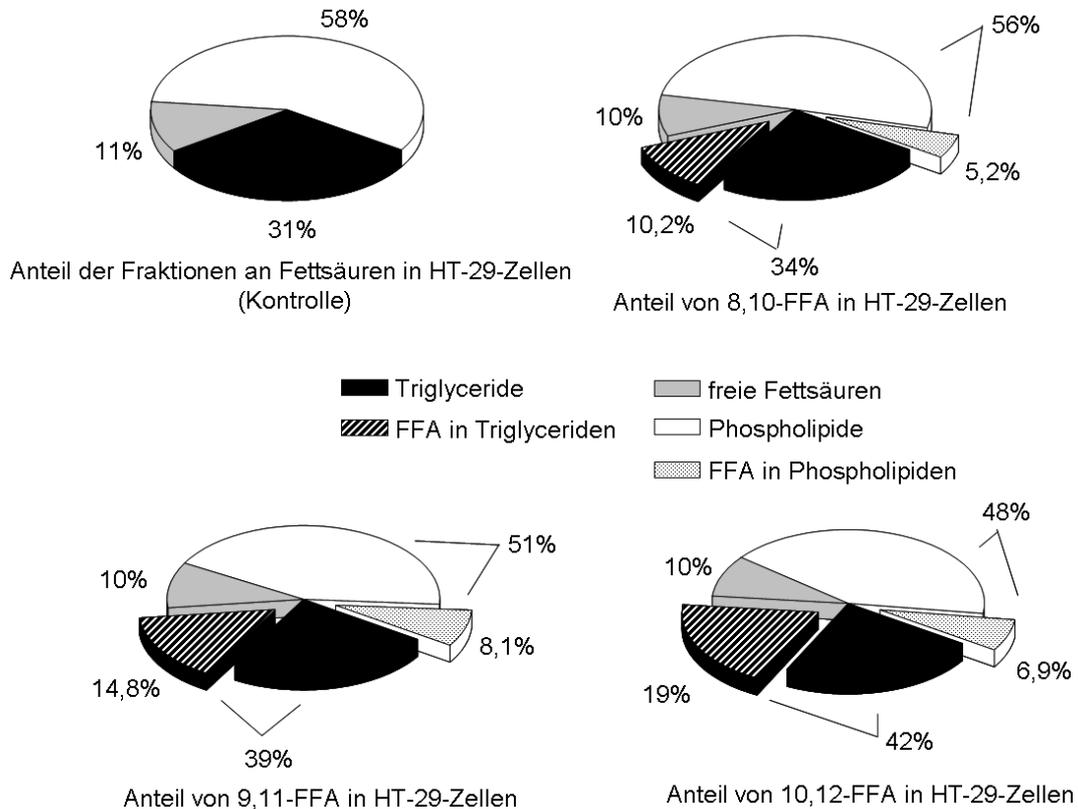


Abbildung 3.56.: Prozentualer Anteil der 8,10-, 9,11- und 10,12-FFA in den Fraktionen bezogen auf die Gesamtmenge an Fettsäuren von HT-29-Zellen nach 3 h Inkubation ohne FKS;  $c(\text{FFA}) = 50 \mu\text{M}$ ; berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der Lipidfraktionen

Abbildung 3.57 zeigt, dass bei HepG2-Zellen mit Abstand der geringste Teil der FAs der PLs durch FFAs substituiert wird. Trotz der deutlichen Zunahme des Anteils der PL-Fraktion machen die FFAs in den PL nur 2% bis 4% der gesamten FAs der Zellen aus. In der TG-Fraktion wird der größere Teil der FFAs eingebaut. In TG gebundene FFAs machen 4% bis 8% der FAs der gesamten HepG2-Zellen aus. Insgesamt wird in HepG2-Zellen der geringste Anteil der gesamten FAs durch FFAs substituiert.

Betrachtet man die Stoffmengen der in den Lipidfraktionen der V79-Zellen nachgewiesenen FFAs (Tab. 3.12), so ist zu sehen, dass der Gehalt an 10,12-FFA am größten, der Gehalt an 8,10-FFA am geringsten ist. Bei den anderen beiden Zelllinien bestätigt sich dieses Bild für 8,10- und 9,11-FFA. In allen drei Zelllinien sind vergleichbare Stoffmengen von 8,10- und

### 3. Ergebnisse

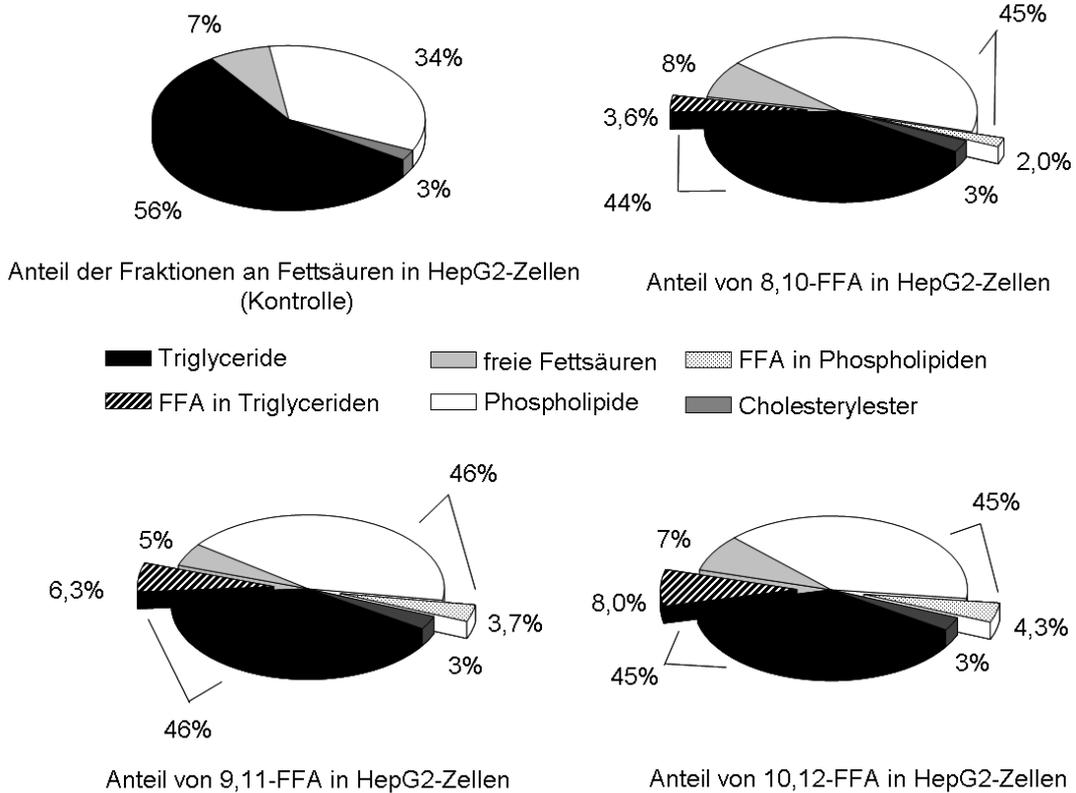


Abbildung 3.57.: Prozentualer Anteil der 8,10-, 9,11- und 10,12-FFA in den Fraktionen bezogen auf die Gesamtmenge an Fettsäuren von HepG2-Zellen nach 3 h Inkubation ohne FKS;  $c(\text{FFA}) = 50 \mu\text{M}$ ; berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der Lipidfraktionen

9,11-FFA nach einer Inkubationsdauer von 3 h nachweisbar. Die unterschiedlichen Anteile der FFAs an den gesamten FAs der Zellen ergeben sich daher aus den Unterschieden in der Menge der Gesamtlipide der Zelllinien. Die im Medium verbliebenen Stoffmengen der FFAs sind stets vergleichbar. Da bei den Substanzkontrolle kein Verlust von 8,10- und 9,11-FFA im Kulturmedium festzustellen ist (s. 6.2.6.6, Tab. 6.5) muss der Grund in einem schnelleren Abbau der 8,10-FFA im Vergleich zur 9,11-FFA liegen.

#### 3.3.5. Abbau von Fettsäuren in Lipiden von V79-Zellen

Wie in 3.3.4 gezeigt werden konnte nehmen die nach 3 h Inkubation in V79-Zellen nachgewiesenen Gehalte der FFAs von 10,12-FFA zu 8,10-FFA hin ab. Die im Medium verbliebenen Mengen an 8,10- und 9,11-FFA waren dennoch vergleichbar. Daher war die Absicht den stattfindenden Abbau von FFAs in den Lipidfraktionen von Zellen zu untersuchen. Dazu wurde die Zeitabhängigkeit des Abbaus von FFAs in Lipiden von V79-Zellen zu betrachtet

### 3. Ergebnisse

Tabelle 3.12.: Stoffmengen an Furanfettsäuren in den Lipidfraktionen der Triglyceride und Phospholipide sowie im Inkubationsmedium von V79-, HT-29- und HepG2-Zellen nach 3 h Inkubation ( $c(\text{FFA}) = 50 \mu\text{M}$ ); die Berechnung der Stoffmengen in den Lipidfraktionen erfolgt unter Berücksichtigung der Wiederfindungen der SPE-Methode nach Extraktion (s. 6.2.5.1, Tab. 6.4); angegeben sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite; n.b. = nicht bestimmt

Zelllinie	V79			HT-29		HepG2	
FFA	8,10	9,11	10,12	8,10	9,11	8,10	9,11
TG [nmol]	44,3 $\pm 1,4$	69,4 $\pm 1,8$	90,9 $\pm 36,9$	78,7 $\pm 22,3$	122,1 $\pm 3,3$	72,0 $\pm 15,7$	119,8 $\pm 8,0$
PL [nmol]	66,0 $\pm 5,7$	94,1 $\pm 11,3$	113,3 $\pm 25,1$	45,8 $\pm 7,2$	67,4 $\pm 6,7$	55,0 $\pm 6,6$	70,1 $\pm 6,3$
Gesamt [nmol]	110,3 $\pm 7,2$	163,5 $\pm 9,4$	204,2 $\pm 62,0$	124,5 $\pm 29,5$	189,6 $\pm 10,0$	127,0 $\pm 22,3$	189,9 $\pm 1,7$
Medium [nmol]	77,9 $\pm 2,2$	62,4 $\pm 7,8$	n.b.	81,1 $\pm 5,0$	67,8 $\pm 12,0$	68,5 $\pm 4,1$	77,7 $\pm 6,2$
Summe [nmol]	188,2 $\pm 8,1$	225,8 $\pm 15,6$	n.b.	205,6 $\pm 19,9$	257,4 $\pm 20,4$	195,4 $\pm 14,5$	267,5 $\pm 4,5$

(s. 6.2.6.2). C 18:2 diente dabei als Vergleichssubstanz für die Untersuchung der Zeitabhängigkeit des Abbaus einer natürlich vorkommenden FA. Nach 3 h Inkubation von V79-Zellen wurden substanzfreie Nachinkubationen durchgeführt. Anschließend wurde das Lysat der Zellen mittels SPE fraktioniert (s. 6.2.5.1) und die enthaltene Menge der eingesetzten FAs mittels GC-FID bestimmt.

Beim Vergleich des Abbaus von 8,10-FFA (Abb. 3.58 (A)), 9,11-FFA (Abb. 3.58 (B)) und 10,12-FFA (Abb. 3.59) in V79-Zellen ist festzustellen, dass bei allen drei FFAs über einen Zeitraum von 3 h der Abbau in der TG-Fraktion schneller verläuft, als in der PL-Fraktion. Die Nachinkubation von mit 10,12-FFA inkubierten V79-Zellen über einen längeren Zeitraum als 3 h zeigt außerdem, dass bereits nach dieser Zeit der Abbau der FFA weitestgehend fortgeschritten ist. Bis hin zu 48 h kommt es in den TGs zu einer weiteren Abnahme von 10,12-FFA von 4 nmol (nach 3 h) auf 1 nmol. In den PLs nimmt 10,12-FFA in diesem Zeitraum von 45 nmol (nach 3 h) auf 15 nmol ab.

Der Abbau von C 18:2 in V79-Zellen verläuft langsamer als der Abbau der FFAs (Abb. 3.60). C 18:2 wird ebenfalls in den TGs schneller abgebaut. Nach 3 h ist jedoch im Gegensatz zu den FFAs in der TG-Fraktion mit 55 nmol annähernd die Hälfte der anfänglichen 134 nmol noch nachweisbar. In den PLs ist nur ein geringer Abbau auszumachen. Nach 3 h sind noch 85 nmol der ursprünglichen 101 nmol an C 18:2 in den PLs der Zellen nachweisbar. In den

### 3. Ergebnisse

TGs sind nach 48 h wie bei 10,12-FFA noch ca. 1 nmol der C 18:2 nachweisbar. Die Stoffmenge von C 18:2 nach 48 h in der PL-Fraktion liegt mit 42 nmol deutlich höher als bei 10,12-FFA.

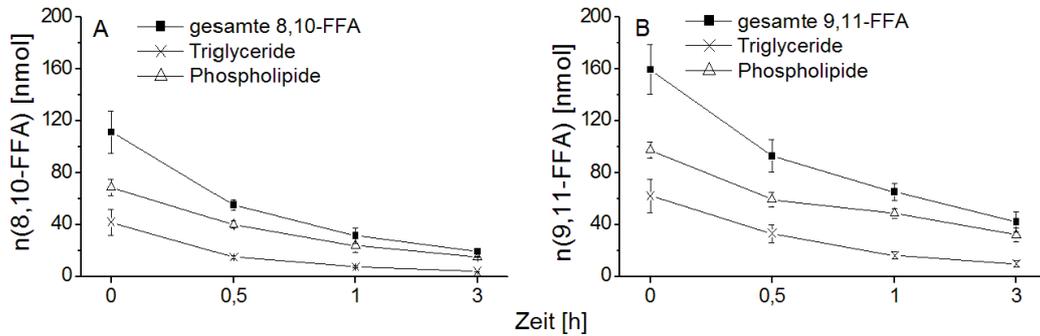


Abbildung 3.58.: Zeitlicher Verlauf der Abnahme der Stoffmenge von 8,10-FFA (A) und 9,11-FFA (B) in V79-Zellen nach substanzfreier Nachinkubation;  $c(\text{FFA}) = 50 \mu\text{M}$ ; die Berechnung der Stoffmengen in den Lipidfraktionen erfolgt unter Berücksichtigung der Wiederfindungen der SPE-Methode nach Extraktion (s. 6.2.5.1, Tab. 6.4); angegeben sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

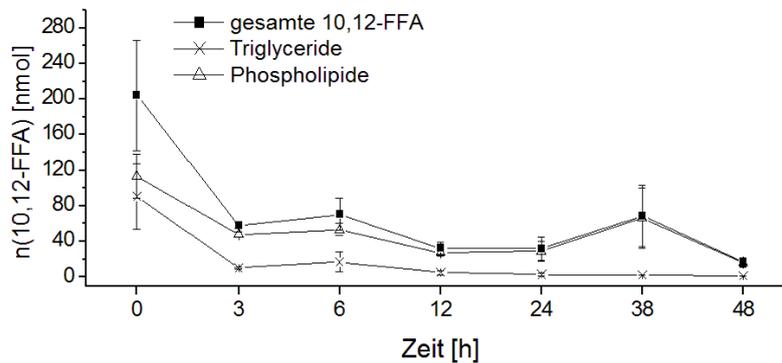


Abbildung 3.59.: Zeitlicher Verlauf der Abnahme der Stoffmenge von 10,12-FFA in V79-Zellen nach substanzfreier Nachinkubation;  $c(\text{FFA}) = 50 \mu\text{M}$ ; die Berechnung der Stoffmengen in den Lipidfraktionen erfolgt unter Berücksichtigung der Wiederfindungen der SPE-Methode nach Extraktion (s. 6.2.5.1, Tab. 6.4); angegeben sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

Betrachtet man die prozentualen Anteile der FFAs und C 18:2 bezogen auf die Stoffmengen, die nach 3 h Vorinkubation in den Lipidfraktionen von V79-Zellen nachweisbar sind (Tab. 3.13), so ist festzustellen, dass 8,10-FFA am schnellsten abgebaut wird. Bereits nach 0,5 h sind in der TG-Fraktion nur noch 36% der ursprünglichen Menge nachweisbar, während von 9,11-FFA noch ungefähr die Hälfte vorhanden ist. Nach 3 h ist von allen drei FFAs

### 3. Ergebnisse

ein vergleichbarer Anteil der anfangs nachgewiesenen Stoffmenge in den TGs vorhanden. In der PL-Fraktion macht sich der Unterschied im Abbau bei 8,10- und 9,11-FFA erst nach 1 h bemerkbar. Nach 3 h wird jedoch deutlich, dass auch hier 8,10-FFA im Vergleich zu 9,11- und 10,12-FFA einem verstärkten Abbau unterliegt. Von C 18:2 sind im Vergleich zu allen drei FFAs nach 3 h wesentlich größere Anteile der Ausgangsstoffmenge in den Lipidfraktionen nachweisbar.

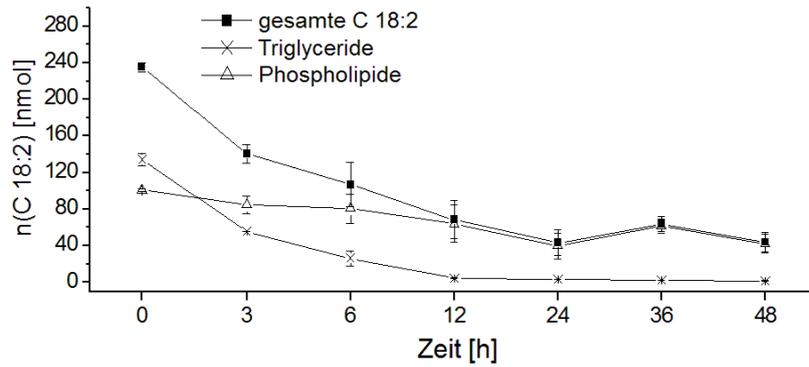


Abbildung 3.60.: Zeitlicher Verlauf der Abnahme der Stoffmenge von Linolsäure in V79-Zellen nach substanzfreier Nachinkubation;  $c(\text{C } 18:2) = 50 \mu\text{M}$ ; die Berechnung der Stoffmengen in den Lipidfraktionen erfolgt unter Berücksichtigung der Wiederfindungen der SPE-Methode nach Extraktion (s. 6.2.5.1, Tab. 6.4); angegeben sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

Tabelle 3.13.: Prozentuale Anteile der in V79-Zellen nachgewiesenen 8,10-FFA, 9,11-FFA, 10,12-FFA und Linolsäure nach substanzfreier Nachinkubation, bezogen auf die nach 3 h Vorinkubation nachgewiesene Stoffmenge in den Lipidfraktionen der Zellen;  $c(\text{FA}) = 50 \mu\text{M}$ ; n.b. = nicht bestimmt

Zeit [h]	Fraktion	0,5	1	3
8,10-FFA	TG	36%	18%	10%
8,10-FFA	PL	58%	35%	22%
9,11-FFA	TG	54%	27%	16%
9,11-FFA	PL	61%	50%	33%
10,12-FFA	TG	n.b.	n.b.	11%
10,12-FFA	PL	n.b.	n.b.	42%
C 18:2	TG	n.b.	n.b.	41%
C 18:2	PL	n.b.	n.b.	84%

### 3. Ergebnisse

In 3.1.2 konnten die Abbauprodukte von 8,10- und 10,12-FFA aus der  $\beta$ -Oxidation identifiziert werden. Es war daher von Interesse ob nach Abbau der FFAs in Zellkultur ebenfalls  $\beta$ -Oxidationsprodukte im Medium nachweisbar sind. Dafür wurden V79-Zellen wie in 6.2.6.3 beschrieben inkubiert. Der Mediumextrakt wurde nach Methylierung mittels GC-MS auf  $\beta$ -Oxidationsprodukte der jeweiligen FFA untersucht.

In Abbildung 3.61 ist dargestellt, dass im Mediumextrakt der mit 8,10-FFA inkubierten V79-Zellen zwei  $\beta$ -Oxidationsprodukte der FFA mittels GC-MS nachweisbar sind. Die Abbauprodukte sind nur im Spurenbereich im Medium nachweisbar, weswegen hier die entsprechenden Massenspuren dargestellt sind. Die Massenspektren und Retentionszeiten der Abbauprodukte von 8,10-FFA mit den Molekülonen  $m/z = 280$  und  $m/z = 252$  stimmen mit denen in 3.1.2 wiedergegebenen Daten überein. Das Endprodukt der  $\beta$ -Oxidation (Molekülion  $m/z = 252$ ) ist nach 24 h Nachinkubation in größerer Menge nachweisbar als das Zwischenprodukt (Molekülion  $m/z = 280$ ). Die Intermediate der  $\beta$ -Oxidation, die eine Hydroxy- oder Ketogruppe am Säurerest aufweisen (s. 3.1.2, Tab. 3.4) sind im Mediumextrakt nicht nachweisbar.

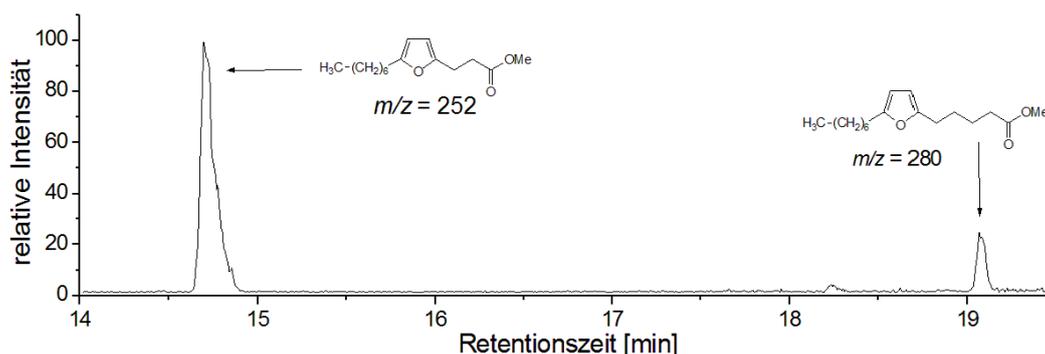


Abbildung 3.61.: GC-MS-Chromatogramm (Massenspuren:  $m/z = 252$ ;  $m/z = 280$ ) des Mediumextrakts der 3 h Inkubation von V79-Zellen mit 50  $\mu$ M 8,10-FFA und anschließender 24 h Nachinkubation nach Methylierung mit TMSH

Nach 3 h Inkubation mit 10,12-FFA und anschließender 24 h substanzfreier Nachinkubation sind im Mediumextrakt ebenfalls zwei  $\beta$ -Oxidationsprodukte nachweisbar (Abb. 3.62). Die Abbauprodukte sind wie bei 8,10-FFA nur in Spuren im Medium detektierbar, weswegen hier ebenfalls das GC-MS-Chromatogramm der entsprechenden Massenspuren dargestellt ist. Das Abbauprodukt mit dem Molekülion  $m/z = 224$  stellt hier ebenfalls das Endprodukt der  $\beta$ -Oxidation dar und ist in größerer Menge nachweisbar als das Zwischenprodukt. Von den Zwischenprodukten ist nur 10,12-FFA nach zweifacher Ac-CoA-Abspaltung zu detektieren (Molekülion  $m/z = 252$ ). Beide nachweisbaren  $\beta$ -Oxidationsprodukte der 10,12-FFA stimmen in Retentionszeiten und Massenspektren mit denen in 3.1.2 beschriebenen über-

### 3. Ergebnisse

ein. Weder das Produkt nach einfacher Ac-CoA-Abspaltung, noch die Zwischenprodukte mit Hydroxy- oder Ketogruppe am Säurerest (s. 3.1.2, Tab. 3.4) sind im Mediumextrakt zu detektieren.

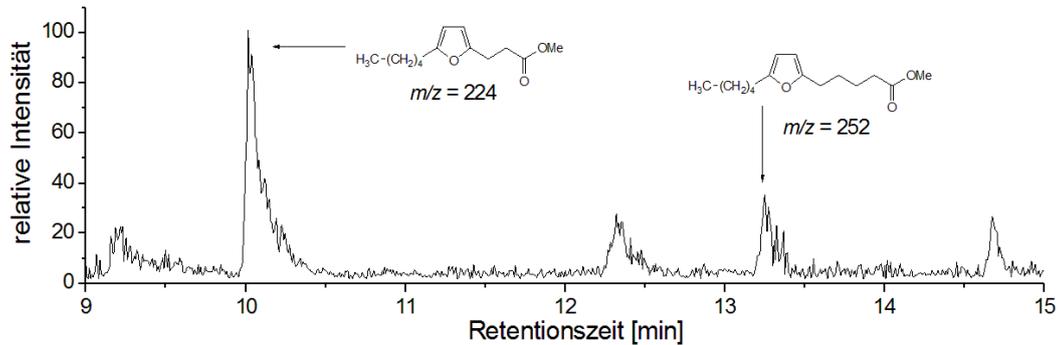


Abbildung 3.62.: GC-MS-Chromatogramm (Massenspuren:  $m/z = 224$ ;  $m/z = 252$ ) des Mediumextrakts der 3 h Inkubation von V79-Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  10,12-FFA und anschließender 24 h Nachinkubation nach Methylierung mit TMSH

## 3.4. Einfluss von Furanfettsäuren auf Lipide in Gewebe

Bisher wurde der Einfluss von FFAs auf Lipide von kultivierten Zellen betrachtet. Es war daher die Absicht den Einfluss von FFAs auf Lipide in Gewebekultur zu untersuchen, da die Inkubationen mit Präzisionsgewebeschnitten ein Modell darstellen, das sich der *in vivo* Situation annähert.

### 3.4.1. Gewebeschnitte

Um einen Vergleich zu kultivierten Zellen zu bekommen, wurde das FA-Muster und die Lipidzusammensetzung von Rattenleber und Rattenniere, nach erfolgter SPE-Trennung mittels GC-FID, auf dieselbe Weise wie in 3.3.1 untersucht. Es wurden dazu Leber- und Nierenschnitte von männlichen SD-Ratten verwendet.

Sowohl bei Rattenleber (Abb. 3.63 (A)), als auch bei Rattenniere (Abb. 3.64 (A)) beträgt der Anteil der FAs in der PL-Fraktion ca. zwei Drittel der Gesamtmenge der FAs. Die FAs der TG-Fraktion machen ca. ein Viertel der gesamten FAs der untersuchten Gewebe aus. Die restlichen FAs liegen frei oder gebunden in Form von CEs vor. Der Anteil an freien FAs ist dabei in der Rattenniere etwas höher. Im Gegensatz zu den kultivierten Zellen (s. 3.3) ist in Rattenleber und -niere C 18:2 und Arachidonsäure (C 20:4) nachweisbar. In

### 3. Ergebnisse

Rattenleber sind C 16:0, C 18:2, C 18:0 und C 20:4 die dominierenden FAs (Abb. 3.63 (B) bis (E)), in Rattenniere überwiegen C 16:0, C 18:0 und C 20:4 (Abb. 3.64 (B) bis (E)). Diese essentielle C 18:2 und C 20:4 liegen hauptsächlich in PLs und TGs gebunden vor. C 18:1tr11 kann hier erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden, da diese von Ratten im Organismus nicht gebildet werden kann und sie diese nicht über ihre Nahrung aufnehmen. Der Absolutgehalt an FAs in 1 mg Rattenleber und 1 mg Rattenniere ist vergleichbar (Abb. 3.65).

Da Rattenleber im Gegensatz zu Rattenniere, bei ungefähr gleicher Absolutmenge an FAs in der PL-Fraktion, einen niedrigeren Gehalt an freiem ChOL aufweist, ergeben sich für Rattenleber und Rattenniere unterschiedliche Verhältnisse von PL zu freiem ChOL (Berechnung: s. 6.2.1.4). Die Werte sind in Tabelle 3.14 wiedergegeben. Näherungsweise ist das PL/ChOL-Verhältnis von Rattenleber mit der von HepG2-Zellen (s. 3.3.4, Tab. 3.11) vergleichbar.

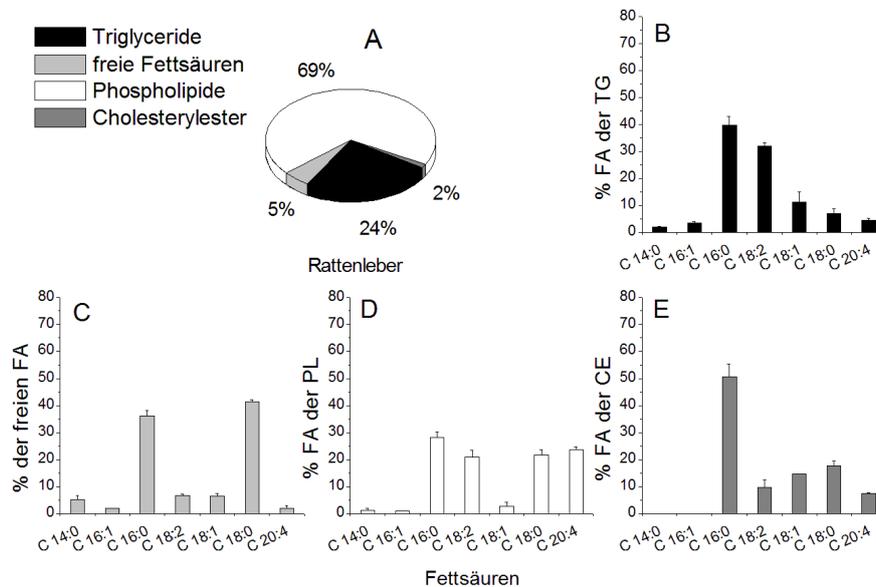


Abbildung 3.63.: Verteilung der Gesamtmenge an Fettsäuren auf die einzelnen Lipidfraktionen von Rattenleber (A); Fettsäuremuster der Triglyceride von Rattenleber (B); freie Fettsäuren in Rattenleber (C); Fettsäuremuster der Phospholipide von Rattenleber (D); Fettsäuremuster der Cholesterylester von Rattenleber (E); berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der einzelnen Lipidfraktionen; dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

### 3. Ergebnisse

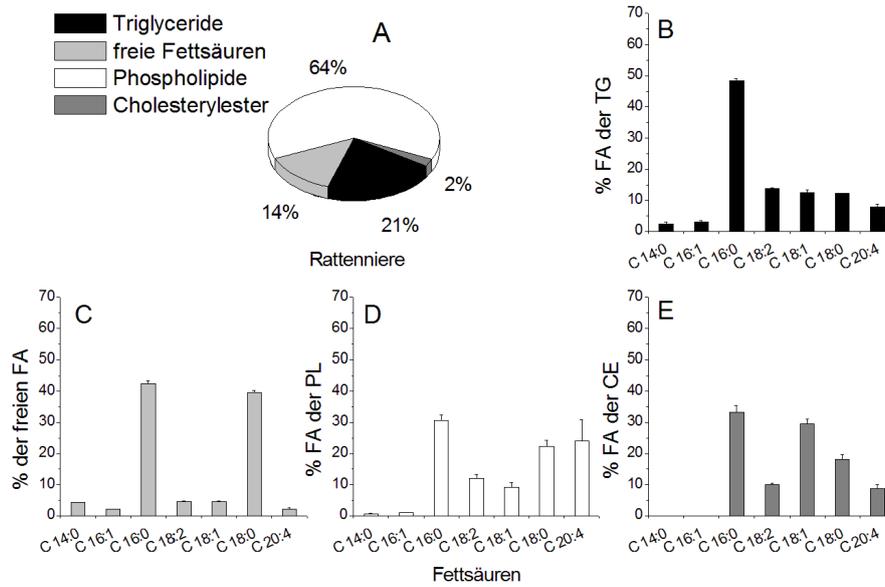


Abbildung 3.64.: Verteilung der Gesamtmenge an Fettsäuren auf die einzelnen Lipidfraktionen von Rattenniere (A); Fettsäuremuster der Triglyceride von Rattenniere (B); freie Fettsäuren in Rattenniere (C); Fettsäuremuster der Phospholipide von Rattenniere (D); Fettsäuremuster der Cholesterylester von Rattenniere (E); berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der einzelnen Lipidfraktionen; dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

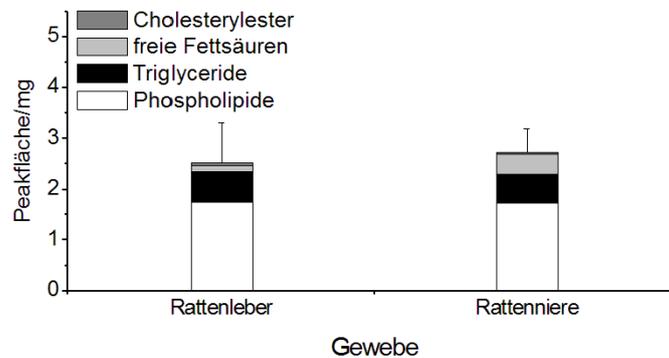


Abbildung 3.65.: Gesamtmenge an Fettsäuren in 1 mg Gewebe in den untersuchten Lipidfraktionen von Rattenniere und Rattenleber; dargestellt sind die Mittelwerte der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus zwei unabhängigen GC-FID-Analysen der einzelnen Lipidfraktionen  $\pm$  Schwankungsbreite

### 3. Ergebnisse

Tabelle 3.14.: Mengenverhältnis von Phospholipiden zu freiem Cholesterin in den Gewebemembranen von Rattenleber und Rattennieren; berechnet anhand der in 6.2.1.4 angegebenen Formel

Verhältnis:	Rattenleber	Rattenniere
PL/ChOL	6,8:1	4,1:1

#### 3.4.2. Einbau von Furanfettsäuren in Rattenleberschnitte

Zur Untersuchung des Einbaus von FFAs in Gewebe wurden Präzisionsgewebeschnitte männlicher SD-Ratten in Gewebekultur mit Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  8,10-, 9,11- und 10,12-FFA (nur 4 h) für 2 h und 4 h inkubiert (s. 6.2.7.4). Anschließend wurden die Leberschnitte homogenisiert und mittels SPE fraktioniert (s. 6.2.5.1). Es

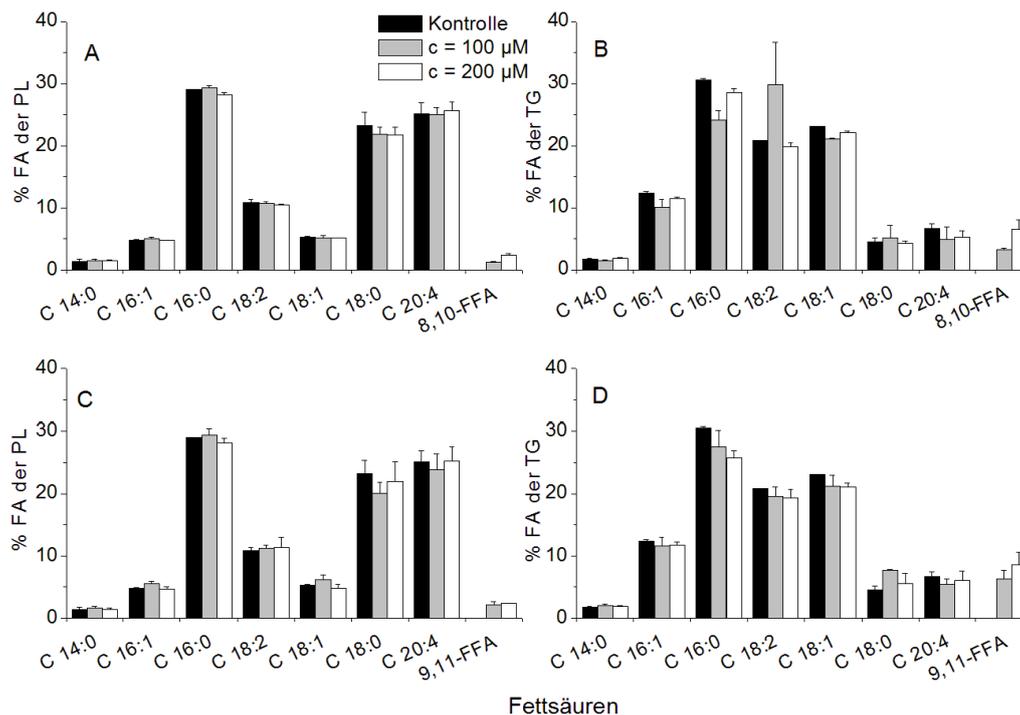


Abbildung 3.66.: Verteilung der Fettsäuren in SD-Rattenleber nach Inkubation mit 8,10-FFA in den Phospholipiden (A) und Triglyceriden (B) und nach Inkubation mit 9,11-FFA in den Phospholipiden (C) und Triglyceriden (D);  $t = 2$  h; berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der Lipidfraktionen; dargestellt sind Mittelwerte aus drei untersuchten Leberschnitten aus einem Versuch  $\pm$  S.D.

### 3. Ergebnisse

erfolgte eine Analyse der FA-Muster der Lipidfraktionen sowie eine Quantifizierung der Stoffmengen der FFAs im Gewebe und im Inkubationsmedium.

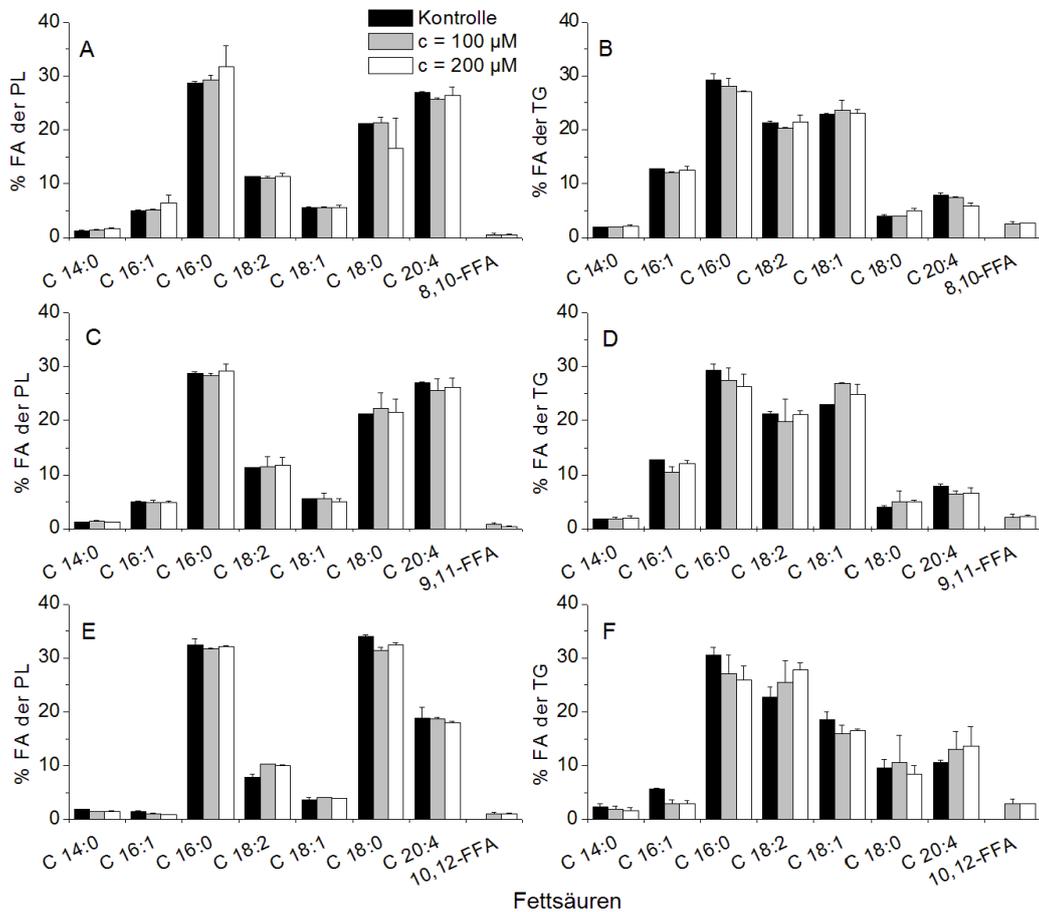


Abbildung 3.67.: Verteilung der Fettsäuren in SD-Rattenleber nach Inkubation mit 8,10-FFA in den Phospholipiden (A) und Triglyceriden (B), nach Inkubation mit 9,11-FFA in den Phospholipiden (C) und Triglyceriden (D) und nach Inkubation mit 10,12-FFA in den Phospholipiden (E) und Triglyceriden (F);  $t = 4$  h; berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der Lipidfraktionen; dargestellt sind Mittelwerte aus drei untersuchten Leberschnitten (8,10- und 9,11-FFA) bzw. zwei untersuchten Leberschnitten (10,12-FFA) aus einem Versuch  $\pm$  S.D. bzw. Schwankungsbreite

Betrachtet man die Verteilung der FAs in den Fraktionen der PLs und TGs von SD-Rattenleber nach einer Inkubationsdauer von 2 h, so ist festzustellen, dass nur ein geringer Anteil an 8,10- und 9,11-FFA in beiden Fraktionen nachweisbar ist. In den TG-Fraktionen liegen die Anteile der FFAs an den gesamten FAs der Fraktion zwischen 3,2% und 6,5% für 8,10-FFA (Abb. 3.66 (B)) und 6,3% und 8,6% für 9,11-FFA (Abb. 3.66 (D)). Die

### 3. Ergebnisse

Anteile der FFAs an FAs der PL-Fractionen (Abb. 3.66 (A) und (C)) liegen wie bei den Zellkulturversuchen (s. 3.3) darunter. Es ist nur eine minimale Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen.

Nach 4 h Inkubation von SD-Rattenleberschnitten mit FFAs ist zu erkennen, dass der Anteil der FFAs an den gesamten FAs der Lipidfraktionen geringer ist, als nach 2 h Inkubation (Abb. 3.67). So bestehen die TG-Fractionen nur noch zu maximal 2 - 3% aus FFAs (Abb. 3.67 (B), (D) und (F)). In den Fractionen der PLs (Abb. 3.67 (A), (C) und (E)) sind nur noch Spuren der FFAs nachweisbar. Eine Konzentrationsabhängigkeit ist nicht zu beobachten.

Die Supplementierung von FFAs nimmt in SD-Rattenleberschnitten keinen Einfluss auf die Verteilung der Lipidfraktionen. Das PL/ChOL-Verhältnis bleibt ebenfalls unbeeinflusst.

Tabelle 3.15.: Stoffmengen der in SD-Rattenleberschnitte eingebauten 8,10-FFA, 9,11-FFA und 10,12-FFA, sowie Stoffmengen der im Inkubationsmedium verbliebenen FFAs nach 2 h und 4 h Inkubation; angegeben sind Mittelwerte aus drei untersuchten Leberschnitten (8,10- und 9,11-FFA) bzw. zwei untersuchten Leberschnitten (10,12-FFA) und den zugehörigen Inkubationsmedien aus einem Versuch  $\pm$  S.D. bzw. Schwankungsbreite

FFA	8,10				9,11				10,12	
Zeit [h]	2		4		2		4		4	
Konz. [ $\mu$ M]	100	200	100	200	100	200	100	200	100	200
TG [nmol]	4,9 $\pm 0,2$	8,0 $\pm 1,2$	4,6 $\pm 0,1$	4,6 $\pm 0,2$	9,7 $\pm 0,9$	13,7 $\pm 2,7$	3,4 $\pm 0,3$	3,6 $\pm 0,4$	4,0 $\pm 2,9$	3,4 $\pm 0,6$
PL [nmol]	4,3 $\pm 0,4$	8,5 $\pm 0,5$	1,8 $\pm 0,6$	2,3 $\pm 0,5$	10,3 $\pm 1,7$	12,6 $\pm 1,6$	2,7 $\pm 0,3$	1,9 $\pm 0,8$	1,4 $\pm 0,5$	1,3 $\pm 0,3$
Gesamt-lipide [nmol]	9,2 $\pm 0,2$	16,5 $\pm 1,8$	6,4 $\pm 0,5$	6,9 $\pm 0,5$	20,0 $\pm 1,7$	26,3 $\pm 1,5$	6,1 $\pm 0,6$	5,5 $\pm 0,7$	5,4 $\pm 3,5$	4,7 $\pm 0,8$
Medium [nmol]	31,7 $\pm 7,4$	77,6 $\pm 13,6$	18,6 $\pm 2,1$	45,1 $\pm 1,3$	40,8 $\pm 11,0$	70,7 $\pm 7,3$	19,0 $\pm 5,1$	36,9 $\pm 5,9$	14,5 $\pm 4,7$	37,5 $\pm 16,9$
Summe [nmol]	40,9 $\pm 7,1$	94,1 $\pm 11,8$	25,0 $\pm 1,6$	52,0 $\pm 1,7$	60,8 $\pm 12,6$	97,0 $\pm 8,0$	25,1 $\pm 4,4$	42,4 $\pm 6,5$	19,9 $\pm 8,2$	42,2 $\pm 17,8$

Die Stoffmengen der in SD-Rattenleberschnitte eingebauten FFAs (Tab. 3.15) sind nach 2 h Inkubation in den TGs und PLs vergleichbar. 9,11-FFA ist dabei in größeren Mengen nachweisbar, als 8,10-FFA. Die Konzentrationsabhängigkeit fällt dabei bei 8,10-FFA deutlicher aus als bei 9,11-FFA. Nach 4 h Inkubation bestehen keine Unterschiede in den

nachgewiesenen Stoffmengen aller drei FFAs wobei hier in den TGs etwas höhere Gehalte der FFAs nachweisbar sind. Insgesamt sind nur geringe Mengen der eingesetzten FFAs sowohl im Medium als auch in den Schnitte vorhanden. Ein Grund dafür scheint neben dem Abbau der FFAs der hohe Verlust der verwendeten Substanzen im eingesetzten Kulturmedium unter den gegebenen Bedingungen zu sein. Wie die Substanzkontrollen zeigen sind nach 4 h Inkubation ohne Leberschnitt im Medium nur noch durchschnittlich ca. 50% der eingesetzten Menge der FFAs nachweisbar (s. 6.2.7.4, Tab. 6.7).

## 3.5. Einfluss von Furanfettsäuren auf die Lipidperoxidation

Natürlich vorkommende FFAs, die am Furanring methyliert sind, besitzen die Fähigkeit freie Peroxy- und Alkoxyradikale zu binden (Okada et al., 1990). Durch diese Hemmung der LPO weisen sie antioxidative Fähigkeiten auf. Daher war von Interesse welchen Einfluss nicht methylysubstituierte FFAs auf die LPO nehmen. Dazu wurde zum einen ein Modell in Zellkultur und zum anderen ein Modell in Gewebekultur gewählt. Die LPO wurde mittels TBARS-Assay (s. 6.2.8.1) fluorimetrisch bestimmt.

### 3.5.1. Einbau von Arachidonsäure in V79-Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses von FFAs auf die LPO in Zellen war beabsichtigt ein Modell mit V79-Zellen zu verwenden. Da diese keinen oxidativen Metabolismus besitzen hat das Modell den Vorteil, dass der Einfluss der FFAs und nicht derer oxidativer Metaboliten auf die LPO betrachtet wird. Da es nicht möglich ist mit dem Thiobarbitursäure-Assay (TBARS-Assay) in kultivierten V79-Zellen die LPO zu bestimmen, weil keine PUFAs vorliegen, mussten diese zunächst mit C 20:4 angereichert werden. Um den ausreichenden Einbau von C 20:4 in Speicher- und Membranlipide zu überprüfen wurde eine Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  C 20:4 durchgeführt (s. 6.2.8.1). Anschließend wurden die Zellen mittels SPE fraktioniert und die FA-Muster der Lipidfraktionen mittels GC-FID analysiert. Des Weiteren wurde nach erfolgter Inkubation mit C 20:4 eine anschließende Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  10,12-FFA für 2 h durchgeführt, um zu überprüfen ob diese in mit C 20:4 angereicherten V79-Zellen ebenfalls ausreichend eingebaut wird.

Nach einer Inkubationsdauer von 3 h bestehen die FAs der PL-Fraktion zu 21% aus C 20:4 (Abb. 3.68 (A)). In der Fraktion der TG macht C 20:4 nach dieser Zeit 35% der gesamten FAs aus (Abb. 3.68 (B)). Wechselt man nach Ablauf der 3 h das Medium und inkubiert die V79-Zellen anschließend für 2 h mit 10,12-FFA, so bestehen 30% der FAs in der PL-Fraktion aus 10,12-FFA (Abb. 3.69 (A)). Infolgedessen ist der Anteil von C 20:4 an der

### 3. Ergebnisse

Gesamtmenge der FAs in den PL auf 13% zurückgegangen. Der Anteil an C 20:4 in der TG-Fraktion verändert sich im Vergleich zur Inkubation ohne 10,12-FFA nicht (Abb. 3.69 (B)). Zusätzlich liegen in dieser Fraktion 20% 10,12-FFA vor.

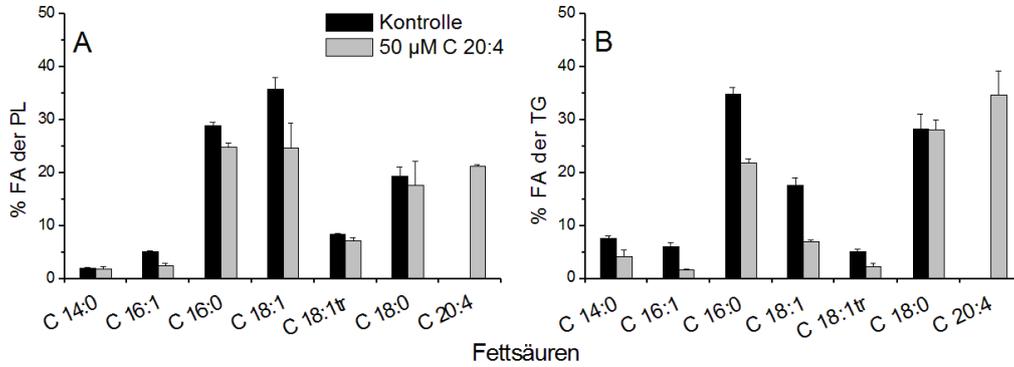


Abbildung 3.68.: Fettsäureverteilung in den Fraktionen der Phospholipide (A) und Triglyceride (B) von V79-Zellen nach Inkubation mit Arachidonsäure;  $c(\text{C } 20:4) = 50 \mu\text{M}$ ,  $t = 3 \text{ h}$ ; berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der einzelnen Lipidfraktionen; dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

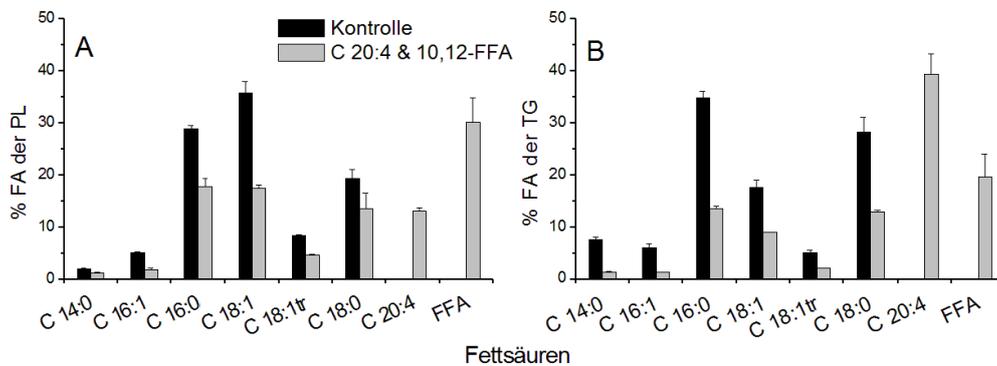


Abbildung 3.69.: Fettsäureverteilung in den Fraktionen der Phospholipide (A) und Triglyceride (B) von V79-Zellen nach Inkubation mit Arachidonsäure für 3 h und anschließender Inkubation mit 10,12-FFA für 2 h;  $c(\text{C } 20:4) = 50 \mu\text{M}$ ,  $c(\text{FFA}) = 50 \mu\text{M}$ ; berechnet anhand der Peakflächen der Fettsäuremethylester aus den GC-FID-Analysen der einzelnen Lipidfraktionen; dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite

C 20:4 wird in vergleichbarer Menge in Membranlipide von V79-Zellen eingebaut, wie sie in Membranen von Rattenleber vorhanden ist (s. 3.4.1, Abb. 3.63). Es wird somit eine ausreichende Menge an C 20:4 in Membranlipide von V79-Zellen eingebaut, um den

TBARS-Assay durchführen zu können. Auch nach nach weitergehender Inkubation der angereicherten V79-Zellen mit 10,12-FFA ist noch ausreichend C 20:4 in den Lipiden zu finden. Somit kann mit diesem Modell der Einfluss von 10,12-FFA auf die LPO in V79-Zellen untersucht werden.

### 3.5.2. Lipidperoxidation in Zellkultur

Zur Untersuchung des Einflusses von 10,12-FFA auf die LPO wurde das in 3.5.1 beschriebene Modell mit V79-Zellen verwendet. Zusätzlich zur Inkubation der Zellen mit 10,12-FFA wurden Inkubationen mit 10,12-FFA in Anwesenheit von *tert*-Butylhydroperoxid (tBuOOH) durchgeführt. Dies dient dabei als Induktor für LPO und wurde auch als Positivkontrolle eingesetzt (s. 6.2.8.1).

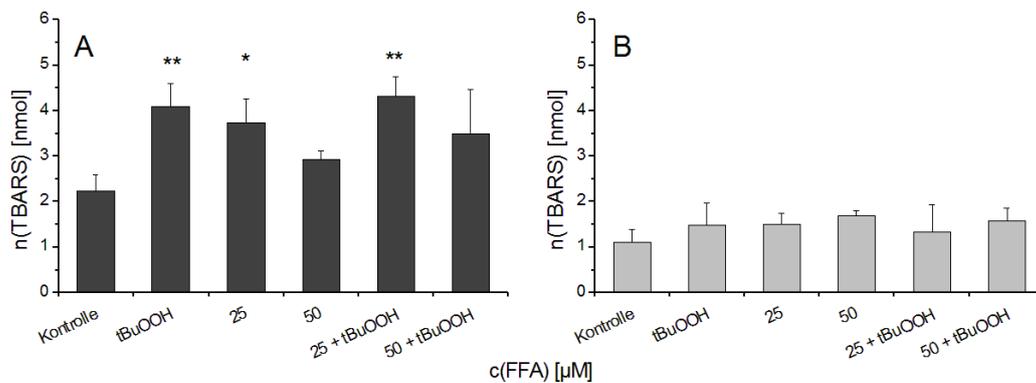


Abbildung 3.70.: Bestimmung der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen in mit Arachidonsäure angereicherten V79-Zellen (A) und im Inkubationsmedium (B), Inkubationen mit 10,12-FFA und/oder *tert*-Butylhydroperoxid;  $t = 2$  h;  $c(\text{tBuOOH}) = 500 \mu\text{M}$ ; dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  S.D.; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (ANOVA-Test)

Die Positivkontrolle, die mit  $500 \mu\text{M}$  tBuOOH inkubiert wird, zeigt nach 2 h eine signifikante Steigerung der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) in den V79-Zellen gegenüber der Negativkontrolle (3.70 (A)). Bei der Inkubation mit  $25 \mu\text{M}$  10,12-FFA ist dieser Effekt ebenso zu beobachten. Die Zunahme bei der Inkubation mit  $50 \mu\text{M}$  10,12-FFA ist nicht mehr signifikant. Werden die V79-Zellen mit 10,12-FFA und  $500 \mu\text{M}$  tBuOOH inkubiert, so ist bei  $25 \mu\text{M}$  FFA ebenfalls eine signifikante Steigerung zur Kontrolle zu erkennen. Die Stoffmenge der TBARS liegt auf dem selben Niveau wie bei der Positivkontrolle. Eine Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  10,12-FFA und  $500 \text{ mM}$  tBuOOH haben keine signifikante Zunahme der TBARS zu Folge. Die TBARS werden von den Zellen nicht ins Medium abgegeben, weswegen im Kulturmedium bei allen Inkubationen keine Zunahme

### 3. Ergebnisse

der TBARS festzustellen ist. (Abb. 3.70 (B)). 10,12-FFA ist demnach nicht in der Lage durch tBuOOH induzierte LPO zu inhibieren.

#### 3.5.3. Lipidperoxidation in Gewebekultur

Um sich der *in vivo* Situation weiter anzunähern war es von Interesse den Einfluss der FFAs auf die LPO in Gewebekultur zu untersuchen. Dazu wurden Präzisionsgewebeschnitte von Leber männlicher SD-Ratten für 4 h mit 8,10- bzw. 10,12-FFA inkubiert. Als Induktor für LPO diene hier ebenfalls tBuOOH.

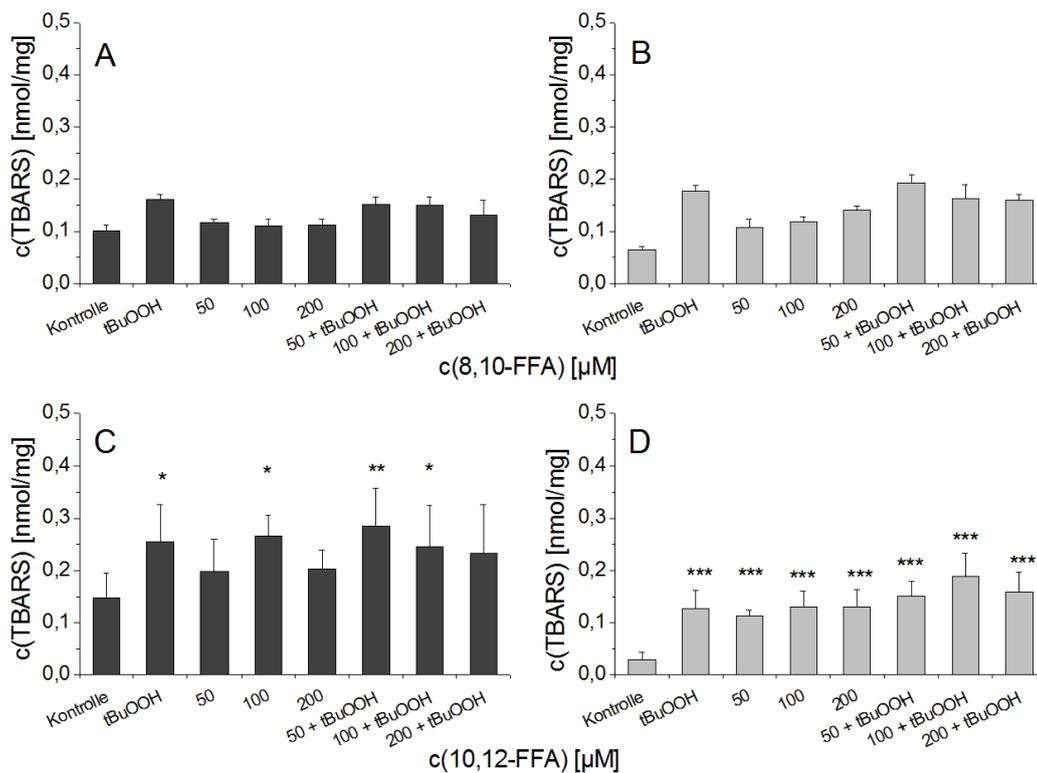


Abbildung 3.71.: Bestimmung der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen in Leberschnitten männlicher SD-Ratten nach Inkubation mit 8,10-FFA im Gewebe (A), nach Inkubation mit 8,10-FFA im Inkubationsmedium (B), nach Inkubation mit 10,12-FFA im Gewebe (C) und nach Inkubation mit 10,12-FFA im Inkubationsmedium (D); Inkubationen mit FFA und/oder *tert*-Butylhydroperoxid;  $t = 4$  h;  $c(\text{tBuOOH}) = 1$  mM; für 8,10-FFA sind Mittelwerte von zwei Leberschnitten aus einem Versuch  $\pm$  Schwankungsbreite, für 10,12-FFA Mittelwerte von je zwei Leberschnitten aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt  $\pm$  S.D.; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (ANOVA-Test, nicht berechnet für Inkubationen mit 8,10-FFA, da nur eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde)

### 3. Ergebnisse

Die Positivkontrolle, die mit 1 mM tBuOOH inkubiert wurde, zeigt nach 4 h eine Steigerung der TBARS gegenüber der Negativkontrolle sowohl im Gewebe (3.71 (A) und (C, signifikant)), als auch im Kulturmedium (3.71 (B) und (D), signifikant)). Insgesamt ist die Zunahme der TBARS im Gegensatz zu den V79-Zellen jedoch überwiegend im Kulturmedium auszumachen. Bei den Inkubationen mit 8,10-FFA ohne tBuOOH ist festzustellen, dass die Anwesenheit der FFA eine Steigerung der TBARS im Inkubationsmedium zur Folge hat (Abb. 3.71 (B)). Im Gewebe ist dies nicht zu beobachten (Abb. 3.71 (A)). Unter dem Einfluss von 10,12-FFA kommt es sowohl im Gewebe als auch im Inkubationsmedium teilweise zu einer signifikanten Zunahme der TBARS (Abb. 3.71 (B) und (D)). Beide FFAs sind nicht in der Lage die durch tBuOOH induzierte LPO entscheidend zu reduzieren. Es ist jedoch zu beobachten, dass die TBARS in Gewebe und Medium bei den Inkubationen in Anwesenheit von tBuOOH mit steigenden Konzentrationen der FFAs minimal zurückgehen. Insgesamt haben beide FFAs keinen ausgeprägten Effekt auf die LPO in SD-Rattenleberschnitten.

## 4. Diskussion

### 4.1. *In vitro*-Metabolismus und $\beta$ -Oxidation

#### 4.1.1. Oxidativer Metabolismus von Furanfettsäuren

Aktuell gibt es in der Literatur keine Angaben zur Untersuchung des oxidativen Metabolismus von nicht-methylsubstituierten FFAs. In der vorliegenden Arbeit werden die oxidativen Metaboliten dieser Substanzklasse anhand den mikrosomalen Umsetzungen von 8,10-, 9,11- und 10,12-FFA erstmals betrachtet.

Bei der Umsetzung der FFAs mit RLM männlicher Wi-Ratten entstehen u.a. zwei am Alkylrest monohydroxylierte Derivate der FFAs als Hauptmetaboliten. Generell spielen bei Hydroxylierungen von FAs vor allem die Isoenzyme der CYP-4-Familie eine Rolle. Lineare, gesättigte FAs werden an der  $\omega - 1$ - oder  $\omega$ -Position hydroxyliert, um zu hohe Gehalte an freien FAs in Zellen zu vermeiden, die sich toxisch auswirken können (Hsu et al., 2007). Durch einen weiteren Oxidationsschritt, die  $\alpha$ -Oxidation, können Dicarbonsäuren gebildet werden. Diese werden durch  $\beta$ -Oxidation in den Mitochondrien weiter abgebaut und anschließend ausgeschieden. Daraus resultieren z.B. die in Ratten- und Rinderurin als Hauptmetaboliten der methylsubstituierten FFAs nachgewiesenen Furandicarbonsäuren (Sand et al., 1983; Bauer und Spiteller, 1985b). Da FFAs jedoch einen Furanring aufweisen, der ein aromatisches System darstellt, liegen an den Allylpositionen ebenfalls reaktive Zentren vor, die bevorzugt durch CYPs hydroxyliert werden. Möglicherweise kommt es daher zur Bildung zweier monohydroxylierter Metaboliten der FFAs in vergleichbarem Ausmaß, bei denen zum einen die Allylposition am Alkylrest und zum anderen die  $\omega - 1$ - oder  $\omega$ -Position substituiert wird. Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass die Hydroxylierungspositionen bei allen FFAs ausschließlich am Alkylrest lokalisiert sind.

Es ist des Weiteren zu beobachten, dass aus 8,10- und 9,11-FFA je ein Metabolit gebildet wird, der am Alkylrest eine Hydroxy- und eine Ketogruppe aufweist. Der Entstehung dieses Metaboliten muss die Bildung einer dihydroxylierten FFA vorangehen. Durch einen weiteren Oxidationsschritt wird eine der Hydroxygruppen zu einer Ketogruppe oxidiert. Für die Bildung dieses Metaboliten scheint die Position des Furanrings eine Rolle zu spielen.

#### 4. Diskussion

Bei 10,12-FFA, die von allen drei Verbindungen den mit fünf Kohlenstoffatomen kürzesten Alkylrest aufweist, scheint eine zweifache Hydroxylierung des Alkylrests nicht begünstigt zu sein. Hier könnte der Grund dafür liegen, dass ein solcher Metabolit von 10,12-FFA nicht nachweisbar ist.

Werden aromatische Systeme oxidativ metabolisiert kommt es in der Regel zur Bildung von Epoxiden. So ist auch für einige Furanderivate bereits bekannt, dass diese unter dem Einfluss von CYPs epoxidiert werden (Boyd, 1981). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass aus FFAs durch oxidative Metabolisierung ebenfalls Epoxide gebildet werden. Diese erwiesen sich allerdings in der GC-MS-Analyse als nicht stabil. Es ist zu vermuten, dass hier vier unterschiedliche Epoxide aus jeder FFA gebildet werden, da nach dem Wegfall der Doppelbindung am Furanring zwei Stereozentren entstehen. Dies führt dazu, dass die nachgewiesenen Reaktionsprodukte der Epoxide aus jeweils zwei Enantiomeren gebildet werden können. Diese sind mittels HPLC nicht aufzutrennen. Interessant ist dabei die Beobachtung, dass aus 8,10-FFA im Gegensatz zu den anderen eingesetzten FFAs das Reaktionsprodukt, bei dem die Epoxidierungsposition auf der Seite des Alkylrests angenommen wird (A8), in größerem Ausmaß gebildet wird - eine mögliche Erklärung ist die Position des Furanrings im Molekül. Durch den kürzeren Säurerest spielen hier u.U. Wechselwirkungen mit der Carboxylgruppe eine Rolle, die eine Epoxidierung des Furanrings auf der Seite des Alkylrests begünstigen.

Eine Veränderung in der Ausbeute der gebildeten Epoxide war bei 9,11- und 10,12-FFA durch den Einsatz von RLM von mit Aroclor 1254 behandelten Wi-Ratten auszumachen. Dies lässt die Annahme zu, dass die jeweiligen Epoxide durch unterschiedliche Isoenzyme gebildet werden, da durch Behandlung der Ratten mit Aroclor 1254 nicht alle CYPs im gleichen Maße induziert werden. Dem steht entgegen, dass die Induktion auf die Bildung der verschiedenen Epoxide aus 8,10-FFA keine Auswirkung zeigt. Möglicherweise ist hier aber die Symmetrie des Moleküls von Bedeutung. Bei 8,10-FFA besteht sowohl der Alkyl- als auch der Säurerest aus sieben Kohlenstoffatomen (s. 1.2.1, Abb. 1.11 (A)). Der Furanring ist somit in der Mitte der Kohlenstoffkette angeordnet, was offenbar Einfluss auf die Substratspezifität der an den Epoxidierungsreaktionen beteiligten CYPs nimmt. Somit wäre es für das Verhältnis der gebildeten Epoxide nicht von Bedeutung, ob ein bestimmtes Isoenzym verstärkt induziert wird, wenn alle involvierten CYPs beide Doppelbindungen am Furanring gleichermaßen oxygenieren können.

Eine genaue Strukturaufklärung der gebildeten oxidativen Metaboliten der FFAs steht indes noch aus - insbesondere bei den Produkten der oxidativen Umsetzungen, denen anhand der GC-MS-Analyse keine sinnvollen Strukturen zugewiesen werden konnten. Über die Strukturen der bei Verwendung induzierter RLM zusätzlich gebildeten Produkte, die im Rahmen dieser Arbeit nicht charakterisiert wurden, ist ebenfalls nichts bekannt.

#### 4.1.2. Bildung von Dioxoenfettsäuren

Von den Furanderivaten 1,3-Diphenylisobenzofuran und 2,5-Diphenylfuran ist bekannt, dass aus ihnen durch Behandlung mit dem Epoxidierungsreagenz *meta*-Chlorperbenzoesäure (m-CPA) *cis*-Dioxoene entstehen (Boyer et al., 1975). Des Weiteren entsteht aus Furan durch CYP katalysierte Oxidation *cis*-2-Buten-1,4-dial. Für diese Verbindung wird angenommen, dass sie aus einem intermediären Epoxid gebildet wird (Chen et al., 1995). Daher war im Zusammenhang mit der oxidativen Umsetzung der FFAs überraschend, dass die gebildeten Epoxide hier im Reaktionsansatz und der HPLC scheinbar stabil sind. Die erwarteten Dioxoenfettsäuren konnten nicht nachgewiesen werden. Es ist in Erwägung zu ziehen, dass unterschiedliche Substituenten am Furanring einen Einfluss darauf haben, ob es zu einer Ringöffnung nach der Epoxidierung kommt.

Im Gegensatz dazu waren bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung der FFAs außer den Epoxiden Dioxoenfettsäuren im Reaktionsansatz zu detektieren. Offenbar spielt bei der Bildung der Dioxoenfettsäuren in Anwesenheit von Peroxysäuren jedoch ein anderer Mechanismus eine wichtige Rolle. Peroxysäuren zersetzen sich bei saurem pH-Wert teilweise zu  $^1\text{O}_2$  und der entsprechenden Carbonsäure (McKeown und Waters, 1966). So ist es möglich, dass der entstandene  $^1\text{O}_2$  mit dem Furanring reagiert und ein Endoperoxid gebildet wird (Foote et al., 1967). Im Anschluss daran kommt es zu einer Ringöffnung. Demnach wäre das Endoperoxid und nicht das Epoxid das Intermediat, aus dem die Dioxoenfettsäuren gebildet werden. Dem entspricht auch die Beobachtung von Boyer et al. (1979) und Ishii et al. (1988a), dass sowohl aus nicht-methylsubstituierten FFAs als auch aus methylsubstituierten FFAs durch Oxidation mit  $^1\text{O}_2$  Dioxoenfettsäuren entstehen. Da die im Reaktionsgemisch *in situ* gebildete Peroxysäure (s. 6.2.3.1)  $^1\text{O}_2$  freisetzen kann, stellt die Bildung eines Endoperoxids auch hier einen möglichen Reaktionsweg dar.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Bildung der Dioxoenfettsäuren bei der chemo-enzymatischen Epoxidierung bietet der in 1.1.4, Abbildung 1.6 dargestellte Mechanismus. Durch Bindung freier Radikale an eine  $\alpha$ -Position des Furanrings kommt es zu einer Ringöffnung. Das mesomeriestabilisierte Radikal bindet, wie von Spitteller (2005a) beschrieben, ein weiteres Radikal und nach Hydrolyse entstehen Dioxoenfettsäuren. Dieser Mechanismus bildet auch die Grundlage für die Darstellung der Dioxoenfettsäuren aus den FFAs in Anwesenheit von LOX und C 18:2. Da im Reaktionsgemisch der chemo-enzymatischen Epoxidierung  $\text{H}_2\text{O}_2$  eingesetzt wurde, ist es durchaus denkbar, dass z.B. durch photolytische Spaltung Hydroxyradikale gebildet werden, die diese Reaktion auslösen können (Okada et al., 1996). Durch oxidative Metabolisierung hingegen wird Sauerstoff durch CYPs auf den Furanring übertragen, was zu Epoxiden, jedoch nicht zu Endoperoxiden oder zur Bildung freier Radikale führen kann. Dies wäre in Verbindung mit der Tatsache, dass die

Epoxide der FFAs unter physiologischen Bedingungen stabil sind, eine Erklärung dafür, dass nach oxidativer Umsetzung mit RLM keine Dioxoenfettsäuren nachweisbar sind.

### 4.1.3. $\beta$ -Oxidationsprodukte von Furanfettsäuren

Bei der Untersuchung der  $\beta$ -Oxidation der FFAs *in vitro* zeigte sich, dass unabhängig von der Kettenlänge des Säurerests der FFAs ein Abbau stattfindet, der durch den Furanring unterbrochen wird. Der verbleibende Säurerest besteht stets aus drei Kohlenstoffatomen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Sand et al. (1983) und Bauer und Spiteller (1985b) überein, die in Ratten- und Rinderurin Metaboliten von methylsubstituierten FFAs nachweisen konnten, die ebenfalls über einen aus drei Kohlenstoffatomen bestehenden Säurerest verfügten. Im Gegensatz zu den hier nachgewiesenen  $\beta$ -Oxidationsprodukten wiesen diese Metaboliten jedoch eine weitere  $\omega$ -ständige Carboxylgruppe auf. Um diese Produkte zu erhalten sind eine  $\omega$ - und eine  $\alpha$ -Oxidation notwendig (s. 4.1.1), die in dem hier verwendeten System mit Rattenlebermitochondrien nicht ablaufen. Nach Einführung der  $\omega$ -ständigen Carboxylgruppe bei den methylsubstituierten FFAs kommt es dann ebenfalls durch  $\beta$ -Oxidation zu einer Verkürzung des „neuen“ Säurerests auf drei Kohlenstoffatome (Sand et al., 1983; Bauer und Spiteller, 1985b). Dieser weitere Verlauf des Abbaus wäre *in vivo* auch für nicht-methylsubstituierte FFAs zu erwarten. So werden auf diese Weise auch andere durch  $\beta$ -Oxidation nicht vollständig abbaubare Carbonsäurederivate wie 2,2-Dimethylstearinsäure (Bergstrom et al., 1954), Sterulsäure (Eisele et al., 1977) oder Prostaglandine (Green, 1971; Sun, 1974) verstoffwechselt, um sie ausscheiden zu können.

Im Inkubationsmedium von V79-Zellen, die mit FFAs behandelt wurden, sind ebenfalls  $\beta$ -Oxidationsprodukte der Muttersubstanzen nachweisbar. Nicht zu detektieren sind hingegen Furandicarbonsäuren. Dies ist damit zu begründen, dass CYPs von V79-Zellen nicht exprimiert werden. Wie in 4.1.1 beschrieben, sind CYPs jedoch für die Bildung von Dicarbonsäuren notwendig. Aufgrund der sehr geringen Mengen an nachweisbaren  $\beta$ -Oxidationsprodukten in diesen Untersuchungen bleibt allerdings zu klären, ob weitere Abbaureaktionen ablaufen. Möglicherweise erweisen sich die gebildeten Produkte unter den gegebenen Bedingungen auch als instabil.

### 4.1.4. Toxikologische Bedeutung der oxidativen Metaboliten und $\beta$ -Oxidationsprodukte

Epoxide der FFAs, die durch oxidative Metabolisierung gebildet werden sind unter toxikologischen Gesichtspunkten sicherlich nicht unbedenklich, da sie als Elektrophile in der Lage

## 4. Diskussion

sind, mit nucleophile Gruppen zu reagieren. So ist denkbar, dass die Epoxide mit Thiol- oder Aminogruppen von zellulären Proteinen reagieren. Dies kann zur Folge haben, dass z.B. bei Enzymen die katalytischen Eigenschaften verändert werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die Reaktion mit Proteinen der Mikrotubuli dar, was u.U. zu MN-Bildung führen kann. Auch mit Hämoglobin können Epoxide Addukte bilden. Reagieren Epoxide mit Stickstoff in der DNA kann dies eine Elektronenverschiebung in den DNA-Basen zur Folge haben, was zu fehlgebildeten Basenpaaren (z.B. A:C oder G:T) führen kann. Geschieht dies vor oder während dem DNA-Replikationszyklus kann daraus eine Substitution des ursprünglichen Basenpaares durch das inkorrekte entstehen. Dies kann im schlimmsten Fall zu Mutationen von Zellen führen (Marquardt und Schäfer, 2004).

Es ist zu beachten, dass die Epoxidierung freier FFAs kaum eine Rolle spielen dürfte, da diese in Zellen direkt in PLs und TGs eingebaut werden (s. 4.2.3). Außerdem liegen freie langkettige FAs *in vivo*, wenn sie nicht in PLs oder TGs gebunden sind, an Proteine wie Albumin (im Serum) oder Fatty-Acid-Binding-Protein (FABP, im Cytosol) assoziiert vor (Glatz und Veerkamp, 1985; Stremmel und Diede, 1989; Sorof, 1994). Somit sind sie einer Metabolisierung durch CYPs nur schwer zugänglich. Vielmehr besteht die Möglichkeit, dass die  $\beta$ -Oxidationsprodukte, die ebenfalls über einen intakten Furanring verfügen, durch Metabolisierung aktiviert werden können. Da sie Abbauprodukte der FFAs darstellen, ist nicht zu erwarten, dass sie von den Zellen erneut in PLs und/oder TGs eingebaut werden. Des Weiteren steigt durch die Verkürzung der Kohlenstoffkette die Hydrophilie. Daher ist im Gegensatz zu den FFAs im Cytosol eine Bindung an hydrophile Transporter möglicherweise nicht mehr notwendig. Infolgedessen würden die  $\beta$ -Oxidationsprodukte frei im Cytosol vorliegen. Eine daher denkbare Epoxidierung dieser Substanzen durch CYPs könnte ebenfalls die oben beschriebenen Auswirkungen auf Zellbestandteile zur Folge haben. Dies ist aber durch Metabolismusstudien mit den  $\beta$ -Oxidationsprodukten noch zu klären. Außerdem ist nicht klar, in welchem Ausmaß Epoxide von FFAs z.B. durch Adduktbildung mit GSH oder Epoxidhydrolasen entgiftet werden.

## 4.2. Untersuchungen in Zell- und Gewebekultur

### 4.2.1. Allgemeine Merkmale der Zelllinien und Gewebe

Wie gezeigt werden konnte, ist in den eingesetzten V79-, HT-29- und HepG2-Zellen C 18:1tr11 in den Membran- und Speicherlipiden nachweisbar. Dabei handelt es sich um eine FA, die von den Zellen selbst nicht synthetisiert wird. C 18:1tr11 wird im Pansen von Wiederkäuern durch das Bakterium *Butyrivibrio fibrisolvens* gebildet. Zunächst wird aus Linolensäure (C 18:3) oder C 18:2 durch  $\Delta^{12}$ -*cis*, $\Delta^{11}$ -*trans*-Isomerase

#### 4. Diskussion

*cis*-9,*trans*-11 C 18:2 („Rumenic Acid“) gebildet (Kepler et al., 1966; Kepler und Tove, 1967). Diese dient als Substrat für CLA-Desaturase, die „Rumenic Acid“ in C 18:1tr11 umwandelt (Hughes et al., 1982). Daher ist sie in Milchprodukten, Fleisch von Wiederkäuern und verwandten Produkten nachweisbar (Destailats et al., 2005; Shen et al., 2007). Dementsprechend kommt C 18:1tr11 auch in FKS vor. Der Einsatz von FKS als Wachstumsfaktor im Medium für die Kultivierung von Zellen hat daher einen Einbau von C 18:tr11 in die Lipide der Zellen zur Folge.

Im Gegensatz zu den kultivierten Zellen ist sowohl in Rattenleber, als auch in Rattenniere keine C 18:1tr11, jedoch C 18:2 und C 20:4 zu detektieren. Dies ist damit zu erklären, dass Ratten über ihr Futter keine C 18:1tr11 aber C 18:2 aufnehmen. Letztere ist eine essentielle FA, aus der im Organismus unter Kettenverlängerung C 20:4 gebildet wird. Diese wird wiederum zur Bildung von Eicosanoiden benötigt. Bei ihnen handelt es sich um lokale Hormone, die zur Regulierung des Blutflusses zu bestimmten Organen, zur Kontrolle des Ionentransports durch Membranen und zur Modulation der synaptischen Übertragungen notwendig sind. Für kultivierte Zellen ist die Bildung von Eicosanoiden, anders als bei Zellen in intaktem Gewebe, zum Überleben nicht notwendig (Berg et al., 2003). Hierin mag auch der Grund dafür liegen, dass C 18:2, obwohl sie in FKS in vergleichbarer Menge wie C 18:tr11 vorliegt, nicht bevorzugt in die Lipide der kultivierten Zellen eingebaut wird. Als Folge daraus sind im Gegensatz zu den Gewebeschnitten weder C 18:2 noch C 20:4 in den verwendeten Zelllinien nachweisbar.

Eine weitere Beobachtung war, dass sich die eingesetzten Zelllinien in ihren Lipidzusammensetzungen deutlich unterscheiden. In HepG2-Zellen sind wesentlich größere Anteile an Speicherlipiden (TGs und CEs) nachweisbar als in V79- und HT-29-Zellen. Eine mögliche Erklärung dafür kann sein, dass es sich bei ihnen um humane Lebercarcinomzellen handelt. Die Leber hat eine bedeutende Funktion in der Lipidbiosynthese im Organismus. FAs werden hier zu TGs aufgebaut und durch Lipoproteine in das Fettgewebe transportiert (Voet und Voet, 1992). Eine Anreicherung von TGs in HepG2-Zellen kann demnach die Folge sein. Dem entgegen steht allerdings die Beobachtung, dass der Gehalt an Speicherlipiden in Rattenleber nicht so hoch liegt wie in HepG2-Zellen. Allerdings sind kultivierte humane Lebercarcinomzellen mit intaktem Gewebe aus Rattenleber nicht direkt vergleichbar. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass die durch Nahrungsaufnahme und Kulturmedium supplementierten Mengen an FAs voneinander abweichen. Andererseits kann es sein, dass die in Rattenleber synthetisierten TGs in Lipoproteinen wieder an das Serum abgegeben werden, während die TGs, aufgrund in Zellkultur anders ablaufender Transportvorgänge und Stoffwechselwege, in HepG2-Zellen verbleiben. Auch Abweichungen in den Enzymausstattungen können zu unterschiedlichen Stoffwechselverhalten führen. Die Verteilung der FAs auf die Lipidfraktionen von Rattenleber ist allerdings mit der von Rattenniere nahezu identisch.

#### 4. Diskussion

Das größere PL/ChOL-Verhältnis von HepG2-Zellen gegenüber V79- und HT-29-Zellen kann an unterschiedlichen Anteilen von Zellorganellen in den Zelllinien liegen. Während ChOL ein Hauptbestandteil der Plasmamembran ist, kommt es in den Membranen der Zellorganellen in geringeren Mengen vor. Vor allem die innere mitochondriale Membran ist praktisch frei von ChOL (Yeagle, 1985). In der Leber läuft neben der Lipidbiosynthese auch der Lipidabbau hauptsächlich durch  $\beta$ -Oxidation der FAs in den Mitochondrien ab. Da mit der angewandten Methode alle Membranen der Zellen gemeinsam extrahiert und analysiert werden, wäre mit einer größeren Anzahl an Mitochondrien in HepG2-Zellen das größere PL/ChOL-Verhältnis im Vergleich zu V79- und HT-29-Zellen zu erklären. Bei Betrachtung des PL/ChOL-Verhältnisses von Rattenleber kann dieses Bild weitestgehend bestätigt werden. Rattenleber hat ein ähnliches PL/ChOL-Verhältnis wie HepG2-Zellen, während Rattenniere in dieser Hinsicht mit V79- und HT-29-Zellen vergleichbar ist. Um diese Annahme zu bestätigen wäre, eine Fraktionierung der Zelllinien und des Gewebes nötig, um die Anteile der einzelnen Zellorganellen näher zu bestimmen, was im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt wurde.

##### 4.2.2. Verfügbarkeit der Furanfettsäuren im Medium

Bei der Untersuchung des Einbaus von FFAs in Lipide von kultivierten Zellen war festzustellen, dass bei Inkubationen in Anwesenheit von FKS im Medium ein geringerer Anteil an FFAs in V79-Zellen eingebaut wird als bei der Verwendung von FKS-freiem Medium. Innerhalb der Arbeitsgruppe ist aus weiteren Inkubationsversuchen mit anderen Substraten bekannt, dass FKS im Medium in der Lage ist, diese in Proteine einzulagern. Dadurch wird deren freie Verfügbarkeit abgesenkt. Ein ähnlicher Effekt wird auch in den Untersuchungen von Zhang und Sevanian (1991) beschrieben, die bei Inkubationen von V79-Zellen mit C 20:4 in Anwesenheit von 10% FKS im Inkubationsmedium lediglich maximal 2,5% der eingesetzten C 20:4 in den Lipiden der Zellen wiederfinden konnten. Diese Befunde sind Anlass zu der Annahme, dass die freien FFAs z.B. an Albumin gebunden oder in Lipoproteine des FKS eingelagert werden. Freie FAs gelangen durch passive Diffusion (Chaves et al., 2003) oder aktive Membrantransportproteine (Stremmel und Diede, 1989; Chaves et al., 2003; Bradbury und Berk, 2004) in das Cytosol von Zellen. Sind sie an Albumin gebunden, müssen sie für die Aufnahme in die Zellen zuerst dissoziieren. Die Dissoziation wiederum ist abhängig vom Stoffmengenverhältnis FA:Albumin. In Abhängigkeit vom Dissoziationsgrad verbleibt daher ein Teil der FFAs albumingebunden im Medium. Kommt es zu einer Einlagerung in Lipoproteine, so ist ebenfalls weder eine passive Diffusion der FFAs zu erwarten, noch stehen sie den Membrantransportern zur Verfügung. Als Konsequenz aus der verringerten Verfügbarkeit der FFAs durch Anwesenheit von FKS im Inkubationsmedium wurden alle weiteren Versuche in Zell- und Gewebekultur in FKS-freiem Medium durchgeführt.

### 4.2.3. Einfluss von Furanfettsäuren auf Membran- und Speicherlipide von Zellen und Gewebe

Die Betrachtung des zeitabhängigen Einbaus der FFAs in V79-Zellen zeigte, dass bereits nach 1 h Inkubationszeit bedeutende Anteile der FAs in PLs und TGs durch FFAs substituiert sind. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung von Chaves et al. (2003), die in einem System mit Duodenum-Mucosa zeigen konnten, dass bereits nach 5 min Inkubation mit C 18:1 ein Einbau der FA in PLs und TGs stattfindet. Dabei werden die freien FAs nach der Überwindung der Plasmamembran an FABPs gebunden und mit Hilfe dieser durch das Cytosol an ihre Bestimmungsorte transportiert. Um eine zellschädigende Wirkung der freien FAs zu verhindern, werden bei steigenden Konzentrationen von freien FAs in den Zellen FABPs stärker exprimiert (Glatz und Veerkamp, 1985). Dieser in einem sehr kurzen zeitlichen Rahmen ablaufende Transportprozess kann zusätzlich eine Begründung dafür liefern, dass freie FFAs hier nicht detektierbar sind.

Aufgrund der Tatsache, dass nach 1 h Inkubation immer noch über die Hälfte der FFAs im Medium vorhanden sind, ist die weitere Zunahme der Anteile der FFAs in den Lipidfraktionen erwartungsgemäß. Allerdings ist diese Zunahme nur bis zu einem Zeitpunkt von 3 h auszumachen. Das ist damit zu erklären, dass es sich bei V79-Zellen um eine schnell proliferierende Zelllinie mit einem kurzen Zellzyklus von 12 h handelt. Die Menge der FFAs im Medium nimmt im weiteren zeitlichen Verlauf ab, während die Zellzahl zunimmt. Einerseits haben die V79-Zellen weniger FFAs zum Einbau aus dem Medium zur Verfügung. Andererseits steigt mit der Zellzahl die Gesamtmenge der FAs an. Daher kann es zu keiner weiteren Zunahme der Anteile der FFAs an der Gesamtmenge der FAs von V79-Zellen kommen. Der Anteil der FFAs in der PL-Fraktion bleibt dabei nahezu konstant, während bei den TGs ein minimaler Rückgang auszumachen ist. Der Grund dafür könnte sein, dass die V79-Zellen in FKS-freiem Medium inkubiert werden. In Folge einer Unterversorgung an FAs können neben den von den Zellen *de novo* synthetisierten FAs in TGs gebundene FFAs freigesetzt und in die PL-Fraktion eingebaut werden (Pazouki et al., 1992).

Des Weiteren war sowohl bei den Zellkulturversuchen als auch bei der Inkubation der Rattenleberschnitte zu beobachten, dass in den TGs größere Anteile an FFAs nachweisbar sind als in den PLs. Möglicherweise stellen Speicherlipide das bevorzugte Ziel für den Einbau der supplementierten FFAs dar. Neben *de novo* synthetisierten FAs verwerten kultivierte Zellen für den Aufbau von Membran- und Speicherlipiden ebenfalls aus dem Medium verfügbare FAs (Pazouki et al., 1992; Bradbury und Berk, 2004; Audi et al., 2007; Couloubaly et al., 2007). Für die Synthese von TGs und PLs wird gleichermaßen zunächst Phosphatidat durch das Anhängen von zwei FAs an Glycerin-3-phosphat gebildet (Berg et al., 2003). Offenbar werden bei Inkubationen mit FFAs im weiteren Verlauf der Lipidsynthese aus den FFA-enthaltenden Phosphatidaten bevorzugt TGs gebildet. Bei V79-Zellen scheint es

#### 4. Diskussion

jedoch aufgrund der geringen Menge an vorhandenen TGs zu einer Sättigung dieser Lipidfraktion zu kommen. Dafür spricht die Tatsache, dass in V79-Zellen im Vergleich zu HT-29- und HepG2-Zellen größere Mengen der FFAs in der PL-Fraktion wiederzufinden sind. HT-29- und HepG2-Zellen verfügen über ein deutlich größeres Depot an Speicherlipiden als V79-Zellen.

Interessant in diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung, dass es bei V79- und HT-29-Zellen unter dem Einfluss der FFAs zu einer Zunahme des Anteils der TG-Fractionen an der Gesamtmenge der Lipide kommt. In der Literatur gibt es einige Berichte von *in vitro* Untersuchungen, bei denen durch die Supplementierung unterschiedlicher freier FAs, z.B. in kultivierten Keratinocyten (Vicanova et al., 1999) oder in kultivierten Hepatocyten (Sundler et al., 1974), eine Zunahme der TGs erreicht werden konnte. Sowohl bei diesen Arbeiten als auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen sind die Zellen hohen Konzentrationen von freien FAs ausgesetzt. Die Konzentrationsbereiche der FFAs im Medium liegen wesentlich höher als die der FAs aus FKS bei einer Inkubation mit FKS-haltigem Medium. Daher werden zur Aufnahme der größeren Menge der FFAs in diesen beiden Zelllinien offenbar zusätzliche Speicherlipide benötigt. Vor allem in V79-Zellen, die unter Normalbedingungen nur geringe Mengen an TGs aufweisen, kommt es daher zu einer deutlichen Zunahme des Anteils der TG-Fraktion an den gesamten Lipiden. Anhand des Befundes, dass der Anteil der TG-Fraktion bei einer Inkubation mit 10,12-FFA stärker zunimmt als bei 8,10-FFA, lässt sich zeigen, dass dieser Effekt mit der in den TGs vorhandenen Menge an FFA verknüpft ist. Dieses Ergebnis steht auch im Einklang mit der Beobachtung, dass eine Supplementierung von C 18:2 in V79-Zellen eine vergleichbare Wirkung hat.

Die Zusammenhänge in der Modifikation der Lipidzusammensetzung in Zellen sind allerdings sehr komplex und stark von der eingesetzten Zelllinie abhängig. Häufig ist nicht geklärt, welche Enzyme Einfluss nehmen, weswegen man die eingesetzten Zelllinien nicht generell miteinander vergleichen kann. So kommt es in den HepG2-Zellen zu keiner weiteren Zunahme der TGs, sondern der Anteil der PLs an den Gesamtlipiden der Zellen wächst unter Einfluss der FFAs. Studien mit PUFAs führten in der Vergangenheit dabei häufig zu einer Reduzierung der TG-Synthese *in vitro* (Nossen et al., 1986; Rustan et al., 1988; Homan et al., 1991; Vegusdal et al., 2005). Ebenso hatten auch CLAs, aus denen die eingesetzten FFAs entstehen, eine TG-reduzierende Wirkung in kultivierten Rattenhepatocyten (Priore et al., 2007). Allerdings basieren diese Beobachtungen auf verschiedenen Mechanismen. Nossen et al. (1986) stellen die Hypothese auf, dass eine reduzierte NADPH-Produktion zu einer verminderten TG-Synthese führt, während Rustan et al. (1988) einen Zusammenhang mit einer Absenkung der Aktivität von Acyl-CoA:1,2-Diacylglyceroyltransferase herstellen. Die Abnahme der TGs durch den Einfluss von CLAs stehen hingegen im Zusammenhang mit einer erhöhten  $\beta$ -Oxidationsrate (Priore et al., 2007).

#### 4. Diskussion

Ein weiterer Ansatz für die Erklärung der Änderung des PL/TG-Verhältnisses in HepG2-Zellen ist eine Zunahme der PL-Synthese. Hier war es Pelech et al. (1984) möglich zu zeigen, dass Cytidylyltransferase das Enzym ist, was auf die Bildung von PC Einfluss nimmt. Durch Zugabe von ungesättigten FAs zu kultivierten HeLa-Zellen war es möglich, die im Cytosol lokalisierte Cytidylyltransferase in ihre aktivierte, am endoplasmatischen Retikulum gebundene Form zu überführen. Die Folge war eine erhöhte PC-Synthese in den Zellen. Es ist hier allerdings noch unklar welcher dieser beschriebenen Effekte in den HepG2-Zellen eine Auswirkung auf die Verschiebung des PL/TG-Verhältnisses haben könnte. Die Zunahme des PL/ChOL-Verhältnisses (s. 4.2.5.1) ist dabei ein möglicher Hinweis auf eine erhöhte PL-Synthese. Um dies aufzuklären wäre eine Quantifizierung der PLs und TGs einer bestimmten Zahl von HepG2-Zellen vor und nach der Inkubation mit FFAs sinnvoll.

Bei dem Vergleich der Inkubationsversuche der Rattenleberschnitte mit denen der kultivierten Zellen ist festzustellen, dass die in PLs und TGs nachgewiesenen Mengen der FFAs in den Gewebeschnitten deutlich niedriger liegen als in den kultivierten Zellen. Insbesondere eine Inkubationsdauer von 4 h führt dazu, dass nur noch Spuren der FFAs in den Gewebeschnitten nachzuweisen sind. Dies ist zunächst ein Hinweis darauf, dass in den Gewebeschnitten der Turnover der PLs und TGs wesentlich schneller verläuft, als in den kultivierten Zellen. Aus *in vivo* Untersuchungen ist auch bekannt, dass sowohl im Plasma als auch in der Leber von Ratten innerhalb von 2 - 4 h bereits der größte Teil von in PLs und TGs eingebautem <sup>14</sup>C-gelabeltem Acetat wieder eliminiert ist (Tove et al., 1956; Kimura et al., 2005). Allerdings ist damit nur zu erklären, warum nach 4 h geringere Mengen FFAs in den Gewebeschnitten nachweisbar sind, als nach 2 h. Eine Antwort auf die Frage, warum allgemein die Stoffmengen der FFAs in den Leberschnitten niedriger sind als in den inkubierten Zellen, kann damit nur teilweise gegeben werden. Ein bedeutender Aspekt hinsichtlich dieser Frage stellt die Tatsache dar, dass die kultivierten Zellen eine Monolayer ausbilden, während bei dem ausdifferenzierten Gewebe nur ein geringer Anteil der Zellen an der Oberfläche lokalisiert ist. Insofern kommen bei den Zellkulturversuchen eine wesentlich größere Anzahl von Zellen mit den FFAs im Medium in Kontakt. Vermutlich findet bei den Leberschnitten daher überwiegend eine Anreicherung der äußeren Zellschichten mit FFAs statt, während durch einen gebremsten Transport der FFAs in die zentralen Zellschichten diese dort für einen Einbau in die Lipide nur in geringem Ausmaß zur Verfügung stehen. Des Weiteren stellen kultivierte Zellen ein proliferierendes System dar, bei dem es auch während der Inkubation zur Mitose der Zellen kommt. Dies kann dazu führen, dass ein Teil der FFAs aus dem Medium für die Synthese von PLs und TGs für neu gebildete Zellen verwertet werden. Dagegen können in Gewebekultur die FFAs lediglich zur Substitution der in den Lipiden bereits vorliegenden FAs führen. Ein weiterer Gesichtspunkt, der nicht zu vernachlässigen ist, stellt die Instabilität der FFAs unter den in der Gewebekultur eingesetzten Bedingungen dar. Während bei Substanzkontrollen in der Zellkultur kein Verlust

#### 4. Diskussion

der FFAs im Medium auszumachen ist, findet bei den FFAs unter den in 6.2.7.4 beschriebenen Bedingungen eine deutliche Abnahme statt. Es ist allerdings noch nicht klar, was mit den FFAs im Medium hierbei geschieht. Möglicherweise führt der erhöhte Sauerstoffgehalt im DOC-System (95% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>) im Vergleich zur Zellkultur (95% Luft; 5% CO<sub>2</sub>) zum Verlust der FFAs. Durch die Rotation des Inkubationsgefäßes kommt es außerdem zu einer ständigen Benetzung der Glasoberfläche, was zu einem erhöhten Gasaustausch zwischen Medium und Atmosphäre und somit zu einer vermehrten Oxidation der FFAs führen kann. Allerdings sind im analysierten Medium der Substanzkontrollen mittels HPLC-DAD keine weiteren Peaks detektierbar. Es kann daher zumindest ausgeschlossen werden, dass hier Dioxoenfettsäuren oder Oxidationsprodukte mit einem intakten Furanring gebildet werden. Festzuhalten bleibt, dass es in Folge einer reduzierten Menge an verfügbaren freien FFAs zu einer verringerten Aufnahme durch die Rattenleberschnitte kommt.

Interessant ist in diesem Zusammenhang eine weitergehende Untersuchung der Rattenleberschnitte und des Inkubationsmedium, um zu klären ob in ihnen Metaboliten und/oder  $\beta$ -Oxidationsprodukte der FFAs nachweisbar sind. Dies könnte weitere Aufschlüsse darüber liefern, ob z.B. die Biotransformation oder eine erhöhte  $\beta$ -Oxidationsrate in Verbindung mit den geringen nachweisbaren Mengen der FFAs in den Leberschnitten im Vergleich zu den kultivierten Zellen steht.

Abschließend ist anzumerken, dass die hier durchgeführten Untersuchungen in Gewebekultur, da sie nur im Rahmen eines einzelnen Versuchs betrachtet wurden, nur als erster Hinweis gewertet werden können. Da es sich um ein biologisches System handelt, dessen Funktionsweise von vielen Faktoren abhängig ist, müsste das Ergebnis in zwei weiteren unabhängigen Experimenten bestätigt werden.

#### 4.2.4. Zusammenhang zwischen dem Abbau und den nachweisbaren Mengen der Furanfettsäuren in den Lipidfraktionen

Bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Inkubationsversuchen in Zell- und Gewebekultur war festzustellen, dass die in den Lipiden nachweisbaren Mengen von 8,10-FFA über 9,11-FFA zu 10,12-FFA hin generell zunehmen. Dies trifft sowohl für die PL- als auch für die TG-Fractionen zu. Dabei sind die im Medium verbliebenen Mengen der verschiedenen FFAs unter identischen Inkubationsbedingungen stets etwa gleich groß. D.h. die unterschiedlichen Mengen der FFAs in den PLs und TGs können nicht im Zusammenhang mit dem Durchtritt der freien FFAs durch die Plasmamembran stehen. Auch ist nicht davon auszugehen, dass die FFAs in den verwendeten proliferierenden Zellsystemen in unterschiedlichen Ausmaßen in PLs und TGs von neu gebildeten Zellen eingebaut werden. Es muss also eine Verbindung zwischen dem Abbau der einzelnen FFAs in kultivierten

#### 4. Diskussion

Zellen und Gewebe und deren voneinander abweichenden Gehalte in den Lipidfraktionen bestehen.

Die Ergebnisse der in V79-Zellen durchgeführten substanzfreien Nachinkubationen können diese Annahme bestätigen: 8,10-FFA wird im Vergleich zu den anderen beiden FFAs schneller in den Lipidfraktionen abgebaut. Besonders deutlich wird dieser Unterschied innerhalb der ersten Stunde in der Fraktion der TGs. Demnach scheint die Position des Furanrings im Molekül einen Einfluss darauf zu nehmen, wie schnell eine FFA aus TGs abgespalten wird. Es ist zwar bekannt, dass die primär am Abbau von TGs beteiligte Triacylglyceridlipase bevorzugt langkettige FAs aus TGs abspaltet (Rehner und Daniel, 2002), in welchem Zusammenhang dies jedoch mit der Position des Furanrings steht, ist noch unklar. Das Ergebnis des Abbaus von C 18:2 innerhalb der ersten 3 h verdeutlicht aber, dass offensichtlich nicht nur die Kettenlänge sondern auch die Struktur selbst einen Einfluss auf die Abspaltung einer FA aus einem TG nimmt. Es ist hier zu erwähnen, dass die Nachinkubation der mit C 18:2 behandelten V79-Zellen nicht vollkommen „substanzfrei“ war, da FKS-haltiges Medium eingesetzt wurde, welches auch geringe Mengen an C 18:2 enthält. Allerdings ist eine den Abbau beeinflussende Konkurrenzreaktion innerhalb der ersten 3 h kaum zu erwarten. Dazu ist die Menge an C 18:2 in FKS-haltigem Medium (10% (V/V)) im Vergleich zu den Gehalten an C 18:2 in den Lipidfraktionen zu gering.

Die Tatsache, dass die FFAs und C 18:2 aus den PL-Fraktionen langsamer abgebaut werden, kann mit einer Verwertung der aus den TGs freigesetzten FAs zusammenhängen. Dass kultivierte Zellen dazu in der Lage sind, konnte von Pazouki et al. (1992) gezeigt werden. Damit lässt sich auch erklären, warum der Abbau der FFAs erst nach 1 h Nachinkubation erkennbare Unterschiede zeigt. Innerhalb der ersten 0,5 h der Nachinkubation werden aus den TGs der Zellen vergleichbare Stoffmengen von 8,10- und 9,11-FFA freigesetzt. Durch den möglichen Einbau eines Teils der freigesetzten FFAs kommt es daher bis zu diesem Zeitpunkt nur zu geringfügigen Unterschieden in der Geschwindigkeit des Abbaus der FFAs in den PLs. Während bei den mit 9,11-FFA behandelten Zellen in den nächsten 0,5 h nach wie vor eine ausreichende Stoffmenge der FFA aus den TGs freigesetzt wird, stehen aus dem Abbau der TGs der mit 8,10-FFA behandelten Zellen nur noch geringe Mengen der FFA zur Verfügung. Entsprechend können bei der Synthese von neuen PLs nur geringere Mengen 8,10-FFA im Vergleich zu 9,11-FFA aus dem Cytosol verwertet werden. Daraus resultiert eine schnellere Abnahme von 8,10-FFAs in der PL-Fraktion gegenüber 9,11-FFA. Dies steht auch im Einklang mit dem Ergebnis, dass von 10,12-FFA und C 18:2, die von Beginn der Nachinkubation an in der TG-Fraktion in größeren Mengen vorliegen, kleinere Abbau-Raten in der PL-Fraktion zu beobachten sind. Es ist daher zu vermuten, dass der schnellere Abbau von 8,10-FFA in den Lipiden von V79-Zellen in erster Linie von der Spezifität der Triacylglycerollipasen abhängig ist.

#### 4.2.5. Toxikologische Bedeutung von Furanfettsäuren in Lipiden von Zellen und Gewebe

##### 4.2.5.1. Einfluss der Furanfettsäuren auf die Membranfluidität

Ein wesentlicher Aspekt bei der Bewertung der toxikologischen Bedeutung des Einbaus der FFAs in die Lipide von kultivierten Zellen und Rattenleberschnitte ist der damit verbundene Einfluss auf die Fluidität der Membranen. Die Membranfluidität wird von zwei Faktoren beeinflusst: Der erste Faktor ist der Anteil an ungesättigten FAs in den Membranen. Wird der Anteil an ungesättigten FAs in den Membranen erhöht, nimmt die Fluidität zu. Das liegt daran, dass diese keine linearen Moleküle darstellen und es so zu einer Zunahme der „Unordnung“ in den Membranen kommt. Der Knick in der Kohlenwasserstoffkette verhindert eine hochgeordnete Packung der Moleküle (Emmelot und Van Hoesen, 1975; Berg et al., 2003; Hac-Wydro und Wydro, 2007). Der zweite Faktor ist der Anteil an freiem ChOL in den Membranen. Freies ChOL bildet in Membranen mit seiner Hydroxygruppe mit den polaren Kopfgruppen der PLs Wasserstoffbrückenbindungen. Der unpolare Rest ist senkrecht zur Membranebene platziert. Infolge dieser Wechselwirkungen kommt es zu einer Verminderung der Membranfluidität. D.h., je mehr freies ChOL in den Membranen vorliegt, desto geringer ist die Membranfluidität (Yeagle, 1985).

In Säugerzellen liegt das optimale Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten FAs in der Plasmamembran bei 1:1. Dieses wird durch Desaturasen wenn möglich innerhalb bestimmter Grenzen gehalten (Thewke et al., 2000; Audi et al., 2007). Wie hier gezeigt wurde, werden vor allem in den V79-Zellen große Anteile der in den PLs enthaltenen FAs durch FFAs substituiert. Da keine Möglichkeit für die Desaturasen besteht, die FFAs in gesättigte FAs zu überführen, verbleiben diese in den Membranen. FFAs sind wie ungesättigte FAs keine linearen Moleküle. Der Bindungswinkel an den  $\alpha$ -Positionen des Furanrings beträgt wegen seines aromatischen Charakters  $120^\circ$  im Gegensatz zum tetraedrischen Bindungswinkel von  $109,5^\circ$  in der Kohlenwasserstoffkette. Somit ist davon auszugehen, dass die FFAs in den PLs Einfluss auf die Membranfluidität sowohl der Plasmamembranen als auch der Membranen von Zellorganellen nehmen. Dies kann Einfluss auf in den Membranen lokalisierte Transportproteine und Signaltransduktionswege der Zellen nehmen (Couloubaly et al., 2007). Vor allem ändern sich aber die Permeabilität und Stabilität der Membranen (Hac-Wydro und Wydro, 2007). Dies führte in Zellkulturstudien von Kuhnt (2003) mit verschiedenen ungesättigten FAs von der Bildung von Protrusionen bis zur Ruptur der Plasmamembran. Es ist in diesem Zusammenhang auch gut vorstellbar, dass die adhärenz Wirkung von kultivierten Zellen herabgesetzt wird. Dies alles sind Effekte, mit denen die cytotoxische Wirkung der FFAs in hohen Konzentrationsbereichen erklärt werden kann. Sowohl das Ablösen der Zellen vom Kulturgefäß als auch die Störung von Funktionen einzelner Zellorganellen können zum Absterben der Zellen führen. Damit ist auch zu begründen, weswegen

#### 4. Diskussion

8,10-FFA, die in geringeren Mengen in den PLs vorliegt, eine geringere cytotoxische Wirkung zeigt als 10,12-FFA. Folglich ist auch erklärbar, warum die cytotoxische Wirkung der FFAs bei Inkubationen mit FKS-haltigem abnimmt (s. 4.2.2).

Neben dem Einbau von FFAs in Membranlipide war bei HepG2-Zellen unter dem Einfluss der FFAs zusätzlich eine Zunahme des PL/ChOL-Verhältnisses festzustellen. Genau wie die Abnahme des Sättigungsgrades der Membranen hätte ein niedrigerer Anteil an freiem ChOL eine Erhöhung der Membranfluidität zur Folge. Es ist aber nicht klar, ob bestimmte Membranen in der Zelle nach der Inkubation einen höheren PL-Gehalt aufweisen. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die gebildeten PLs noch nicht vollständig in die Membranen integriert sind. Die PL-Synthese wird durch Enzyme, die mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums assoziiert sind, katalysiert (Bell, 1978). Von dort werden sie anschließend zu den jeweiligen Membranen transportiert. Da diese PLs mit der angewendeten Methode ebenfalls erfasst werden, ist keine gesicherte Aussage darüber möglich, inwiefern die Membranfluidität tatsächlich durch die Zunahme des PL/ChOL-Verhältnisses beeinflusst wird.

##### 4.2.5.2. Genotoxische Wirkung von Furanfettsäuren

Vor dem Hintergrund, dass Furanderivate in Lebensmitteln teilweise als krebserzeugend eingestuft werden (Williams und Bend, 2006; Heppner und Schlatter, 2007), wurde die genotoxische Wirkung von 8,10- und 10,12-FFA anhand des *in vitro* MN-Tests in V79-Zellen untersucht. Die genotoxische Wirkung der Furanderivate beruht dabei meist auf der Bildung reaktiver Aldehyde oder Epoxide. (Mitchell et al., 1976; Chen et al., 1995; Hamadeh et al., 2004; Perez Locas und Yaylayan, 2004; Byrns et al., 2006; Williams und Bend, 2006). Furan selbst zeigt im *in vitro* MN-Test mit humanen Lymphocyten, die nicht metabolisch aktiviert wurden, aber keine genotoxische Wirkung (Durling et al., 2007). Dementsprechend war von 8,10-FFA in V79-Zellen, die über keinen oxidativen Metabolismus verfügen, keine genotoxische Wirkung feststellbar. Bei 10,12-FFA war eine minimale, wenngleich auch signifikante Erhöhung der MN-Zahl bei einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  auszumachen. Allerdings ist zu vermuten, dass diese Wirkung nicht auf 10,12-FFA direkt zurückzuführen ist. Vielmehr ist denkbar, dass es durch Veränderungen in der Membranstruktur (s. 4.2.5.1) zu einem unkontrollierten Eintritt von Substanzen in das Cytosol und/oder Zellorganellen kommt, die diesen Effekt hervorrufen (s. 4.2.5.3). Der Rückgang der Mitosen in den genotoxischen Konzentrationsbereichen von 10,12-FFA bestätigt zudem, dass die Zahl der lebenden Zellen bereits abnimmt, was ebenfalls durch Modifikationen der Membranlipide ausgelöst werden kann (Kuhnt, 2003). Aus diesem Grund war es auch nicht möglich, bei 10,12-FFA Konzentrationen höher als 40  $\mu\text{M}$  die Versuche auszuwerten. Da keine Zellen

mehr im Mikroskop zu sehen waren, muss es zu einer Ruptur der Plasmamembran gekommen sein, die zu einer Zerstörung der Zellen führt. Die Beobachtung, dass 10,12-FFA im MN-Test in Anwesenheit von FKS im Inkubationsmedium keine genotoxische Wirkung zeigt, ist auch hier auf die geringere Verfügbarkeit der FFA für den Einbau in die PLs der Zellen zurückzuführen (s. 4.2.2).

##### 4.2.5.3. Einfluss von Furanfettsäuren auf die Lipidperoxidation

Dimethylsubstituierte FFAs sind in der Lage, sowohl Hydroxyradikale (Okada et al., 1996) als auch  $LO\cdot$  und  $LOO\cdot$  zu binden (Okada et al., 1990; White et al., 2005) und wirken daher antioxidativ. Ausschlaggebend ist hierfür der Furanring, der die stabile Bindung zweier Radikale an das Molekül ermöglicht (s. 1.1.4, Abb. 1.6) und somit die radikalische Kettenreaktion unterbricht (Spiteller, 2005a). Im Zusammenhang damit war es Ishii et al. (1989b) und Batna und Spiteller (1994a) möglich zu zeigen, dass synthetische PLs, die methylsubstituierte FFAs enthalten, in der Lage sind, die LPO von freien FAs und PLs in Liposomen zu reduzieren.

Diese Befunde waren Anlass dafür, den Einfluss von nicht-methylsubstituierten FFAs auf die LPO *in vitro* zu untersuchen. Es ist dabei festzustellen, dass weder 8,10- noch 10,12-FFA in der Lage sind, die in Rattenleberschnitten induzierte LPO entscheidend zu reduzieren. Dasselbe trifft auf mit 10,12-FFA behandelte V79-Zellen zu. Dieses Ergebnis bestätigt Studien von Okada et al. (1990), in denen der Einfluss unterschiedlich substituierter FFAs auf die LPO von C 18:2 in einem zellfreien System betrachtet wurde. Offenbar besteht ein Zusammenhang zwischen dem Substitutionsgrad des Furanrings und der antioxidativen Wirkung der FFAs. So konnten Okada et al. zeigen, dass dimethylsubstituierte FFAs stark antioxidativ wirken, während im Vergleich dazu bei monomethylsubstituierten FFAs diese Wirkung um 50% abnimmt. Die in diesen Studien eingesetzte 9,11-FFA und Dimethylfuran zeigen kaum noch eine antioxidative Wirkung. Vergleichbares wird auch von Batna und Spiteller (1994b) berichtet. Zwar reagiert in deren Untersuchungen 10,12-FFA mit dem  $LO\cdot$  oder  $LOO\cdot$  von C 18:2, das dabei entstehende Dioxen wird nach 3 h aber nur zu weniger als 1% aus der FFA gebildet. Demnach ist es nachzuvollziehen, dass bei Erhöhung der FFA-Konzentrationen sowohl in V79-Zellen als auch in Rattenleberschnitten größtenteils nur ein minimaler Rückgang der LPO festzustellen ist.

Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass bei Inkubationen mit FFAs in Abwesenheit eines LPO-Induktors ebenfalls eine Zunahme der TBARS auszumachen ist. Vermutlich ist hier auch die bereits in 4.2.5.1 diskutierte, durch den Einfluss der FFAs veränderte Membranstruktur ausschlaggebend. Diese Annahme wird durch den Befund gestützt, dass in den Gewebekulturversuchen die TBARS unter Einwirkung von 10,12-FFA stärker zunehmen als unter Einwirkung von 8,10-FFA. Spiteller (2003; 2005b) stellt diesbezüglich die

#### 4. Diskussion

Hypothese auf, dass es durch Änderungen der Plasmamembran zu einem erhöhten Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  in das Cytosol kommt. Daraus resultiert eine Aktivierung der Phospholipase  $\text{A}_2$ , was wiederum zur Freisetzung großer Mengen von C 20:4 und C 18:2 führt. Diese freien FAs stellen zum einen ein Substrat für LOX dar, können diese aber auch zerstören. Anstatt durch Peroxidasen zu Hydroxy-FAs abgebaut zu werden, werden LOOHs durch das aus der LOX freigesetzte  $\text{Fe}^{2+}$  in  $\text{LO}\cdot$  und  $\text{HO}\cdot$  gespalten. Daraus resultiert eine radikalische Kettenreaktion, was zu einem Anstieg der LPO führt. Diese Reaktion führt mit Sicherheit außer zur Zerstörung von Zellmembranen auch zur strukturellen Schädigung anderer zellulärer Makromoleküle wie Proteine, DNA und Kohlenhydrate. Dies führt zu der Hypothese, dass eine Verknüpfung besteht zwischen der in den PLs vorhandenen Menge an 8,10- oder 10,12-FFA, deren Einfluss auf die LPO und deren unterschiedliche genotoxische und cytotoxische Wirkung.

Unerwartet ist, dass die LPO in V79-Zellen, die wesentlich größere Mengen an FFAs in den PLs enthalten als die Leberschnitte, nicht deutlich höher ausfällt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass für die Bestimmung der LPO in der Zellkultur V79-Zellen zunächst mit C 20:4 angereichert werden müssen. Übereinstimmend mit Untersuchungen von Weithmann et al. (1989) werden in V79-Zellen ausreichende Mengen an C 20:4 eingebaut, um die LPO bestimmen zu können. Verbunden damit war es Zhang und Sevanian (1991) möglich zu zeigen, dass bereits die Inkubation von V79-Zellen mit C 20:4 ohne weitere Behandlung eine Zunahme der LPO zu Folge hat. Bedenkt man, dass während der Inkubation der V79-Zellen mit 10,12-FFA ein Teil der C 20:4 wieder abgebaut wird und der Anteil der bereits oxidierten C 20:4 in der Negativkontrolle relativ hoch liegt, so stellt die verbliebene Menge C 20:4 in diesem Modell sicherlich einen limitierenden Faktor für die tatsächliche Bestimmung der LPO anhand des TBARS-Assays dar.

Auch wenn Leberschnitte im Gegensatz zu V79-Zellen in der Lage sind, die FFAs oxidativ zu metabolisieren, so ergeben die durchgeführten Untersuchungen keinen Hinweis auf eine Beteiligung der oxidativen Metaboliten am Einfluss auf die LPO. Da die FFAs gleichermaßen aus dem Medium aufgenommen werden und auch der Umsatz in den mikrosomalen Umsetzungen vergleichbar ist, dürfte in diesem Fall kein eindeutiger Unterschied in der Messung der LPO zwischen 8,10- und 10,12-FFA auszumachen sein. Hätten oxidative Metaboliten von Produkten aus dem FFA-Abbau ( $\beta$ -Oxidation,  $\omega$ -Oxidation,  $\alpha$ -Oxidation) eine Auswirkung auf die LPO, so wäre eine größere Zunahme der LPO unter Einfluss von 8,10-FFA zu erwarten gewesen, da diese schneller abgebaut wird. Diese Metaboliten können durchaus gebildet werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass sie in den Leberschnitten weiter verstoffwechselt werden oder Konjugate bilden.

## 5. Zusammenfassung

Furanfettsäuren (FFA) ohne Methylsubstituenten am Furanring entstehen durch Oxidation aus konjugierten Linolsäuren. Aufgrund anticancerogener Eigenschaften von konjugierten Linolsäuren werden diese in Form von Nahrungsergänzungsmitteln verstärkt in den Verkehr gebracht. Bei Einnahme dieser Produkte ist von einer erhöhten Aufnahme von FFAs auszugehen. Sowohl über die Biotransformation, als auch über Wirkungen von FFAs auf Zellen ist nichts bekannt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit dem oxidativen Metabolismus und der  $\beta$ -Oxidation *in vitro* von FFAs. Ein weiteres Augenmerk lag auf dem Einfluss der FFAs auf Membran- und Speicherlipide von Zellen und Gewebe. Außerdem wurde die Genotoxizität und der Einfluss der FFAs auf die Lipidperoxidation *in vitro* untersucht.

Der oxidative Metabolismus der FFAs wurde mit Lebermikrosomen männlicher Wistar-Ratten untersucht. Die Stoffwechselprodukte wurden nach Ausarbeitung geeigneter Analysebedingungen mittels HPLC fraktioniert, gesammelt und mit Hilfe der GC-MS charakterisiert. Aus allen FFAs wurden mit Rattenlebermikrosomen zwei einfach am Alkylrest hydroxylierte Metaboliten gebildet. Dabei schienen jeweils die Allylpositionen am Alkylrest und die  $\omega$ - oder  $\omega - 1$ -Positionen bevorzugt oxygeniert zu werden. Außerdem waren bei allen FFAs zwei an den  $\beta$ -Positionen des Furanrings hydroxylierte Verbindungen nachweisbar. Diese Substanzen konnten mit Hilfe einer chemo-enzymatischen Epoxidierung von 8,10-FFA als Reaktionsprodukte der Epoxide der FFAs identifiziert werden. Die Reaktionsprodukte entstanden dabei unter thermischem Einfluss im Injektor der GC-MS. Die Entstehung von *cis*-Dioxoenfettsäuren, deren Bildung durch oxidative Metabolisierung zunächst erwartet worden war, konnte nach Umsetzung mit Rattenlebermikrosomen nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu 10,12-FFA war bei 8,10- und 9,11-FFA zusätzlich jeweils ein Metabolit mit einer Hydroxy- und Ketogruppe am Alkylrest zu detektieren. Es war jedoch mittels GC-MS nicht die Charakterisierung aller gebildeten Metaboliten der FFAs möglich.

Durch die Verwendung von Rattenlebermikrosomen von mit Aroclor 1254 behandelten männlichen Wistar-Ratten war eine Zunahme des Umsatzes des FFAs festzustellen. Neben der Beobachtung, dass mittels HPLC zusätzliche Produkt-Peaks zu detektieren waren, kam es bei 9,11- und 10,12-FFA zu einer Umkehr im Mengenverhältnis der gebildeten Epoxide.

## 5. Zusammenfassung

Dies kann möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass verschiedene Isoenzyme an der Bildung der unterschiedlichen Epoxide beteiligt sind.

Die *in vitro*-Untersuchung der  $\beta$ -Oxidation von 8,10- und 10,12-FFA zeigte, dass der Säurerest der FFAs bis auf drei Kohlenstoffatome abgebaut wird. Der Furanring unterbrach dabei den Fortlauf der  $\beta$ -Oxidation. Auch in Zellkultur wurden  $\beta$ -Oxidationsprodukte der FFAs nachgewiesen - wenngleich in sehr geringem Ausmaß.

Die erste Beobachtung, die bei der Untersuchung des Einflusses der FFAs auf die Zusammensetzung der Membran- und Speicherlipiden *in vitro* gemacht werden konnte war, dass durch den Einsatz von fetalem Kälberserum im Medium die Verfügbarkeit der FFAs herabgesetzt wurde. Die Folge war ein verminderter Einbau der FFAs in Phospholipide und Triglyceride von V79-Zellen (Lungenfibroblasten des männlichen chinesischen Hamsters). Entsprechend wirkte sich der Einsatz von fetalem Kälberserum im Medium auch reduzierend auf die cytotoxischen und genotoxischen Eigenschaften der FFAs aus. Des Weiteren war festzustellen, dass von 8,10-FFA die geringsten Mengen, von 10,12-FFA die größten Mengen in den Lipiden, sowohl in Zell- als auch in Gewebekultur, nachweisbar waren. Hier konnte mit V79-Zellen gezeigt werden, dass der schnellere Abbau von 8,10-FFA dafür ausschlaggebend ist. Unabhängig von der FFA verlief der Abbau in den Triglyceride schneller, als in den Phospholipiden. Dies lässt darauf schließen, dass aus den Triglyceriden freigesetzte FFAs für den Einbau in Phospholipide verwertet werden.

Die Stoffmengen der FFAs, die von den kultivierten Zellen aus dem Medium aufgenommen wurden, waren annähernd gleich groß. Dabei wurden wegen den unterschiedlichen Gesamtmengen an Lipiden der verschiedenen Zelllinien unterschiedlich große Anteile der gesamten Fettsäuren durch FFAs substituiert. Um die große Menge der supplementierten FFAs aufnehmen zu können wurden bei V79- und HT-29-Zellen (humane Colocarcinom-Zellen) eine größere Menge an Triglyceriden produziert. Im Gegensatz dazu war bei HepG2-Zellen (humane Lebercarcinom-Zellen), die bereits im unveränderten Zustand eine große Menge an Triglyceriden aufweisen, eine Zunahme der Phospholipide zu verzeichnen. In diesem Zusammenhang waren HepG2-Zellen auch die einzige Zelllinien, bei der unter Einfluss der FFAs eine Zunahme des Phospholipid/Cholesterolverhältnisses auszumachen war.

In Rattenleberschnitten waren wesentlich geringere Mengen der FFAs in den Lipiden nachweisbar. Dies lag zum einen an der Instabilität der FFAs unter den Inkubationsbedingungen im „Dynamic Organ Culture“-System. Ein weiterer Grund war, dass der Abbau der FFAs in den Gewebeschnitten schneller ablief, als in den kultivierten Zellen. So waren nach 4 h Inkubation der Rattenleberschnitte deutlich geringere Mengen der FFAs in den Lipiden nachweisbar, als nach 2 h. Möglicherweise spielt hier die Tatsache, dass in Gewebeschnitten, im Gegensatz zu kultivierten Zellen, alle Stoffwechselreaktionen ohne Zugabe von Co-Faktoren ablaufen können eine Rolle.

## 5. Zusammenfassung

Unter dem Einfluss der FFAs kam es *in vitro* zu einer Abnahme des Sättigungsgrades der Membranen. Daraus folgte die Hypothese, dass es zu Veränderungen in aktiven und passiven Transportprozessen der Membranen der Zellen kommt. Dementsprechend wurde die Beobachtung, dass 10,12-FFA in V79-Zellen genotoxisch wirkt auf einen unkontrollierten Membrandurchtritt von Substanzen zurückgeführt, welche die Zellen in dieser Hinsicht beeinflussen. Entweder, da diese Substanzen selbst genotoxisch wirken, oder da sie zur Aktivierung bestimmter Enzyme führen, die z.B. DNA-Strangbrüche bewirken können. Für die Abhängigkeit der Genotoxizität von der Veränderung der Membranstruktur spricht auch, dass von 8,10-FFA, welche die Membranstruktur weniger veränderte, keine genotoxische Wirkung nachweisbar war.

Ebenso wurde die Beobachtung, dass unter dem Einfluss der FFAs *in vitro* eine Zunahme der Lipidperoxidation auftrat mit der veränderten Membranfluidität in Zusammenhang gebracht. Dafür sprach auch die Korrelation der Lipidperoxidation in Gewebekultur mit der nachweisbaren Mengen der jeweiligen FFA in den Membranen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass nicht-methylsubstituierte FFAs *in vitro* nicht in der Lage sind induzierte Lipidperoxidation zu reduzieren.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die FFAs, aufgrund einer möglichen metabolischen Aktivierung, aus toxikologischer Hinsicht nicht außer Acht zu lassen sind. Auch ist eine metabolische Aktivierung der  $\beta$ -Oxidationsprodukte denkbar. Des Weiteren sind FFAs in der Lage Membranstrukturen zu ändern, was zu veränderten Transportvorgängen in den Membranen führen kann. Mögliche Auswirkungen sind eine Zunahme der Lipidperoxidation. Insbesondere da nicht-methylsubstituierte FFAs, im Gegensatz zu methylsubstituierten, natürlich vorkommenden FFAs, keine antioxidative Wirkung aufweisen.



## 6. Material und Methoden

### 6.1. Geräte, Chemikalien und Lösungen

#### 6.1.1. Geräte

<b>GC-FID-Apparatur 1</b>	Fisons GC 8130 (Fisons Instruments)
Injektor:	Atlas Programmable Injector, Optic 2
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID)
Kapillarsäule:	Alltech Econo-Cap EC5, 5% Diphenylsiloxan, 30 m×0,32 mm, 0,25 $\mu$ m Filmdicke
<b>GC-FID-Apparatur 2</b>	HP GC 5890 Series II (Hewlett Packard)
Detektor:	Flammenionisationsdetektor (FID)
Kapillarsäule:	Hewlett Packard HP-5, 5% Diphenylsiloxan, 30 m×0,32 mm, 0,25 $\mu$ m Filmdicke
Integrator:	HP 3396 Series III (Hewlett Packard)
<b>GC-MS-Apparatur</b>	Finnigan MAT GCQ (Thermo Finnigan)
Detektor:	Ionenfalle
Injektor:	Atlas Programmable Injector, Optic 2
Kapillarsäule:	Supelco MDN-5S (24384), 5% Diphenylsiloxan, 30 m×0,25 mm, 0,25 $\mu$ m Filmdicke
<b>HPLC-Apparatur</b>	Beckman System Gold (Beckman Coulter)
Pumpe:	Pumpe Solvent Module 125 P
Detektor:	Detector 168, DAD
Injektor:	Rheodyne 7725i
Degasser:	Knauer, 4-Kanal Online Degasser
Vorsäule:	Phenomenex Gemini C18, 4×3 mm
Trennsäule:	Phenomenex Luna 5 $\mu$ C8(2), 250×4,6 mm

## 6. Material und Methoden

<b>Festphasenextraktion</b>	Vakuum-Block mit 12 Plätzen (Macherey-Nagel) Edelstahlkonnectoren (Macherey-Nagel) Membranvakuumpumpe NPC 102E (Ilmvac)
<b>Fluoreszenzmikroskop</b>	Eclipse E400 (Nikon) Objektiv: Plan Apo 60×A/1.40, 100×/1.4 (Öl) Okular: 10×/22 Fluoreszenz-Filtereinsätze: UV-2A (DAPI, Ex: 510-560 nm, DM: 575 nm, BA: 590 nm)
<b>Fluorimetrie</b>	Multititerplattenlesegerät GENios (Tecan) mit Software XFluor4
<b>Tissue Slicer-System</b>	Schneide-Einheit und „Dynamic Organ Culture“ (DOC)- Rotationsinkubator (Vitron Inc., Tucson, AZ, USA) Edelstahlnetze Hohlzylinder Szintillationsgläschen (20 ml) mit Plastikschaubdeckeln mit einem 2 mm-Loch in der Mitte Pinzette Schere
<b>Zellkultur</b>	Autoklav (F. Gösser, Medizin- und Labortechnik) Brutschrank Hera Cell (Heraeus) Handzählgeräte Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40 C; Objektive: 5×/0.12 Ph0, 10×/0.25 Ph1 (Zeiss) Pipetus (Hirschmann Laborgeräte) Sterilbank Hera Safe (Heraeus)
<b>Thermomixer</b>	Eppendorf 5436 Eppendorf comfort
<b>Zentrifugen</b>	Centrifuge 5417R (Eppendorf) Megafuge 1.0R (Heraeus Sepatech) Mikroliter (Hettich)
<b>Evaporatorzentrifuge</b>	RC 10.10 mit Kühlfalle RCT 90 (Jouan)

## 6. Material und Methoden

<b>pH-Meter</b>	CG 817 mit pH-Elektrode BlueLine 14 (Schott)
<b>Waagen</b>	Analysenwaage Sartorius handy; Typ H51 Präzisionswaage Sartorius excellence; Typ E2000D Präzisionswaage Sartorius portable; Typ PT 1200
<b>Abblasapparatur</b>	Reacti-Therm 18790 (Pierce), Reacti-Vap 18780 (Pierce)
<b>Pipetten</b>	Eppendorf Reference 0,5-10 $\mu\text{l}$ , 10-100 $\mu\text{l}$ , 50-200 $\mu\text{l}$ , 100-1000 $\mu\text{l}$ Eppendorf Research 2-20 $\mu\text{l}$ , 20-200 $\mu\text{l}$ , 100-1000 $\mu\text{l}$ , 500- 5000 $\mu\text{l}$ Abimed Discovery 20-200 $\mu\text{l}$ , 500-5000 $\mu\text{l}$
<b>Kühlgeräte</b>	Biofreezer (GFL) Kühl-Gefrier-Kombination Premium (Liebherr)
<b>Vortex</b>	Genie 2 (Scientific Industries)
<b>Magnetrührer</b>	HI 303N (Hanna Instruments)
<b>Ultraschallbad</b>	Sonorex TK30 (Bandelin)
<b>Wasserbad</b>	WB14 (Mettler)

### 6.1.2. Verbrauchsmaterialien

<b>Cryoröhrchen</b>	2 ml (NeoLab)
<b>Pipettenspitzen</b>	Plastik 10 $\mu\text{l}$ , 200 $\mu\text{l}$ , 1000 $\mu\text{l}$ (Sarstedt), 5000 $\mu\text{l}$ (Eppendorf)
<b>Reaktionsgefäße</b>	1,5 ml, 2 ml (Sarstedt)
<b>GC-Vials</b>	mit Schraubdeckeln und Teflondichtungen; 2,0 ml, 3,7 ml
<b>Zellkulturschalen</b>	$\varnothing$ 150 mm, $\varnothing$ 100 mm, $\varnothing$ 20 mm (TPP)
<b>Zentrifugenröhrchen</b>	15 ml (Sarstedt), 50 ml (Greiner)
<b>Objektträger</b>	Superfrost (Menzel)
<b>Deckgläser</b>	24×60 mm (Marienfeld)
<b>Mikrotiterplatten</b>	96-Well (Nunc) 24-Well (Sarstedt)
<b>Quadripermschalen</b>	Multischalen 132×82 mm, 4 Vertiefungen (Greiner)
<b>Sterilfilter</b>	0,22 $\mu\text{m}$
<b>SPE-Kartuschen</b>	Strata Amino-Phase, 200 mg, 3 ml (Phenomenex)

### 6.1.3. Chemikalien

Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz (ATP, 99%) (Sigma)  
N,O-Bis(Trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA,  $\geq 99\%$ ) (Fluka)  
L-Carnitin (98%) (Sigma)  
Chloroform, stabilisiert mit Amylen ( $\geq 99,8\%$ ) (Acros)  
Coenzym A, Natriumsalzhydrat (97%) (Sigma)  
4',6'-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) (Sigma)  
Diethylether, stabilisiert mit BHT ( $\geq 99,5\%$ ) (Acros)  
Dimethylcarbonat ( $\geq 99\%$ ) (Fluka)  
Dimethylsulfoxid (DMSO,  $\geq 99,9\%$ ) (Sigm-Aldrich)  
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) (Sigma-Aldrich)  
Dithioerythritol, research grade (Serva)  
Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalzdihydrat (EDTA,  $\geq 99\%$ ) (Roth)  
Flavinadenindinucleotid Dinatriumsalzhydrat (FAD) (Sigma)  
Glycerin ( $\geq 99,5\%$ ) (Roth)  
HEPES ( $\geq 99,5\%$ ) (Roth)  
n-Hexan ( $\geq 99\%$ ) (Roth)  
D,L-Isocitrat (Sigma)  
Linolsäure (95%) (Sigma)  
Methanol ( $\geq 99,9\%$ ) (Roth)  
Natriumdodecylsulfat (SDS,  $\geq 98,5\%$ ) (Sigma)  
4-Nitrochinolin-1-oxid (NQO) (Sigma)  
 $\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid ( $\beta$ -NAD, 98%) (Sigma)  
 $\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, Dinatriumsalz (NADP<sup>+</sup>,  $\geq 97\%$ ) (Roth)  
1,4-Phenyldiamin-Dihydrochlorid ( $\geq 99,0\%$ ) (Fluka)  
Phosphorwolframsäure, p.a. (Fluka)  
2-Propanol ( $\geq 99,95\%$ ) (Roth)  
tert-Butylhydroperoxid-Lösung (tBuOOH, 70% in Wasser) (Fluka)  
tert-Butylmethylether (TBME,  $\geq 99,5\%$ ) (Fluka)  
1,1,3,3,-Tetramethoxypropan (TMP,  $\geq 98,0\%$ ) (Fluka)  
Thiobarbitursäure ( $\geq 98,0\%$ ) (Fluka)  
( $\pm$ )- $\alpha$ -Tocopherol (95%) (Sigma)  
Trimethylsulfoniumhydroxid, 0,2 M in Methanol (TMSH) (Macherey-Nagel)  
Wasserstoffperoxid (30%) (Merck)

Alle nicht weiter spezifizierten Chemikalien wurden von den Firmen VWR (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Carl Roth (Karlsruhe) und Acros Organics (Geel) mindestens in p.a. Qualität bezogen.

### Furanfettsäuren

7-(5-Heptyl-2-furyl)-heptansäure (8,10-FFA)

8-(5-Hexyl-2-furyl)-octansäure (9,11-FFA,  $\geq 98\%$ ) (Biotrend)

9-(5-Pentyl-2-furyl)-nonansäure (10,12-FFA)

8,10-FFA und 10,12-FFA wurden vom Arbeitskreis von Prof. Dr. Hans Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie der Universität Hamburg synthetisiert und im Rahmen des DFG-Verbundprojekts „Lipidnet“ zur Verfügung gestellt. Von allen Furanfettsäuren wurden 10 mM Stammlösungen in TBME hergestellt, die bei Bedarf verdünnt oder aufkonzentriert wurden.

### GC-Standards

Arachidonsäure aus Schweineleber ( $\geq 99\%$ ) (Sigma)

Cholesterol ( $\geq 99\%$ ) (Sigma)

Cholesteryllinoleat ( $\geq 98\%$ ) (Sigma)

Glyceryltrimyristat ( $\geq 98\%$ ) (Fluka)

L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin aus Eigelb, Typ XI-E, 100 mg/ml in Chloroform (Sigma)

Methylinoleat ( $\geq 99\%$ ) (Sigma)

Methylinolenat ( $\geq 99\%$ ) (Sigma)

Methyloleat ( $\geq 99\%$ ) (Sigma)

Methylpalmitoleat ( $\geq 99\%$ ) (Sigma)

Vaccensäure ( $\geq 99\%$ ) (Sigma)

### Enzyme

Isocitrat-Dehydrogenase, aus Schweineherz (Sigma)

Lipoxydase 1, Typ 1-B aus Sojabohnen (Sigma)

Lipase B auf Acrylharz (Novozym<sup>TM</sup> 435), aus (Sigma)

### Kulturmedien

DMEM mit 4500 mg/l Glucose, L-Glutamin und Natriumpyruvat, Flüssigmedium (Sigma)

DMEM/F12 mit L-Glutamin, ohne Natriumbicarbonat, Pulvermedium (Sigma)

Waymouth MB 752/1 mit L-Glutamin, ohne Natriumbicarbonat, Pulvermedium (Sigma)

### **Reagenzien für Zell- und Gewebekultur**

Fetales Kälberserum (FKS) (Gibco BRL)

Trypsin, 1% in PBS + 200 mg/l EDTA (Sigma)

Penicillin/Streptomycin Lösung, 5000 U/ml Penicillin, 5 mg/ml Streptomycin (Sigma)

Gentamicin Lösung, 50 mg/ml (Gibco BRL)

### **Gase**

Helium 4.6 (Air Liquide)

Stickstoff 5.0 (Air Liquide)

Wasserstoff 5.0 (Air Liquide)

Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) (Air Liquide)

### **6.1.4. Biologisches Material**

#### **Versuchstiere**

Männliche SD-Ratten wurden von der Firma Harlan Winkelmann GmbH (Borchen) bezogen. Die Tiere wurden in Standardkäfigen gehalten und bekamen Wasser und kommerzielles Laborfutter. Tiere mit einem Gewicht von 200-300 g wurden für die Präparation von Präzisionsgewebeschnitten und die Präparation von Lebermitochondrien verwendet.

#### **Rattenlebermikrosomen**

RLM unbehandelter männlicher Wi-Ratten und männlicher mit Aroclor 1254 behandelter Wi-Ratten wurden am Institut für Angewandte Biowissenschaften der Universität Karlsruhe nach der Methode von Lake (1987) isoliert. Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Die Proteingehalte liegen bei 25,0 mg/ml in den unbehandelten Wi-RLM und bei 32,0 mg/ml in den Wi-RLM.

#### **Rattenlebermitochondrien**

Lebermitochondrien unbehandelter männlicher SD-Ratten wurden am Institut für Angewandte Biowissenschaften der Universität Karlsruhe isoliert.

### Zelllinien

- V79-Zellen** immortalisierte Lungenfibroblasten des männlichen chinesischen Hamsters; Populationsverdopplungszeit: ca. 12 h; kultiviert in DMEM mit 10% FKS (V/V), 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin bei 37°C in H<sub>2</sub>O-gesättigter, 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre
- HT-29-Zellen** humane Kolon-Adenokarzinom-Zellen; Populationsverdopplungszeit: ca. 24 h; kultiviert in DMEM mit 10% FKS (V/V), 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin bei 37°C in H<sub>2</sub>O-gesättigter, 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre
- HepG2-Zellen** humane Leberkarzinom-Zellen; Populationsverdopplungszeit: ca. 24 h; kultiviert in DMEM/F12 mit 10% FKS (V/V), 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin bei 37°C in H<sub>2</sub>O-gesättigter, 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre

### 6.1.5. Pufferlösungen, Kulturmedien und Färbereagenzien

#### 6.1.5.1. Puffer

##### 0,1 M Boratpuffer für die Dioxinbildung

2,012 g Natriumtetraborat (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>) werden in heißem, bidestilliertem Wasser im Ultraschallbad gelöst. Nach vollständigem Lösen der Substanz wird mit 6 M Salzsäure pH 9,0 eingestellt und nach Abkühlen mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

##### 0,2 M HEPES-Puffer für die $\beta$ -Oxidation

2,383 g HEPES werden in bidestilliertem Wasser gelöst. Anschließend wird mit 1 M Natronlauge pH 7,4 eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

**Kaliumphosphatpuffer**

**0,1 M Kaliumphosphatpuffer**

Reagenzien	g/l	mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17,418	0,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,609	0,1

Nach Vorlegen der basischen Komponente wird mit der sauren Komponente pH 7,4 eingestellt. Anschließend wird mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

**0,03 M Kaliumphosphatpuffer**

Reagenzien	g/l	mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,226	0,03
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,083	0,03

Nach Vorlegen der basischen Komponente wird mit der sauren Komponente pH 7,4 eingestellt. Anschließend wird mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

***Puffer für die Zell- und Gewebekultur***

**Phosphate Buffered Saline (PBS)**

Reagenzien	g/l	mM
NaCl	5,8	100
KCl	0,336	4,5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,994	7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,408	3

Nach dem Lösen der Reagenzien wird mit 1 M Natronlauge auf pH 7,2 eingestellt, mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und anschließend sterilfiltriert (pH = 7,4)

### Lyse-Puffer für den MTT-Assay

Reagenzien	Endkonz.
SDS	10 g/100 ml
Eisessig	0,6 ml/100 ml

Das SDS wird in DMSO gelöst. Nach Zugabe des Eisessig wird mit DMSO auf 100 ml aufgefüllt.

### Krebs-Henseleit-Puffer für Präzisionsgewebeschnitten

Reagenzien	g/l	mM
NaCl	6,9	118,0
KCl	0,36	4,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,13	0,95
NaHCO <sub>3</sub>	2,0	23,8
D-Glucose	4,5	25,0
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,295	1,2
CaCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0,498	2,9
Gentamicin (50 mg/ml)	1 ml/l	50 mg/l

Nach dem Lösen der Reagenzien wird mit 1 M Salzsäure pH 7,2 eingestellt, mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert (pH = 7,4)

#### 6.1.5.2. Kulturmedien

##### DMEM

DMEM wird als Flüssigmedium bezogen. Vor Verwendung in der Zellkultur werden in 500 ml DMEM 10 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (s. 6.1.3) gegeben, sodass Endkonzentrationen von 0,1 mg/ml an Streptomycin und 100 U/ml an Penicillin im Medium vorliegen. Je nach Versuchsdurchführung werden 10% FKS (V/V) beigegeben.

**DMEM/F12**

Reagenzien	g/l
DMEM/F12	15,6
NaHCO <sub>3</sub>	2,25
Streptomycin (5 mg/ml) / Penicillin (5000 U/ml)	20 ml/l

Nach Lösen des Pulvermediums und des Natriumhydrogencarbonats wird mit 1 M Natronlauge oder Salzsäure pH 7,4 eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt. Nach dem Sterilfiltrieren werden 20 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung zugegeben. Je nach Versuchsdurchführung werden 10% FKS (V/V) beigegeben.

**Waymouth-Medium**

Reagenzien	g/l
Waymouth MB 752/1	13,84
NaHCO <sub>3</sub>	2,24
Gentamicin (50 mg/ml)	1 ml/l

Nach Lösen der Pulvermediums und des Natriumhydrogencarbonats wird mit 1 M Natronlauge oder Salzsäure pH 7,4 eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt. Nach dem Sterilfiltrieren wird 1 ml Gentamicin-Lösung zugegeben.

**6.1.5.3. Färbereagenzien**

**MTT-Lösung**

250 mg Methylthiazolyldiphenyltetrazolium (MTT) werden in 50 ml warmem PBS gelöst. Anschließend wird die Lösung mit einem Spritzenaufsatzfilter, Porengröße 0,22 µm, sterilfiltriert und in 2,0 ml Cryoröhrchen aliquotiert. Die Lösung wird im Dunkeln bei +4°C aufbewahrt.

**Antifade-Lösung**

50 mg 1,4-Phenylendiamin-Dihydrochlorid werden in 5 ml PBS gelöst. Mit 0,5 M NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (pH 9,0, eingestellt mit Natronlauge) wird pH 8,0 eingestellt. Anschließend wird mit Glycerin auf 50 ml aufgefüllt und die Lösung mit einem Spritzenaufsatzfilter, Porengröße 0,22 µm, sterilfiltriert.

### DAPI-Antifade-Lösung

50 µl DAPI-Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml in bidestilliertem Wasser, werden zu 50 ml Antifade-Lösung pipettiert. Die DAPI-Antifade-Lösung wird in Aliquots zu 0,7 ml im Dunkeln bei -20°C aufbewahrt.

## 6.2. Methoden

### 6.2.1. Analytik

#### 6.2.1.1. HPLC-DAD

Für die HPLC-Analytik der Metaboliten und Abbauprodukte der FFAs, der FFAs im Inkubationsmedium sowie der dargestellten Referenzsubstanzen wird das beschriebene Beckman System Gold mit Diodenarray-Detektor (DAD) verwendet (s. 6.1.1). Die Aufzeichnung und Auswertung der Daten erfolgt mit der Software Beckman Karat 32 (Version 7.0).

#### HPLC-DAD-Parameter

Vorsäule:	Phenomenex Gemini C8, 4×3 mm
Trennsäule:	Phenomenex Luna 5µ C8(2), 250×4,6 mm
Fluss:	1 ml/min
Eluent A:	Bidestilliertes Wasser mit Ameisensäure (pH 3)
Eluent B:	Acetonitril
Wellenlänge (DAD):	225 nm

*Gradient 1:* Analyse der oxidativen Umsetzung von FFAs mit RLM, Analyse des chemoenzymatisch dargestellten Epoxids von 8,10-FFA, Analyse der  $\beta$ -Oxidation von FFAs mit Rattenlebermitochondrien, Substanzkontrollen und Bestimmung der FFAs in Inkubationsmedium

Zeit [min]	0	25	35
Eluent A [%]	70	0	0
Eluent B [%]	30	100	100

## 6. Material und Methoden

*Gradient 2:* Analyse der chemo-enzymatisch dargestellten Dioxoenfettäure aus 8,10-FFA

Zeit [min]	0	20	28
Eluent A [%]	90	0	0
Eluent B [%]	10	100	100

### 6.2.1.2. GC-MS

Für die Strukturaufklärung der Metaboliten und Abbauprodukte der FFAs, der dargestellten Epoxide und Dioxoene der FFAs und die Identifizierung der FAs der verwendeten Zelllinien und Präzisionsgewebeschnitte, wird das beschriebene System Finnigan GCQ MAT mit Ionenfalle als Massenanalysator verwendet (s. 6.1.1). Die Aufzeichnung der Daten erfolgt mit der Software GCQ Analysis (Version 2.31), die Auswertung der Daten erfolgt mit der Software Xcalibur (Version 5.0).

#### GC-MS-Parameter

Kapillarsäule:	Supelco MDN-5S (24384), 5% Diphenylsiloxan, 30 m×0,25 mm, 0,25 $\mu$ m Filmdicke
Trägergas	Helium, 1 bar
Lineare Geschwindigkeit:	40 cm/s
Injektorprogramm:	Initialtemperatur: 60°C Aufheizrate: 5°C/s Endtemperatur: 275°C
Injektionsvolumen:	1 $\mu$ l
Split-Modus:	Splitless
Transferline-Druck:	0,83 bar
Temperatur Transferline:	275°C
Temperatur Ionenquelle:	250°C
Ionisierung:	Electron Impact (EI) bei 70 eV
Massenbereich:	m/z 50-650
Scanrate:	0,5 s/Scan
Scan-Modus:	Full Scan

## 6. Material und Methoden

*Temperaturprogramm 1:* Analyse der oxidativen Metaboliten der FFAs, Analyse des chemoenzymatisch dargestellten Epoxids und Dioxoens aus 8,10-FFA

Initialtemperatur:	100°C, 2 min isotherm
Aufheizrate:	8°C/min
Endtemperatur:	275°C, 10 min isotherm

*Temperaturprogramm 2:* Analyse der Fettsäuremuster der Zelllinien und Gewebeschnitte, Analyse der Fettsäurestandards

Initialtemperatur:	160°C, 2 min isotherm
Aufheizrate 1:	5°C/min
Temperatur 1:	225°C
Aufheizrate 2:	40°C/min
Endtemperatur:	300°C, 10 min isotherm

*Temperaturprogramm 3:* Analyse der  $\beta$ -Oxidationsprodukte von FFAs mit Rattenlebermitochondrien

Initialtemperatur:	130°C, 2 min isotherm
Aufheizrate 1:	5°C/min
Temperatur 1:	225°C
Aufheizrate 2:	40°C/min
Endtemperatur:	300°C, 7 min isotherm

### **Derivatisierung**

#### ***Methylierung***

Die in Methanol gelösten Proben werden in GC-Vials überführt. Das Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand anschließend in 20  $\mu$ l TBME aufgenommen und mit 10  $\mu$ l TMSH methyliert. Die Methylierung selbst findet im Injektor der GC unter Einwirkung der Temperatur statt. Carboxyl- und Hydroxygruppen an aromatischen Systemen werden mit dieser Methode vollständig derivatisiert. Da die Methylierung mit TMSH von der Acidität der zu derivatisierenden Hydroxygruppen abhängt, werden Hydroxygruppen an aliphatischen Ketten nur teilweise methyliert. Daher wird bei nicht vollständig methylierten Verbindungen in ergänzender Weise eine Silylierung durchgeführt.

### **Silylierung**

Die in Methanol gelösten Proben werden in GC-Vials überführt. Das Lösungsmittel wird im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand anschließend in 30 µl BSTFA gelöst. Die Derivatisierung erfolgt bei Raumtemperatur über Nacht. Mit dieser Methode werden vorhandene Hydroxygruppen vollständig silyliert.

#### **6.2.1.3. GC-FID**

Das FA-Muster und der ChOL-Gehalt der Lipidfraktionen der Zelllinien und Präzisionsgewebeschnitte, sowie die eingebaute Menge an FFAs in die Lipidfraktionen von Zellen und Gewebe, werden mit den beschriebenen Systemen Fisons GC 8130 und HP GC 5890 Series II mit Flammenionisationsdetektor bestimmt (s. 6.1.1). Die Auftrennung des biologischen Materials in die Lipidfraktionen der PLs, freien FAs, CEs und TGs sowie des freien ChOLs findet mit der in 6.2.5.1 beschriebenen SPE statt. Die Aufzeichnung der Daten der Fisons GC 8130 erfolgt mit der Software Maestro (Version 2.3), die Auswertung der Daten erfolgt mit der Software Beckman Karat 32 (Version 7.0). Die Aufzeichnung und Auswertung der Daten der HP GC 5890 Series II erfolgt mit einem HP 3396 Series III Integrator.

#### **GC-FID-Parameter**

##### *Fisons GC 8130:*

Kapillarsäule:	Alltech Econo-Cap EC5, 5% Diphenylsiloxan, 30 m×0,32 mm, 0,25 µm Filmdicke
Trägergas	Helium, 1 bar
Lineare Geschwindigkeit:	30 cm/s
Injektortemperatur:	300°C
Injektionsvolumen:	1 µl
Split:	1:30
Detektortemperatur:	300°C

##### *Temperaturprogramm:*

Initialtemperatur:	180°C, 2 min isotherm
Aufheizrate 1:	5°C/min
Temperatur 1:	225°C
Aufheizrate 2:	40°C/min
Endtemperatur:	300°C, 10 min isotherm

## 6. Material und Methoden

### *HP GC 5890 Series II:*

Kapillarsäule:	Hewlett Packard HP-5, 5% Diphenylsiloxan, 30 m×0,32 mm, 0,25 µm Filmdicke
Trägergas	Helium, 1 bar
Lineare Geschwindigkeit:	30 cm/s
Injektortemperatur:	300°C
Injektionsvolumen:	1 µl
Split:	splitless
Detektortemperatur:	300°C

### *Temperaturprogramm:*

Initialtemperatur:	180°C, 2 min isotherm
Aufheizrate:	5°C/min
Endtemperatur:	300°C, 10 min isotherm

### **Methylierung**

Die Eluenten der isolierten Lipidfraktionen aus der SPE (s. 6.2.5.1) werden im Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand wird in 20 µl TBME aufgenommen und mit 10 µl TMSH umgeestert bzw. methyliert. Die Methylierung selbst findet im Injektor der GC unter Einwirkung der Temperatur statt.

#### **6.2.1.4. Kalibrierungen**

##### **HPLC-DAD**

Zur Bestimmung der Extraktionsausbeuten aus Inkubationsmedium, Durchführung der Substanzkontrollen der Inkubationsversuche mit Zellen und Präzisionsgewebeschnitten aus Rattenleber sowie der Quantifizierung der FFAs im Medium nach erfolgter Inkubation wird eine externe Kalibrierung mit 8,10-FFA erstellt. Dafür werden 20 µl der 10 mM Stammlösung von 8,10-FFA mit 180 µl TBME verdünnt. Von der erhaltenen 1 mM 8,10-FFA-Lösung werden jeweils 1, 10, 25 und 50 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert, sodass Stoffmengen von 1, 10, 25 und 50 nmol erhalten werden. Nach Entfernen des Lösungsmittels werden die Rückstände in 50 µl Methanol aufgenommen. Von jeder Kalibrierlösung werden 10 µl in die HPLC-DAD injiziert. In Abbildung 6.1 ist die Kalibriergerade dargestellt. Die

## 6. Material und Methoden

Kalibrierung wird zusätzlich mit 50 nmol einer käuflich erworbenen 9,11-FFA auf ihre Richtigkeit überprüft.

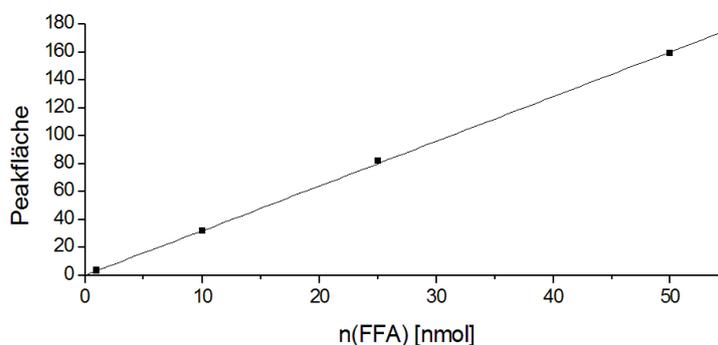


Abbildung 6.1.: Kalibriergerade für 8,10-FFA mittels HPLC-DAD, Kalibrierpunkte; 1 nmol, 10 nmol, 25 nmol, 50 nmol; Geradengleichung:  $y = 320214x$ ;  $R^2 = 0,9997$ ;  $\lambda = 225$  nm

### Fisons GC 8130

Zur Quantifizierung von 10,12-FFA und C 18:2 bei der Untersuchung des Abbaus der FAs in V79-Zellen (s. 6.2.6.2) sowie bei der Untersuchung des Einbaus von 10,12-FFA in Präzisionsgewebeschnitte aus Rattenleber werden externe Kalibrierungen erstellt. Für die Kalibrierung mit 10,12-FFA werden jeweils 10, 20, 40 und 50  $\mu$ l der 10 mM Stammlösung (in TBME) in GC-Vials pipettiert, sodass Stoffmengen von 100, 200, 400 und 500 nmol erhalten werden. Nach entfernen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom werden die Rückstände in 20  $\mu$ l TBME aufgenommen und mit 10  $\mu$ l TMSH derivatisiert. Davon wird jeweils 1  $\mu$ l in die GC-FID injiziert. Für die Kalibrierung mit C 18:2 werden 2,8 mg C 18:2 in 10 ml TBME gelöst. Von der erhaltenen 1 mM C 18:2-Lösung werden jeweils 100, 300 und 500  $\mu$ l in GC-Vials pipettiert, sodass Stoffmengen von 100, 300 und 500 nmol erhalten werden. Anschließend wird so verfahren wie bei der Kalibrierung für 10,12-FFA. In Tabelle 6.1 sind die einzelnen Geradengleichungen, Kalibrierpunkte und Bestimmtheitsmaße aufgelistet. Die Kalibriergeraden für 10,12-FFA und C 18:2 sind in den Abbildung 6.2 (A) und (B) dargestellt.

Aufgrund von Reparaturen am System und einem nicht zu gewährleistenden konstanten Splitverhältnis ist die Quantifizierung des Einbaus von 10,12-FFA nur in den oben angeführten Versuchen durchführbar.

## 6. Material und Methoden

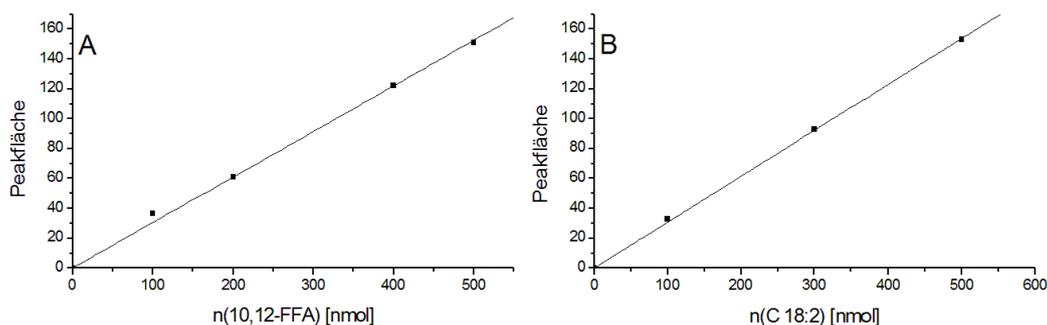


Abbildung 6.2.: Kalibriergeraden für 10,12-FFA (A) und C 18:2 (B) mittels GC-FID

Tabelle 6.1.: Kalibrierungen von Fettsäuren für GC-FID, die Geraden werden durch lineare Regression berechnet

Substanz	Kalibrierpunkte [nmol]	Geradengleichung	R <sup>2</sup>
10,12-FFA	100, 200, 400, 500	$y = 3050,4x$	0,9916
C 18:2	100, 300, 500	$y = 3077,3x$	0,9992

Für die Berechnung des PL/ChOL-Verhältnisses sowohl in den Zelllinien als auch in den Präzisionsgewebeschnitten wird eine Einpunktkalibrierung mit 250 nmol ChOL durchgeführt. Dafür werden 3,86 mg ChOL in 10 ml Chloroform gelöst. 250 µl dieser Lösung werden in einem GC-Vial im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 20 µl TBME und mit 10 µl TMSH derivatisiert. 1 µl davon wird in die GC-FID injiziert. Aus der resultierenden Peakfläche wird ein Responsefaktor zur Kalibrierung von C 18:2 von 3:1 (ChOL:FA) berechnet. Anhand dieses Faktors und der Tatsache, dass ein PL-Molekül zwei FAs enthält wird das Verhältnis berechnet.

$$PL/ChOL = \frac{Peaks[PL] \times 1,5}{Peak[ChOL]}$$

### HP GC 5890 Series II

Für die Wiederfindungen der SPE-Methode werden externe Kalibrierungen mit Trimyristat (C 14:0), Phosphatidylcholin (PC), ChOL und C 18:1 mittels GC-FID nach Derivatisierung mit TMSH erstellt. Dazu werden Stammlösungen mit 0,2 mM Trimyristat (14,4 mg in

## 6. Material und Methoden

100 ml), 500 mg/l PC (5 mg in 10 ml), 1 mM ChOL (3,86 mg in 10 ml), 1 mM Cholesteryl-  
linoleat (6,48 mg in 10 ml) und 1 mM C 18:1 (2,82 mg in 10 ml) in Chloroform hergestellt.  
Durch Verdünnung werden die in Tabelle 6.2 angegebenen Kalibrierpunkte erstellt. Alle  
Kalibrierlösungen werden im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt, in 20 µl TBME  
aufgenommen und mit 10 µl TMSH derivatisiert. Es werden jeweils 1 µl in die GC-FID  
injiziert. Die entsprechenden Kalibriergeraden sind in Abbildung 6.3 dargestellt. Die Ge-  
radengleichungen und das Bestimmtheitsmaß der daraus resultierenden Kalibrationen sind  
in Tabelle 6.2 aufgelistet.

Tabelle 6.2.: Kalibrierungen für Trimyristat, Phosphatidylcholin, Cholesterol und Ölsäure

Substanz	Kalibrierpunkte	Geradengleichung	R <sup>2</sup>
Trimyristat	2, 5, 10, 20 nmol	$y = 194687x$	0,9611
PC	5, 10, 25, 50 ng	$y = 81981x$	0,9978
ChOL	10, 25, 50, 100 nmol	$y = 7660x$	0,9896
C 18:1	5, 10, 25, 50 nmol	$y = 76653x$	0,9918

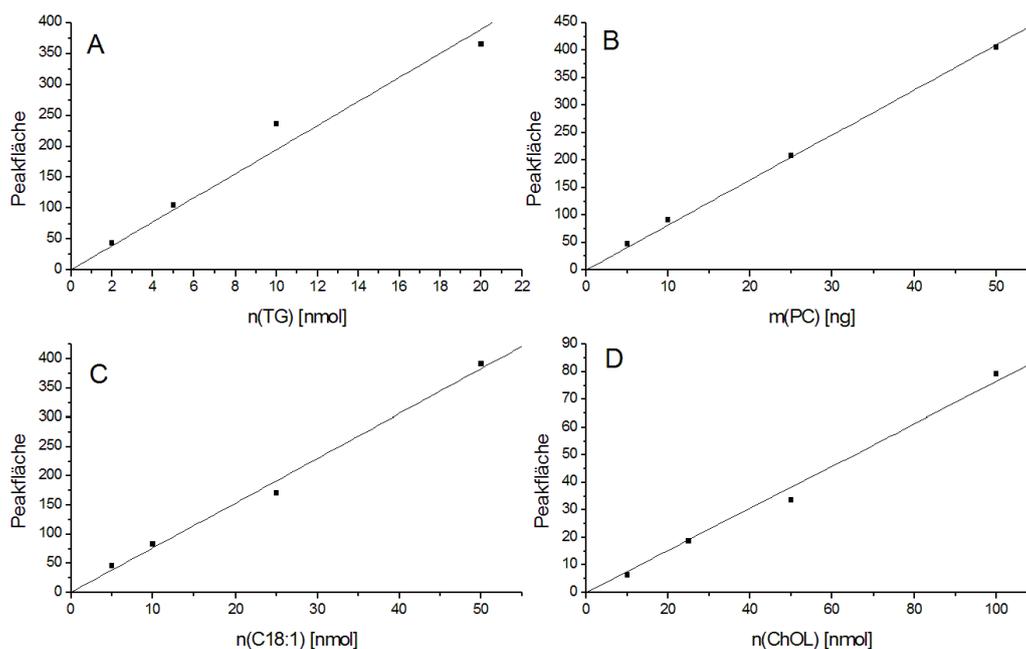


Abbildung 6.3.: Kalibriergeraden für Trimyristat (A), Phosphatidylcholin (B), Ölsäure (C) und Cholesterol (D) mittels GC-FID

Für die Quantifizierung der in FKS enthaltenen FAs wird eine externe Kalibrierung für C 18:1 mittels GC-FID im Konzentrationsbereich von 50 - 2000 ng erstellt. Dazu werden 2,5 mg C 18:1 in 10 ml TBME gelöst. 1 ml dieser Lösung wird auf 100 ml mit TBME

## 6. Material und Methoden

aufgefüllt ( $c(\text{C 18:1}) = 2,5 \mu\text{g/ml}$ ). Von dieser Lösung werden jeweils 20, 200, 400 und 800  $\mu\text{l}$  im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingeeengt, sodass Mengen von 50, 500, 1000 und 2000 ng erhalten werden. Die Rückstände werden in 20  $\mu\text{l}$  TBME aufgenommen und mit 10  $\mu\text{l}$  TMSH derivatisiert. 1  $\mu\text{l}$  der Kalibrierlösungen wird in die GC-FID injiziert. Die daraus resultierende Kalibriergerade ist in Abbildung 6.4 dargestellt. Die bestimmten Massen der einzelnen FAs werden über deren molaren Massen in die Stoffmengen umgerechnet. Auf die Bestimmung eines Responsefaktors wird verzichtet.

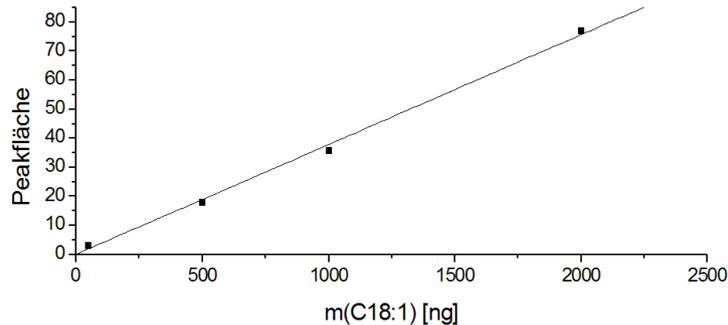


Abbildung 6.4.: Kalibriergerade für Ölsäure zur Quantifizierung der Fettsäuren in FKS mittels GC-FID, Kalibrierpunkte: 50, 500, 1000, 2000 ng, Geradengleichung:  $y = 378,36x$ ;  $R^2 = 0,9974$

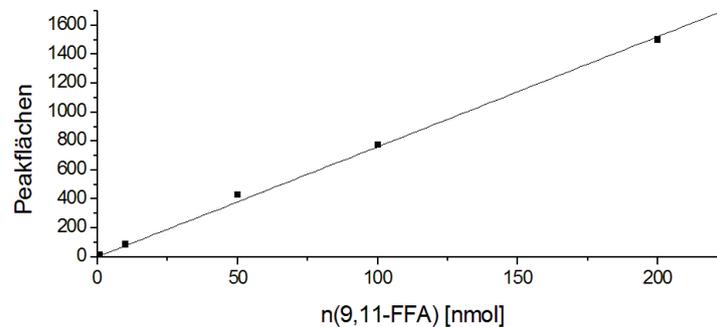


Abbildung 6.5.: Kalibriergerade für 9,11-FFA mittels GC-FID zur Quantifizierung der in Zellen nachgewiesenen 8,10- und 9,11-FFA; Kalibrierpunkte: 1, 10, 50, 100, 200 nmol; Geradengleichung:  $y = 76144x$ ,  $R^2 = 0,998$

Für die Quantifizierung von 8,10- und 9,11-FFA in Zellen und Präzisionsgewebeschnitten aus Rattenleber wird eine externe Kalibrierung mit 9,11-FFA im Konzentrationsbereich von 1 - 200 nmol mittels GC-FID erstellt. Dazu werden 20  $\mu\text{l}$  der 10 mM 9,11-FFA-Stammlösung mit 180  $\mu\text{l}$  TBME verdünnt. Von der erhaltenen 1 mM 9,11-FFA-Lösung werden 1, 10, 50, 100 und 200  $\mu\text{l}$  in GC-Vials pipettiert, sodass Stoffmengen von 1, 10, 50, 100 und 200 nmol erhalten werden. Die Lösungsmittel werden im Stickstoffstrom entfernt, die Rückstände in

20 µl TBME aufgenommen und mit 10 µl TMSH derivatisiert. 1 µl der Kalibrierlösungen wird in die GC-FID injiziert. Die Daraus resultierende Kalibriergerade ist in Abbildung 6.5 dargestellt.

## 6.2.2. Untersuchungen im zellfreien System

### 6.2.2.1. Oxidative Umsetzung mit Rattenlebermikrosomen

Alle mikrosomalen Umsetzungen der FFAs werden in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) (s. 6.1.5.1) mit 1% DMSO im Ansatz durchgeführt. Verwendet werden RLM von männlichen unbehandelten Wi-Ratten und RLM von mit Aroclor 1254 behandelten männlichen Wi-Ratten. Das Endvolumen des Reaktionsansatzes beträgt dabei 1 ml. Die Endkonzentration an Protein liegt bei allen Umsetzungen bei 1 mg/ml. Die Endkonzentration an Substrat (8,10-, 9,11- oder 10,12-FFA) in den Reaktionsansätzen beträgt 100 µM. Das NADPH-generierende System wird jeweils vor Versuchsbeginn frisch hergestellt und setzt sich wie folgt zusammen:

Reagenzien	Volumen/Einwaage	Endkonz. im Ansatz
Isocitrat-Dehydrogenase (202 U/ml)	6,4 µl	0,9 U
Isocitrat (2,33 M)	11,3 µl	9,4 mM
NADP <sup>+</sup>	3,2 mg	1,21 mM
Magnesiumchlorid (1 M)	12,9 µl	4,3 mM
Kaliumphosphatpuffer (0,1 M) pH 7,4	69,4 µl	-
	Σ 100 µl	

### Inkubation für HPLC-DAD-Analyse

Für die HPLC-DAD-Analyse werden unbehandelte bzw. mit Aroclor 1254 behandelte Wi-RLM in einem 2,0 ml Reaktionsgefäß mit je 10 µl einer 10 mM 8,10-, 9,11- oder 10,12-FFA-Lösung (in DMSO) versetzt. Das Volumen wird mit Kaliumhydrogenphosphatpuffer auf 965 µl ergänzt. Nach einer Vorinkubation von 5 min bei 37°C im Thermomixer werden jeweils 35 µl des NADPH-generierenden Systems in die Reaktionsgefäße pipettiert. Die Ansätze werden bei 37°C für 60 min inkubiert. Die Inkubation wird durch zweimaliges Extrahieren mit 500 µl Ethylacetat abgestoppt. Um eine bessere Phasentrennung zu erhalten werden die Ansätze zentrifugiert. Die vereinigten Ethylacetatphasen werden im Evaporator zur Trockene gebracht und der Rückstand wird in 50 µl Methanol aufgenommen. Davon werden 10 µl in die HPLC-DAD injiziert. Um zu überprüfen welche der gebildeten Peaks

## 6. Material und Methoden

aus den verschiedenen Ansätzen übereinstimmen, wird zur Aufnahme eines Cochromatogramms von beiden Umsetzungen der jeweiligen FFA mit unterschiedlichen Mikrosomen 20  $\mu$ l des Extrakts in ein weiteres Reaktionsgefäß pipettiert. Davon werden ebenfalls 10  $\mu$ l in die HPLC-DAD injiziert.

Die Inkubationen werden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Zu jeder Inkubation wird eine Kontrolle mitgeführt, der kein NADPH-generierendes System zugegeben wird.

### Inkubation und Aufarbeitung für GC-MS-Analyse

Für die GC-MS-Analyse werden unbehandelte Wi-RLM in einem 2,0 ml Reaktionsgefäß mit je 10  $\mu$ l einer 10 mM 8,10-, 9,11- oder 10,12-FFA-Lösung (in DMSO) versetzt und wie für die HPLC-DAD-Analyse beschrieben inkubiert und extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatphasen werden im Evaporator bis zur Trockene eingengt und der Rückstand wird in 50  $\mu$ l Methanol aufgenommen. Davon werden zur Bestimmung der Retentionszeiten der Produktpeaks 10  $\mu$ l in die HPLC injiziert. Der restliche Extrakt wird anschließend mittels HPLC fraktioniert. Die Fraktionen werden im Stickstoffstrom zur Trockene gebracht. Die Rückstände werden in 50  $\mu$ l Methanol aufgenommen. Je 10  $\mu$ l davon werden in die HPLC zur Überprüfung der isolierten Peaks injiziert. Die verbliebenen Fraktionen werden in GC-Vials überführt, das Methanol wird im Stickstoffstrom entfernt und nach Derivatisierung wird eine GC-MS-Analyse durchgeführt.

#### 6.2.2.2. $\beta$ -Oxidation mit Rattenlebermitochondrien

Die  $\beta$ -Oxidation der FFAs im zellfreien System wird in wässriger Lösung mit 0,02 M HEPES bei pH 7,4 und 1% DMSO in einem Ansatz mit 1,0 ml Gesamtvolumen durchgeführt. Verwendet werden Lebermitochondrien von männlichen SD-Ratten. Die Endkonzentration an Protein liegt bei 800  $\mu$ g/ml, die Endkonzentration an Substrat (8,10- oder 10,12-FFA) beträgt 100  $\mu$ M in den Reaktionsansätzen. Inkubiert wird über einen Zeitraum von 24 h.

#### Durchführung

In ein 2,0 ml Reaktionsgefäß werden folgende Volumina an Reagenzien pipettiert, sodass sich die in der unten stehenden Tabelle angegebenen Endkonzentrationen in einem Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 1,0 ml ergeben:

## 6. Material und Methoden

Reagenz (Konzentration)	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Endkonz. im Ansatz
HEPES-Puffer (0,2 M, pH 7,4)	100	20 mM
Kaliumchlorid-Lösung (0,3 M)	100	30 mM
Magnesiumchlorid-Lösung (85 mM)	100	8,5 mM
ATP-Lösung (50 mM )	100	5 mM
CoA-Lösung (1,6 mM)	100	0,16 mM
Dithioerythritol-Lösung (100 mM)	10	1 mM
NAD-Lösung (100 mM)	10	1 mM
FAD-Lösung (17 mM)	10	0,17 mM
L-Carnitin-Lösung (250 mM)	10	2,5 mM
EDTA-Lösung (20 mM)	10	0,2 mM
$\alpha$ -Tocopherol-Lösung in DMSO (0,1 mM)	5	5 $\mu\text{M}$
FFA-Lösung in DMSO (20 mM)	5	0,1 mM
Mitochondrien	je nach Proteinkonz.	800 $\mu\text{g/ml}$
Wasser	ad 1000	-

Soweit nicht anders angegeben werden alle Lösungen mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

Der Reaktionsansatz wird bei 37°C inkubiert. Von einem Cofaktoren-Mix aus jeweils 40  $\mu\text{l}$  500 mM ATP-Lösung, 16 mM CoA-Lösung, 100 mM NAD-Lösung, 17 mM FAD-Lösung und 250 mM L-Carnitin-Lösung werden nach 3 h, 6 h und 9 h Inkubationszeit jeweils 50  $\mu\text{l}$  in den Reaktionsansatz pipettiert. Nach Ablauf der 24 h wird der Ansatz mit 200  $\mu\text{l}$  Ethanol und 20  $\mu\text{l}$  1 M Kalilauge für 30 min bei Raumtemperatur verseift. Anschließend wird mit 40  $\mu\text{l}$  6 M Salzsäure angesäuert und mit  $3 \times 500 \mu\text{l}$  n-Hexan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden für die GC-MS-Analyse in GC-Vials überführt, im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt, in 20  $\mu\text{l}$  TBME aufgenommen und mit 10  $\mu\text{l}$  TMSH methyliert. Für die HPLC-DAD-Analyse wird das Lösungsmittel ebenfalls im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand in 300  $\mu\text{l}$  Methanol aufgenommen. Es werden 100  $\mu\text{l}$  in die HPLC-DAD injiziert. Es wird ein Kontrolle mit denaturierten Mitochondrien mitgeführt.

### 6.2.3. Darstellung von Vergleichssubstanzen

#### 6.2.3.1. Chemo-enzymatische Epoxidierung von Furanfettsäuren

Die Epoxidierung von 8,10-FFA erfolgt auf chemo-enzymatischem Weg, in Anlehnung an die Methode von Klaas und Warwel (1999). Dabei wird *in situ* durch eine Lipase aus

Dimethylcarbonat und Wasserstoffperoxid eine Peroxysäure gebildet, die olefinische Systeme epoxidiert. Es wird eine 10 mM Endkonzentration an 8,10-FFA im Reaktionsansatz eingesetzt.

### Durchführung

10  $\mu\text{mol}$  8,10-FFA (Endkonzentration im Ansatz 10 mM) werden in einem 2,0 ml Reaktionsgefäß in 100  $\mu\text{l}$  Dimethylcarbonat aufgenommen. Das Volumen wird mit Methanol auf 1,0 ml ergänzt. 2 mg Novozym<sup>TM</sup> 435 werden zur Reaktionsmischung gegeben. Nach Zugabe von 3  $\mu\text{l}$  Wasserstoffperoxid (30%) wird der Reaktionsansatz bei 20°C im Thermomixer geschüttelt. Stündlich werden über einen Zeitraum von 6 h weitere 3  $\mu\text{l}$  Wasserstoffperoxid zugegeben, sodass nach Ablauf der 6 h insgesamt 21  $\mu\text{l}$  zum Reaktionsansatz gegeben wurden. Der Reaktionsansatz wird weitere 16 h bei 20°C geschüttelt. Nach Ablauf der Zeit werden je eine Spatelspitze Natriumsulfat und Natriumsulfit in das Reaktionsgefäß gegeben, um das überschüssige Wasserstoffperoxid zu reduzieren und das entstandene Wasser zu entfernen. Nach weiteren 15 min schütteln wird 5 min bei 12000 U/min zentrifugiert und der Überstand mit der Pipette abgenommen. 10  $\mu\text{l}$  des Überstands werden in die HPLC-DAD injiziert, um auf entstandene Produkte zu prüfen. Anschließend findet eine Fraktionierung der Produktpeaks mittels HPLC statt. Von den gesammelten Fraktionen wird das Acetonitril im Evaporator entfernt und die verbliebene wässrige Phase zweimal mit 500  $\mu\text{l}$  Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatphasen werden im Evaporator bis zur Trockene eingengt und in 50  $\mu\text{l}$  Methanol aufgenommen. 10  $\mu\text{l}$  werden in die HPLC-DAD injiziert, zur Überprüfung der isolierten Peaks. Die restlichen 40  $\mu\text{l}$  werden in GC-Vials überführt, im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt, in 20  $\mu\text{l}$  TBME aufgenommen und mit 10  $\mu\text{l}$  TMSH methyliert. Anschließend werden sie mittels GC-MS analysiert (s. 6.2.1.2).

Parallel dazu wird eine Kontrolle mit allen Substanzen, aber ohne 8,10-FFA angesetzt, um Peaks in HPLC und GC identifizieren zu können, die nicht aus der Muttersubstanz gebildet werden.

### 6.2.3.2. Chemo-enzymatische Dioxoenbildung aus Furanfettsäuren

Die Bildung von Dioxoenen aus 8,10-FFA wird nach der Methode von Batna und Spitelner (1994b) durchgeführt. Dabei dient C 18:2 als Co-Substrat und wird durch Lipoxydase zu ihrem Monohydroperoxid oxidiert. Katalysiert durch Metallionen entstehen Alkoxyradikale, die bei FFAs auf radikalischem Wege eine Ringöffnung hervorrufen. Als stabile Endprodukte dieser Reaktion werden *cis*-Dioxoene der FFAs gebildet. Es wird eine 100  $\mu\text{M}$  Endkonzentration an 8,10-FFA eingesetzt.

### Durchführung

5  $\mu\text{l}$  einer 20 mM 8,10-FFA-Lösung (in Methanol), 2  $\mu\text{l}$  einer 125 mM C 18:2-Lösung (in Methanol) und 15  $\mu\text{l}$  einer 1,6 mM Lipoxydase-Lösung (in Wasser) werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit 0,1 M Boratpuffer (pH 9,0) auf 1,0 ml aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wird bei 25°C für 4 h im Thermomixer inkubiert. Danach wird die Reaktion mit 10  $\mu\text{l}$  6 M Salzsäure abgestoppt. 100  $\mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes werden in die HPLC-DAD injiziert. Um bei dieser Reaktion entstandene Peaks zu identifizieren wird eine Kontrolle ohne Lipoxydase durchgeführt, von der ebenfalls 100  $\mu\text{l}$  in die HPLC injiziert werden. Die HPLC-Fraktion des Produktpeaks wird gesammelt, das Acetonitril im Evaporator entfernt und die verbleibende wässrige Phase mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach entfernen des Lösungsmittels im Evaporator wird der Rückstand in 400  $\mu\text{l}$  Methanol aufgenommen. 100  $\mu\text{l}$  werden zur Überprüfung des gesammelten Peaks in die HPLC injiziert. Die verbliebene Fraktion wird in ein GC-Vial überführt, das Methanol im Stickstoffstrom entfernt, der Rückstand in 15  $\mu\text{l}$  TBME aufgenommen und mit 7,5  $\mu\text{l}$  TMSH derivatisiert. Anschließend wird eine GC-MS-Analyse der Fraktion durchgeführt.

#### 6.2.4. Genotoxizitäts- und Cytotoxizitätsassay

Alle Zelllinien werden ausschließlich im Brutschrank in einer H<sub>2</sub>O-gesättigten, 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C inkubiert und kultiviert. Alle FFA-Lösungen werden mit DMSO hergestellt. Die DMSO-Konzentration beträgt bei allen Inkubationen 0,5%.

##### 6.2.4.1. MTT-Assay

Der MTT-Assay dient zur Bestimmung der cytotoxischen Wirkung von Substanzen. Das Prinzip dieses Assays beruht darauf, dass das gelbe Methylthiazolyldiphenyltetrazolium (MTT) nach Endocytose, durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase unter Ringöffnung, reaktiv zum blauen Formazan umgewandelt wird (Abb. 6.6). Dieses kann durch Zellyse freigesetzt und bei seinem Absorptionsmaximum von  $\lambda = 570 \text{ nm}$  photometrisch bestimmt werden. Die Bildung des Formazans spiegelt den Redox-Status der Zellpopulation wider und dient somit als Maß für die Viabilität. Wird die Zellzahl durch cytotoxische Stoffe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollpopulation verringert, so wird weniger Formazan gebildet.



im Multititerplattenlesegerät geschüttelt und anschließend die Absorption photometrisch bei  $\lambda = 570$  nm gemessen. Die gemessenen Extinktionen werden auf die DMSO-Kontrolle (0,5%) bezogen und als prozentualer Anteil dieser angegeben. Der MTT-Assay wird unter den jeweiligen Versuchsbedingungen als Dreifachbestimmung ausgeführt.

### 6.2.4.2. Mikrokerntest

Der MN-Test dient zur Untersuchung des genotoxischen Potentials von Substanzen. Durch hervorgerufene Strangbrüche und/oder Schädigung der Mitosespindel liegen nach der Mitose von einer Kernmembran umhüllte Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen außerhalb des Zellkerns vor, die als MN bezeichnet werden. Zellen werden hierfür mit einer Testsubstanz inkubiert und anschließend substanzfrei nachinkubiert. Nach Fluoreszenzfärbung der DNA wird die veränderte MN- und Mitose-Rate im Vergleich zu unbehandelten Zellen fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

### Inkubation der Zellen

Der MN-Test wird mit V79-Zellen durchgeführt. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wird eine Suspension mit einer Dichte von 20.000 Zellen/ml DMEM (10% FKS (V/V)) hergestellt. In Quadripermschalen werden jeweils 5 ml dieser Zellsuspension pro Objektträger (OT) aufgebracht, was einer Zellzahl von 100.000 Zellen pro OT entspricht. Anschließend werden die Zellen für ca. 12 h kultiviert. Danach wird das Medium abgesaugt und jeweils durch 5 ml FKS-freies DMEM ersetzt, das die entsprechende FFA enthält. Die Endkonzentrationen im Medium betragen dabei für 8,10-FFA 10, 20 und 100  $\mu$ M, für 10,12-FFA 20, 30, 40, 50  $\mu$ M. Zusätzlich wird mit 10,12-FFA eine Inkubation mit FKS-haltigem Medium durchgeführt. Dazu werden die OTs nach 12 h Kultivierung mit 5 ml DMEM (FKS 10% (V/V)) versetzt, das 10,12-FFA in Konzentrationen von 50, 75 und 100  $\mu$ M enthält. Es wird eine Negativkontrolle mitgeführt, der nur DMSO zugegeben wird und eine Positivkontrolle, mit einer Endkonzentration von 0,5  $\mu$ M NQO (100  $\mu$ M in DMSO), zur Erzeugung klastogener MN.

Die Zellen werden 6 h mit den Substanzen inkubiert. Anschließend wird das Medium aus den Kammern der Quadripermschalen abgesaugt und jeweils durch 5 ml frisches DMEM (10% FKS (V/V)) ersetzt. Die Nachinkubation erfolgt über 24 h, damit mindestens ein weiterer Zellzyklus der Zellen durchlaufen wird. Zur Fixierung werden die OT mit einer Pinzette aus den Quadripermschalen genommen und bis zur weiteren Verwendung (mindestens 1 h) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Methanol gelagert.

### Auswertung

Die OTs werden aus dem Methanol genommen und an der Luft getrocknet. Anschließend werden 3 Tropfen (ca. 30  $\mu$ l) DAPI-Antifade-Lösung (s. 6.1.5.3) zur Anfärbung der DNA auf die OTs gegeben, diese mit einem Deckglas bedeckt und im Löschpapierblock trocken gestrichen. Die Analyse der Präparate erfolgt mit einem Fluoreszenzmikroskop. Es werden pro OT zweimal 1000 Zellen ausgezählt, wobei pro FFA und Konzentration 3 OTs verschiedener Zellpassagen ausgewertet werden. Bestimmt wird die Anzahl an MN und die Anzahl der Zellen in Mitose.

### 6.2.5. Bestimmung der Fettsäuremuster

#### 6.2.5.1. Festphasenextraktion

Zur Auftrennung der Extrakte der Zellen, des FKS und der Präzisionsgewebeschnitte in die Lipidfraktionen der PLs, freien FAs, CEs sowie TGs und des freien ChOLs wird eine SPE angewendet. Hierbei werden zum einen die unterschiedlichen Polaritäten der zu trennenden Substanzen ausgenutzt, zum anderen die Fähigkeit der verwendeten polaren Amino-Phase ( $\text{NH}_2$ -Phase) wie ein Ionentauscher zu wirken. Die Durchführung ist in Abbildung 6.7 schematisch dargestellt.

#### Durchführung

Die SPE-Kartuschen mit 200 mg  $\text{NH}_2$ -Phase und einem Volumen von 3 ml werden mit 4 ml n-Hexan konditioniert. Die Kartuschen dürfen bei der Konditionierung nicht trocken laufen.

Die Extraktion des Zelllysats, des FKS oder der in kaltem PBS homogenisierten Präzisionsgewebeschnitte erfolgt in Anlehnung an die Methode von Folch et al. (1957). Hierzu wird dreimal mit Chloroform/Methanol (2:1 (V/V), Folch-Reagenz) extrahiert. Das Lösungsmittel wird im Evaporator entfernt und der Rückstand mit  $2 \times 50 \mu\text{l}$  Chloroform auf die SPE-Kartuschen gegeben. Die Probe wird bis zur oberen Grenze der  $\text{NH}_2$ -Phase abgesaugt. In Schritt 1 werden 4 ml Eluent A aufgegeben und die Fraktion der CEs, TGs und des ChOL in einem GC-Vial gesammelt. Diese wird im Stickstoffstrom zur Trockene gebracht und der Rückstand für Schritt 2 (Abb. 6.7, Schritt 2) in 50  $\mu\text{l}$  n-Hexan aufgenommen. Weiterhin werden in Schritt 1 mit 4 ml Eluent B die freien FAs und mit 4 ml Eluent C die PLs eluiert. Eluent C wird bis zur Trockene der SPE-Kartusche abgezogen. Beide Fraktionen werden in GC-Vials gesammelt und im Stickstoffstrom zur Trockene gebracht.

## 6. Material und Methoden

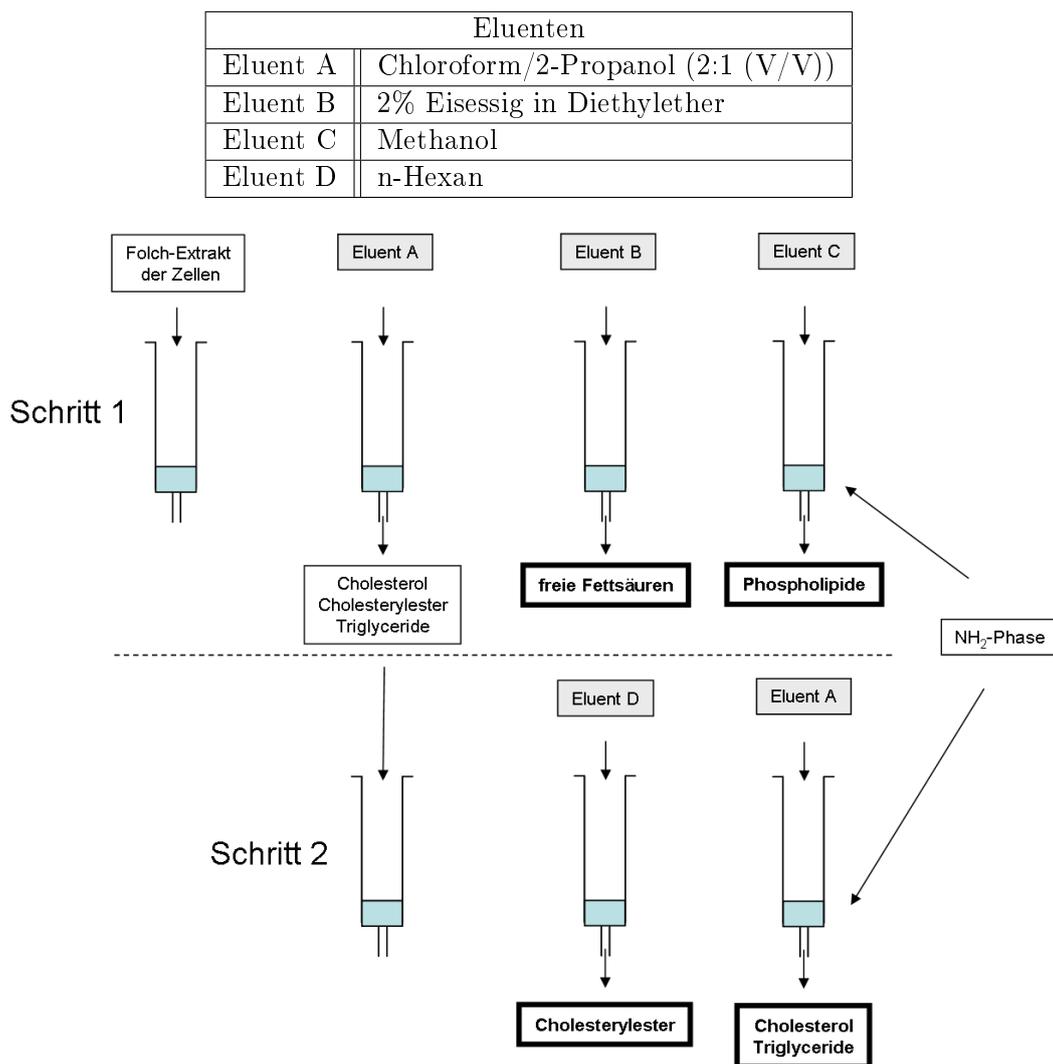


Abbildung 6.7.: Schematische Darstellung der Durchführung der Festphasenextraktion zur Trennung von biologischem Material in die Fraktionen der Phospholipide, freien Fettsäuren, Cholesterylester und Triglyceride + freiem Cholesterol, Schritt 1: Fraktionen Phospholipide und freie Fettsäuren, Schritt 2: Fraktionen der Cholesterylester und der Triglyceride + freiem Cholesterol

Für Schritt 2 wird der in n-Hexan gelöste Rückstand der ersten Fraktion (CE, TG, ChOL) auf frische mit n-Hexan konditionierte SPE-Kartuschen gegeben und das GC-Vial mit 50 µl n-Hexan nachgespült. 500 µl Eluent D werden auf die Kartusche gegeben, bis zur oberen Grenze der NH<sub>2</sub>-Phase abgesaugt und verworfen. Anschließend werden mit 4 ml Eluent D die CEs und mit 4 ml Eluent A die TGs und das freie ChOL eluiert. Beide Fraktionen werden in GC-Vials gesammelt und im Stickstoffstrom zur Trockene gebracht. Alle vier Fraktionen werden wie in 6.2.1.3 beschrieben mit TMSH derivatisiert und mittels GC-FID analysiert.

### Überprüfung der Trennung

100  $\mu\text{l}$  einer Standardlösung, die aus jeweils ca. 3 mg Trimyristat, PC, Cholesteryllinoleat, ChOL und 8,10-FFA in 10 ml Chloroform besteht, wird mit der beschriebenen Methode fraktioniert. Mit der anschließenden GC-FID-Analyse nach Derivatisierung mit TMSH (s. 6.2.1.3) kann gezeigt werden, dass die einzelnen Lipidfraktionen sauber voneinander abgetrennt werden und keine Verunreinigungen durch andere Lipidfraktionen nachweisbar sind.

### Wiederfindung der Methode

Zur Bestimmung der Wiederfindungen der Fraktionen wird die SPE-Methode einzeln mit Standardlösungen von Trimyristat (0,2 mM), PC (500 mg/l), ChOL (1 mM), Cholesteryllinoleat (1 mM) und C 18:1 (1 mM) durchgeführt. Von der PC-Lösung und der C 18:1-Lösung werden jeweils 50  $\mu\text{l}$  auf die SPE-Kartuschen gegeben. Von der Trimyristat-Lösung, der ChOL-Lösung und der Cholesteryllinoleat-Lösung werden jeweils 25  $\mu\text{l}$  auf die SPE-Kartuschen gegeben. Nach Durchführung der SPE-Methode wird von den Fraktionen das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Die Rückstände werden in 20  $\mu\text{l}$  TBME aufgenommen und mit 10  $\mu\text{l}$  TMSH derivatisiert. Davon wird 1  $\mu\text{l}$  in die GC-FID injiziert. Die Wiederfindungen werden anhand der externen Kalibrierungen von Trimyristat, PC, ChOL und C 18:1 (s. 6.2.1.4; Tab. 6.2) bestimmt. Die Wiederfindung für Cholesteryllinoleat wird dabei anhand der Kalibrierung für C 18:1 bestimmt. Die Wiederfindungen der einzelnen Fraktionen sind in Tabelle 6.3 wiedergegeben.

Tabelle 6.3.: Wiederfindungen der SPE-Methode für die einzelnen Lipidfraktionen der Triglyceride, Phospholipide, freien Fettsäuren, Cholesterylester und des freien Cholesterols

Fraktion	eingesetzte Menge	gefundene Menge	WDF [%]
TG	5 nmol	4,1 nmol	82,4
PL	25 ng	25,6 ng	99,9
freie FA	50 nmol	46,8 nmol	93,6
CE	25 nmol	18,1 nmol	74,5
ChOL	25 nmol	23,3 nmol	93,4

Des Weiteren werden die in Tabelle 6.3 angegebenen Mengen der Standardsubstanzen in 50  $\mu\text{l}$  DMSO gelöst. Die DMSO-Lösungen werden mit 5 ml PBS gemischt. Es erfolgt eine Extraktion mit  $3 \times 1$  ml Folch-Reagenz. Nach entfernen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom wird ebenfalls jeweils die SPE-Methode durchgeführt. Anschließend werden die

Rückstände der Fraktionen in 20 µl TBME aufgenommen und mit 10 µl TMSH derivatisiert. Die Bestimmung der Wiederfindungen nach Extraktion wird wie beschrieben mittels GC-FID bestimmt. Die Wiederfindungen nach Extraktion sind in Tabelle 6.4 wiedergegeben. Alle Wiederfindungen werden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Tabelle 6.4.: Wiederfindungen der SPE-Methode für die einzelnen Lipidfraktionen der Triglyceride, Phospholipide, freien Fettsäuren, Cholesterylester und des freien Cholesterols nach Extraktion

Fraktion	eingesetzte Menge	gefundene Menge	WDF [%]
TG	5 nmol	4,25 nmol	85,0
PL	25 ng	20,6 ng	82,5
freie FA	50 nmol	44,7 nmol	89,5
CE	25 nmol	18,5 nmol	73,8
ChOL	25 nmol	21,8 nmol	87,3

#### 6.2.5.2. Bestimmung der Fettsäuren von FKS

1 ml FKS wird mit  $2 \times 500$  µl Folch-Reagenz extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden in GC-Vials unter Stickstoff abgeblasen. Anschließend wird der Extrakt mittels SPE (s. 6.2.5.1) in die Lipidfraktionen der TGs, PLs, freien FAs und CEs aufgetrennt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom werden die Rückstände der Fraktionen in 20 µl TBME aufgenommen und mit 10 µl TMSH derivatisiert. Von den erhaltenen Lösungen werden 1 µl in die GC-FID injiziert. Anhand der Retentionszeiten eines externen FSME-Standards werden die FAs identifiziert. Die Quantifizierung der FAs in den einzelnen Lipidfraktionen erfolgt anhand der Kalibriergeraden für C 18:1 (50 - 2000 ng, s. 6.2.1.4, Abb. 6.4). Die Extraktion mit anschließender SPE und GC-FID-Analyse wird als Doppelbestimmung durchgeführt.

#### 6.2.5.3. Bestimmung der Fettsäuremuster von Säugerzellen

Je  $5 \times 10^6$  V79-, HT-29- und HepG2-Zellen in 1,0 ml PBS werden mit  $2 \times 500$  µl Folch-Reagenz extrahiert und wie in 6.2.5.1 beschrieben mittels SPE fraktioniert. Anschließend wird das FA-Muster der einzelnen Lipidfraktionen (PL, freie FA, CE, TG) und das freie ChOL nach Derivatisierung mit TMSH mittels GC-FID analysiert. Zur Identifizierung wird hier ebenfalls der externe FSME-Standard herangezogen. Des Weiteren wird der Folch-Extrakt jeder Zelllinie nach Derivatisierung mit TMSH einer GC-MS Analyse unterzogen, um die Identität der enthaltenen FAs zu bestätigen. Die Bestimmungen der FA-Muster der drei Zelllinien werden als Doppelbestimmung aus zwei unterschiedlichen Zellpassagen

durchgeführt. Das PL/ChOL-Verhältnis wird aus den gesamten Peakflächen der FAs der PL-Fraktion und der Peakfläche des freien ChOLs mit der in 6.2.1.3 wiedergegebenen Formel berechnet.

### 6.2.6. Einfluss von Fettsäuren auf Zellen

Alle Zelllinien werden ausschließlich im Brutschrank in einer H<sub>2</sub>O-gesättigten, 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C inkubiert und kultiviert. Alle FFA-Lösungen werden mit DMSO hergestellt. Die DMSO-Konzentration beträgt bei allen Inkubationen 0,5%.

#### 6.2.6.1. Einbau von Fettsäuren in Lipide von V79-Zellen

Es werden  $3 \times 10^6$  V79-Zellen in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm in 10 ml DMEM (10% FKS (V/V)) ausgestreut. Die Zellen werden für ca. 12 h inkubiert. Danach wird das Medium abgesaugt und durch 10 ml DMEM mit der entsprechenden FA ersetzt. Die Endkonzentration an Substanz beträgt bei allen Inkubationen 50 µM. Standardmäßig werden nach Beendigung aller Inkubationen die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen und mit 1,5 ml Trypsin abtrypsiniert. Anschließend werden sie mit 5 ml PBS in Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspensionen werden mit  $3 \times 1$  ml Folch-Reagenz extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Evaporator zur Trockene gebracht. Der Rückstand wird wie in 6.2.5.1 beschrieben mittels SPE in die Lipidfraktionen der PLs, freien FAs, CEs und TGs aufgetrennt, deren FA-Muster nach Derivatisierung mit 10 µl TMSH in 20 µl TBME mittels GC-FID analysiert wird. Außerdem werden je Zellkulturschale 5 ml Medium in Zentrifugenröhrchen überführt und mit  $3 \times 1$  ml Folch-Reagenz extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden im Evaporator bis zur Trockene eingengt. Anschließend erfolgt je nach Fragestellung eine GC-FID-Analyse nach Derivatisierung oder eine HPLC-DAD-Analyse. Alle Inkubationen und anschließenden Analysen werden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

#### Verfügbarkeit von FFAs im Kulturmedium

Um die Verfügbarkeit der FFAs im Medium für den Einbau in die Lipide von Zellen zu untersuchen werden V79-Zellen mit 50 µM 8,10- oder 10,12-FFA in DMEM für eine Dauer von 6 h inkubiert. Für die Inkubation mit beiden Substanzen wird sowohl FKS-haltiges als auch FKS-freies DMEM verwendet. Nach Beendigung der Inkubationen werden Zellen und Medium extrahiert. Die Rückstände der Zell- und Mediumextrakte werden in 20 µl TBME aufgenommen und mit 10 µl TMSH derivatisiert. Sowohl von den Zellextrakten als auch

von den Mediumextrakten werden jeweils und in die GC-FID injiziert. Die mittels GC-FID bestimmten Peakflächen der FFAs in den Lipiden der Zellen und den Inkubationsmedien der verschiedenen Versuche werden zur Auswertung miteinander verglichen. Der Gehalt an FFAs im Medium wird relativ zur gesamten nachgewiesenen Menge an FFAs in Zellen und Medium angegeben. Der Anteil der jeweiligen FFA in den analysierten Zellen wird relativ zur Gesamtmenge an FAs in den Zellen angegeben.

### **Einbau von FFAs in Lipide von V79-Zellen**

Alle Inkubationen die zur Untersuchung des Einbaus von FFAs in die Lipide von V79-Zellen durchgeführt werden, erfolgen mit FKS-freiem DMEM. Es werden Inkubationen mit einer Endkonzentration von jeweils 50  $\mu\text{M}$  8,10- oder 10,12-FFA für 1, 3 und 6 h durchgeführt. Des Weiteren wird eine Inkubation mit einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  9,11-FFA für 3 h durchgeführt. Der Anteil der jeweiligen FFA in den analysierten Lipidfraktionen wird relativ zur Gesamtmenge an FAs in den jeweiligen Lipidfraktionen angegeben. Außerdem erfolgt eine Quantifizierung der eingebauten Menge von 8,10- und 9,11-FFA nach einer Inkubationsdauer von 3 h in den FFA enthaltenden Lipidfraktionen mittels GC-FID anhand der Kalibrierung von 9,11-FFA (s. 6.2.1.4, Abb. 6.5). Zur Bestimmung der im Medium verbliebenen 8,10- und 9,11-FFA nach 3 h Inkubationsdauer wird der Rückstand des Mediumextrakts in 50  $\mu\text{l}$  Methanol aufgenommen. Davon werden 10  $\mu\text{l}$  in die HPLC-DAD injiziert. Die Quantifizierung erfolgt anhand der Kalibrierung für HPLC-DAD (s. 6.2.1.4, Abb. 6.1)

### **Einbau von C 18:2 in Lipide von V79-Zellen**

Die Inkubationen zur Untersuchung des Einbaus von C 18:2 in die Lipide von V79-Zellen erfolgen mit FKS-freiem DMEM für 3 h. Eingesetzt werden 50  $\mu\text{M}$  C 18:2. Bei den beschriebenen Versuchen erfolgt nur eine Extraktion, Fraktionierung und GC-FID-Analyse der Zellen. Das Medium wird verworfen. Der Anteil der jeweiligen FA in den analysierten Lipidfraktionen wird relativ zur Gesamtmenge an FAs in den jeweiligen Lipidfraktionen angegeben.

#### **6.2.6.2. Abbau von Fettsäuren in Lipiden von V79-Zellen**

Es werden  $3 \times 10^6$  V79-Zellen in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm in 10 ml DMEM (10% FKS (V/V)) ausgestreut. Die Zellen werden für ca. 12 h kultiviert. Danach wird das DMEM abgesaugt und durch Inkubationsmedium ersetzt. Es werden

## 6. Material und Methoden

Inkubationen mit 50  $\mu\text{M}$  C 18:2, 8,10-, 9,11- oder 10,12-FFA in FKS-freiem DMEM für 3 h durchgeführt. Anschließend wird das Inkubationsmedium abgesaugt und durch 10 ml frisches DMEM ersetzt. Die Substanzfreie Nachinkubation erfolgt bei C 18:2 und 10,12-FFA für 3, 6, 12, 24, 36 und 48 h mit FKS-haltigem DMEM (10% FKS (V/V)). Für 8,10- und 9,11-FFA werden Nachinkubationen für 30, 60 und 180 min mit FKS-freiem DMEM durchgeführt. Ein 0 h-Wert, ohne Nachinkubation, wird jeweils ebenfalls bestimmt. Das Abtrypsinieren und die Aufarbeitung der Zellen für die GC-FID-Analyse erfolgt wie in 6.2.6.1 beschrieben, das Medium wird verworfen. Für die Betrachtung des Abbaus der FAs in den analysierten Lipiden werden die Stoffmengen anhand der Kalibrierungen für C 18:2, 10,12-FFA (s. 6.2.1.4, Abb. 6.2) und 9,11-FFA (s. 6.2.1.4, Abb. 6.5) bestimmt. Alle Inkubationen und anschließende Analysen werden als Doppelbestimmung durchgeführt.

### 6.2.6.3. $\beta$ -Oxidation von Furanfettsäuren in V79-Zellen

Um die  $\beta$ -Oxidation in Zellen zu untersuchen wird verfahren, wie bei der Untersuchung des Abbaus von FAs in Lipiden von V79-Zellen (s. 6.2.6.2). Es wird 50  $\mu\text{M}$  8,10- oder 10,12-FFA eingesetzt. Die substanzfreie Nachinkubation wird für 24 h mit FKS-haltigem DMEM (10% FKS (V/V)) durchgeführt. Danach werden 5 ml des Mediums mit  $2 \times 3$  ml Folch-Reagenz extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden im Evaporator bis zur Trockene eingengt, der Rückstand in 20  $\mu\text{l}$  TBME aufgenommen und mit 10  $\mu\text{l}$  TMSH derivatisiert. Anschließend erfolgt eine GC-MS-Analyse, um  $\beta$ -Oxidationsprodukte zu identifizieren.

### 6.2.6.4. Einbau von Furanfettsäuren in Lipide von HT-29-Zellen

Es werden  $3 \times 10^6$  HT-29-Zellen in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm in 10 ml DMEM (10% FKS (V/V)) ausgestreut. Die Zellen werden für ca. 24 h inkubiert. Danach wird das Medium abgesaugt und durch 10 ml DMEM mit 8,10- 9,11- oder 10,12-FFA ersetzt. Die Endkonzentration an Substanz beträgt 50  $\mu\text{M}$ . Nach Beendigung der Inkubationen werden die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen und mit 1,5 ml Trypsin abtrypsiniert. Anschließend werden sie mit 5 ml PBS in Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspensionen wird mit  $3 \times 1$  ml Folch-Reagenz extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Evaporator bis zur Trockene eingengt. Die Rückstände werden wie in 6.2.5.1 beschrieben mittels SPE in die Lipidfraktionen der PLs, freien FAs, CEs und TGs aufgetrennt und deren FA-Muster nach Derivatisierung mit 10  $\mu\text{l}$  TMSH in 20  $\mu\text{l}$  TBME mittels GC-FID analysiert. Die Quantifizierung von 8,10- und 9,11-FFA in den Lipidfraktionen erfolgt anhand der Kalibrierung für 9,11-FFA (s. 6.2.1.4, Abb. 6.5). Von den Inkubationsmedien werden jeweils 5 ml Medium in Zentrifugenröhrchen überführt und mit  $3 \times 1$  ml Folch-Reagenz extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden im

## 6. Material und Methoden

Evaporator zur Trockene gebracht, der Rückstand in 50 µl Methanol aufgenommen und dessen FFA-Gehalt mittels HPLC-DAD anhand der Kalibrierung von 8,10-FFA (s. 6.2.1.4, Abb. 6.1) bestimmt. Alle Inkubationen und anschließenden Analysen werden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

### 6.2.6.5. Einbau von Furanfettsäuren in Lipide von HepG2-Zellen

Für die Untersuchung des Einbaus von FFAs in HepG2-Zellen wird analog zu der beschriebenen Methode in 6.2.6.4 verfahren. Als Kulturmedium wird DMEM/F12 (10% FKS (V/V)) und als Inkubationsmedium FKS-freies DMEM/F12 verwendet.

### 6.2.6.6. Substanzkontrollen in Zellkultur

Für die Substanzkontrolle werden 20 ml FKS-freies DMEM jeweils mit 50 µM 8,10- oder 9,11-FFA versetzt. 5 ml werden direkt mit 3 × 1 ml Folch-Reagenz extrahiert. Das Lösungsmittel wird im Evaporator entfernt. Die Rückstände werden in 50 µl Methanol aufgenommen. Davon werden 10 µl in die HPLC-DAD injiziert. 10 ml des Mediums werden ohne Zellen 3 h im Brutschrank inkubiert. Es werden ebenfalls 5 ml des Mediums extrahiert und wie beschrieben mittels HPLC-DAD analysiert. Die enthaltenen Mengen an 8,10- bzw. 9,11-FFA werden anhand der Kalibrierung für 8,10-FFA (s. 6.2.1.4, Tab. 6.1) bestimmt. Die extrahierten Mengen der FFAs vor und nach Inkubation sind in Tabelle 6.5 wiedergegeben.

Tabelle 6.5.: Extrahierte Mengen von 8,10- und 9,11-FFA aus Zellkulturmedium vor und nach 3 h Inkubation bei 37°C im Brutschrank

Substanz	Inkubiert	eingesetzte Stoffmenge	gefundene Stoffmenge	WDF [%]
8,10-FFA	nein	500 nmol	472 nmol	94,6
8,10-FFA	ja	500 nmol	465 nmol	93,2
9,11-FFA	nein	500 nmol	481 nmol	96,3
9,11-FFA	ja	500 nmol	498 nmol	99,6

### 6.2.7. Untersuchungen in Gewebekultur

#### 6.2.7.1. Präparation von Präzisionsgewebeschnitten

Die Präparation und Inkubation von Präzisionsgewebeschnitten wurde mit einem Tissue Slicer-System von VITRON durchgeführt und ist in Abbildung 6.8 schematisch dargestellt.

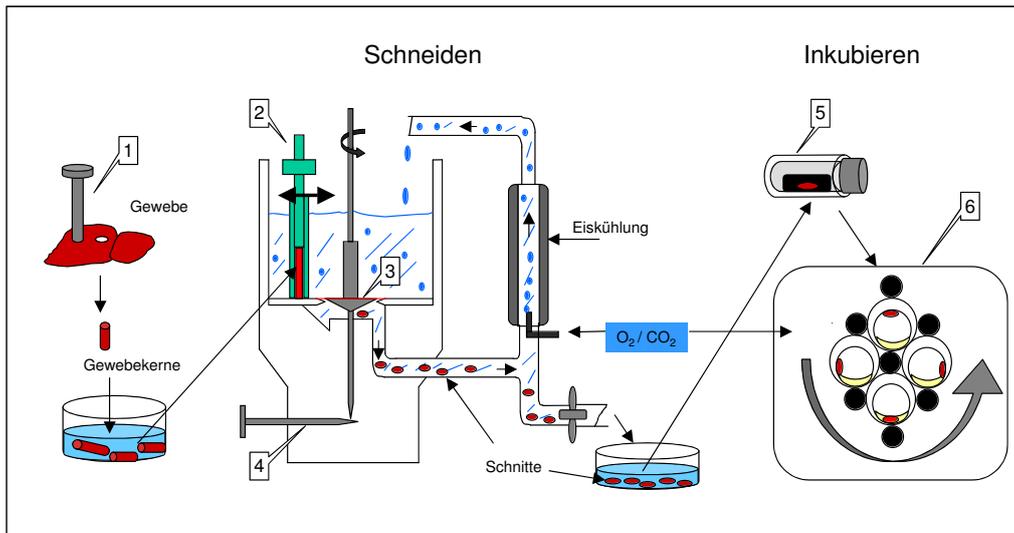


Abbildung 6.8.: Schematische Darstellung des VITRON Tissue-Slicer-Systems, (1) Hohlzylinder zum Ausstanzen von Gewebekegeln; (2) zylindrischer Schneidearm; (3) rotierendes Messer; (4) Mikrometerschraube; (5) Szintillationsgläsern mit Leberschnitt auf Edeltahlnetz; (6) DOC-Rotationsinkubator

Für die Präparation von Präzisionsgewebeschnitten wird die Leber männlicher unbehandelter SD-Ratten verwendet. Nach dem Töten der Tiere in  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre wird die Leber entnommen und sofort in eisgekühltem Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4) gelegt. Gewebekegel mit einem Durchmesser von 8 mm werden mit einem geschärften Hohlzylinder unter ständigem Drehen und mäßigem Druck auf einer Korkunterlage aus den Leberlappen gestanzt (Abb. 6.8, (1)). Die Gewebekerne werden sofort wieder in Krebs-Henseleit-Puffer gelegt und dort bis zum Schneiden belassen. Der gesamte Schneidprozess wird in eisgekühltem und mit Carbogen (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) begastem Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4) durchgeführt. Die Gewebekerne wurden in einen zylindrischen Schneidearm (Abb. 6.8, (2)) eingebracht und mechanisch durch langsames Bewegen des Schneidehalters über ein rotierendes Messer (Abb. 6.8, (3)) in Scheiben von ca. 200  $\mu\text{m}$  Dicke und 15-30 mg Nassgewicht geschnitten. Die Einstellung der Schnittdicke erfolgt mittels einer Mikrometerschraube (Abb. 6.8, (4)).

#### 6.2.7.2. Bestimmung der Fettsäuremuster von Gewebe

Bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagerte Präzisionsgewebeschnitte von Leber männlicher SD-Ratten und Niere männlicher SD-Ratten werden in jeweils 1,0 ml eisgekühltem PBS homogenisiert. Das Homogenat der einzelnen Gewebe wird mit  $2 \times 500 \mu\text{l}$  Folch-Reagenz extrahiert und wie in 6.2.5.1 beschrieben mittels SPE fraktioniert. Anschließend wird das FA-Muster der einzelnen Lipidfraktionen (PL, freie FA, CE, TG) und das freie ChOL nach Derivatisierung

mit TMSH mittels GC-FID und GC-MS analysiert. Die Identifizierung der FAs verläuft, wie bereits beschrieben, anhand eines externen FSME-Standards und der Auswertung der Massenspektren. Die Bestimmungen der FA-Muster der zwei Gewebetypen werden als Doppelbestimmung durchgeführt. Das PL/ChOL-Verhältnisses wird wie in 6.2.1.4 beschrieben berechnet.

### 6.2.7.3. Inkubation von Präzisionsgewebeschnitten

Nach Entnahme der Leberschnitte mit Puffer am Auslasshahn der Schneideeinheit wird jeweils ein einzelner Schnitt auf einem sterilen Edelstahlnetz in einem Edelstahlhohlzylinder platziert und dieser horizontal in ein steriles 20 ml Szintillationsgläschen, welches 1,7 ml FKS-freies Waymouth-Medium (50 µg/ml Gentamicin) enthält, eingebracht (Abb. 6.8, (5)). Die Gläschen werden mit Plastikdeckeln in deren Mitte sich ein 2 mm großes Loch befindet verschlossen, um den Gasaustausch mit der Umgebung zu gewährleisten. Die Schnitte werden in einem Rotationsinkubator (9 rpm) bei 37°C in einer Carbogen-Atmosphäre (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Das „Dynamic Organ Culture“-System (DOC-System) gewährleistet, dass sich die beiden Schnittoberflächen während der gesamten Kultivierung abwechselnd im Medium oder in der Gasphase befinden (Abb. 6.8, (6)). Nach einer einstündigen Vorinkubation werden die Hohlzylinder mit den Schnitten in neue Gläschen überführt, die frisches Kulturmedium und die Testsubstanzen enthalten. Die Inkubationen werden je nach Fragestellung für 2 h oder 4 h bei einer DMSO-Konzentration von 1% durchgeführt. Als Kontrolle werden Leberschnitte ohne Substanz, nur mit 1% DMSO, für 2 h oder 4 h inkubiert.

### 6.2.7.4. Einbau von Furanfettsäure in Präzisionsgewebeschnitten

8,10-, 9,11- oder 10,12-FFA wird hier in Endkonzentrationen von 100 µM und 200 µM in FKS-freiem Waymouth-Medium eingesetzt. Die Inkubationen mit 8,10- und 9,11-FFA werden für 2 h und 4 h durchgeführt. Die Inkubation mit 10,12-FFA erfolgt über einen Zeitraum von 4 h. Nach Beendigung der Inkubationen werden die Schnitte gewogen. Sowohl die Schnitte, als auch das Medium werden in 2 ml Cryoröhrchen überführt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Für die Analyse werden die Leberschnitte in 1,0 ml eisgekühltem PBS homogenisiert, mit 2 × 500 µl Folch-Reagenz extrahiert und wie in 6.2.5.1 beschrieben mittels SPE fraktioniert, mit TMSH derivatisiert und mittels GC-FID analysiert. Die in den Schnitten enthaltenen Stoffmengen an 8,10- und 9,11-FFA werden anhand der Kalibrierung von 9,11-FFA (s. 6.2.1.4, Abb. 6.5), die enthaltenen Stoffmengen an 10,12-FFA anhand der Kalibrierung von 10,12-FFA (s. 6.2.1.4, Abb. 6.2), bestimmt. Je 1 ml der Inkubationsmedien werden ebenfalls mit 2 × 500 µl

## 6. Material und Methoden

Folch-Reagenz extrahiert. Die Mediumextrakte werden im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt und die Rückstände in 50  $\mu\text{l}$  Methanol aufgenommen. 10  $\mu\text{l}$  davon werden in die HPLC-DAD injiziert. Die Stoffmengen der im Medium nachgewiesenen FFAs werden anhand der Kalibrierung für 8,10-FFA (Abb. 6.1) bestimmt. Der Einbau der FFAs in Präzisionsgewebeschnitte von Rattenleber wird anhand eines Experiments untersucht, bei dem pro jeweiliger Inkubationszeit und Konzentration an FFA drei Leberschnitte analysiert werden.

### 6.2.7.5. Substanzkontrollen in Gewebekultur

Für die Durchführung der Substanzkontrolle werden 4 ml FKS-freies Waymouth-Medium mit jeweils 40  $\mu\text{l}$  10 und 20 mM 8,10-, 9,11- oder 10,12-FFA Lösung versetzt. Die Endkonzentrationen der jeweiligen FFAs betragen 100 und 200  $\mu\text{M}$ . 1,7 ml des Mediums werden parallel mit den Schnitten für 4 h im DOC-System inkubiert. Jeweils 1 ml des inkubierten und nicht inkubierten Waymouth-Mediums ( $n(\text{FFA}) = 100, 200 \text{ nmol}$ ) werden mit  $2 \times 500 \mu\text{l}$  Folch-Reagenz extrahiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Stickstoffstrom wird der Rückstand in 50  $\mu\text{l}$  Methanol aufgenommen. 10  $\mu\text{l}$  werden in die HPLC-DAD injiziert. Die Stoffmengen der im Medium nachgewiesenen FFAs werden anhand der Kalibrierung für 8,10-FFA (Abb. 6.1) bestimmt. Die Extraktionsausbeuten und Substanzkontrollen für die eingesetzten Konzentrationen bzw. Stoffmengen sind in den Tabellen 6.6 und 6.7 wiedergegeben.

Tabelle 6.6.: Extraktionsausbeute für 8,10-, 9,11- und 10,12-FFA aus FKS-freiem Waymouth-Medium ohne Inkubation

FFA	8,10		9,11		10,12	
n(FFA) [nmol]	100	200	100	200	100	200
Extraktionsausbeute [nmol]	105,2	186,8	102,9	191,8	93,9	186,5
Extraktionsausbeute [%]	105	93	103	96	94	93

Tabelle 6.7.: Substanzkontrolle für 8,10-, 9,11- und 10,12-FFA in FKS-freiem Waymouth-Medium nach 2 h und 4 h Inkubation im DOC-System unter Carbogen-Atmosphäre

FFA	8,10				9,11				10,12	
Inkubationszeit	2 h		4 h		2 h		4 h		4 h	
n(FFA) [nmol]	100	200	100	200	100	200	100	200	100	200
WDF [nmol]	79,4	142,9	48,7	112,9	59,0	173,4	33,5	112,3	40,6	80,9
WDF [%]	79	71	49	56	59	87	34	56	41	40

## 6.2.8. Untersuchung der Lipidperoxidation

### 6.2.8.1. Lipidperoxidation in Zellen

Die Untersuchung der LPO in Zellen wird in Anlehnung an die Methode von Fraga et al. (1988) mit Hilfe des TBARS-Assay durchgeführt. Durch LPO entstehen aus mindestens dreifach ungesättigten FAs TBARS, insbesondere Malondialdehyd (MDA). Das Prinzip des TBARS-Assays beruht darauf, dass zwei Thiobarbitursäure (TBA) Moleküle im sauren Milieu an ein Molekül MDA addieren und so ein Chromogen bilden (Abb. 6.9). Dieses kann Fluorimetrisch mit einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 515$  nm und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 555$  nm bestimmt werden. Da Zellen in Kultur keine drei- oder mehrfach ungesättigten FAs aufweisen, ist es nötig eine Vorinkubation mit C 20:4 durchzuführen, um diese in die Lipide einzubauen.

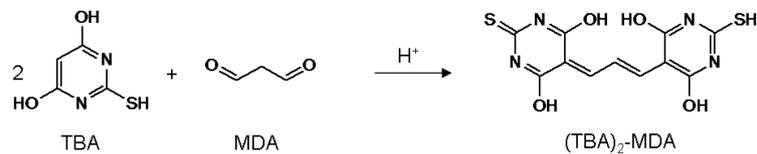


Abbildung 6.9.: Bildung des chromogenen Addukts aus Thiobarbitursäure und Malondialdehyd im sauren Milieu

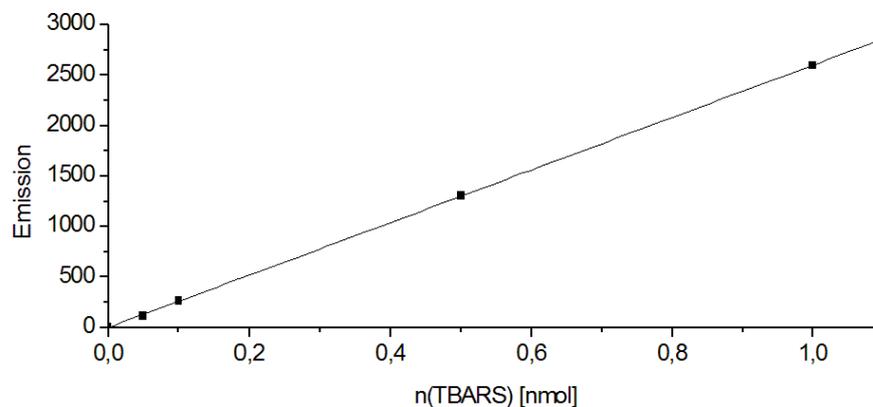


Abbildung 6.10.: Kalibriergerade für den TBARS-Assay, erstellt aus 1,1,3,3-Tetramethoxypropan; Kalibrierpunkte: 1 nmol, 0,5 nmol, 0,1 nmol und 0,05 nmol; Geradengleichung:  $y = 2601,4x$ ,  $R^2 = 1,000$ ;  $\lambda_a = 515$  nm;  $\lambda_e = 555$  nm

### Kalibrierung

Für die externe Kalibrierung des TBARS-Assays wird aus 16,5  $\mu$ l 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (TMP) in 10 ml bidestilliertem Wasser eine 10 mM Stammlösung erstellt. 100  $\mu$ l die-

## 6. Material und Methoden

ser Lösung wird mit bidestilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Aus der erhaltenen 100  $\mu\text{M}$  TMP-Lösung werden durch Verdünnung Kalibrierlösungen mit 0,5, 1, 5 und 10 nmol/ml hergestellt, mit denen der TBARS-Assay durchgeführt wird. Die daraus resultierende Kalibriergerade mit den Kalibrierpunkten 0,05, 0,1, 0,5 und 1 nmol ist in Abbildung 6.10 dargestellt.

### Inkubation der Zellen

Die Untersuchung der LPO in Zellkultur wird mit V79-Zellen durchgeführt. Alle Inkubationen und Kontrollen werden bei einer DMSO-Konzentration von 0,5% ausgeführt. Es werden  $0,5 \times 10^6$  Zellen in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 20 mm in 2 ml DMEM (10% FKS (V/V)) ausgestreut. Die Zellen werden für ca. 12 h kultiviert. Danach wird das Medium abgesaugt, durch 2 ml FKS-freies DMEM mit 50  $\mu\text{M}$  C 20:4 ersetzt und es folgt eine Vorinkubation für 3 h. Anschließend wird das Medium erneut entfernt und durch 2 ml FKS-freies Inkubationsmedium ersetzt, das 25  $\mu\text{M}$  oder 50  $\mu\text{M}$  10,12-FFA (mit oder ohne Zugabe von 500  $\mu\text{M}$  tBuOOH) enthält. Die tBuOOH-Lösung (100 mM) wird jeweils frisch vor der Versuchsdurchführung auf Eis hergestellt. Dazu werden 14  $\mu\text{l}$  der 70%igen tBuOOH-Lösung auf 1000  $\mu\text{l}$  mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Als Negativkontrolle werden Zellen mit Medium mit 0,5% DMSO versetzt, als Positivkontrolle wird tBuOOH mit einer Endkonzentration von 500  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die Zellen werden für 2 h inkubiert. Anschließend wird das Medium in 2,0 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Die Zellen werden mit 1 ml PBS gewaschen, mit 0,5 ml Trypsin abtrypsiniert und mit 500  $\mu\text{l}$  kaltem PBS in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Sowohl das Medium, als auch die Zellen werden für den TBARS-Assay verwendet.

### Durchführung TBARS-Assay

In 2,0 ml Reaktionsgefäße werden jeweils 0,1 ml SDS-Lösung (3%, (W/V)), 0,4 ml 0,1 M Salzsäure, 0,06 ml Phosphorwolframsäure-Lösung (10%, (W/V)), 0,2 ml TBA-Lösung (0,7%, (W/V)) und 0,1 ml Proben- oder Kalibrierlösung pipettiert. Die Reaktionsansätze werden für 45 min bei 90°C im Wasserbad geschüttelt. Die Reaktion wird auf Eis abgestoppt und die Ansätze werden mit 1 ml n-Butanol extrahiert und zentrifugiert. Die überstehenden n-Butanol-Phasen werden in 24-Well-Platten pipettiert und im Multititerplattenlesegerät bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 515$  nm und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 555$  nm fluorimetrisch gemessen. Die Auswertung der Proben erfolgt anhand der externen Kalibrierung (Abb. 6.10), wobei der Verdünnungsfaktor bei Medium ( $\times 20$ ) und Zellsuspension ( $\times 5$ ) einberechnet wird. Es wird die bestimmte Stoffmenge an TBARS in

den Zellen und dem Medium angegeben. Alle Versuche werden als Dreifachbestimmungen mit Zellen unterschiedlicher Passagen durchgeführt.

### 6.2.8.2. Lipidperoxidation in Präzisionsgewebeschnitten

Die Inkubation der Präzisionsgewebeschnitte aus Rattenleber (s. 6.2.7.3) erfolgt hier mit 8,10- oder 10,12-FFA in Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  in FKS-freiem Waymouth-Medium über einen Zeitraum von 4 h. Zusätzlich werden Leberschnitte mit Medium inkubiert dem neben den angegebenen Konzentrationen an 8,10- und 10,12-FFA tBuOOH (100 mM in Wasser) mit einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt werden. Als Positivkontrolle wird eine Inkubation mit 1 mM tBuOOH im Medium, als Negativkontrolle eine Inkubation mit 0,5% DMSO im Medium durchgeführt. Nach Beendigung der Inkubation werden die Schnitte gewogen. Sowohl die Schnitte, als auch das Medium werden in 2 ml Cryoröhrchen überführt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Durchführung des TBARS-Assays werden die Schnitte in 500  $\mu\text{l}$  eisgekühltem PBS homogenisiert. Sowohl vom Homogenat als auch vom Medium werden 100  $\mu\text{l}$  für den TBARS-Assay, der wie in 6.2.8.1 beschrieben durchgeführt wird, verwendet. Die bestimmte Stoffmenge an TBARS in Medium und Schnitten wird auf 1 mg Nassgewicht des Schnitts bezogen. Für die Bestimmung der LPO unter Einfluss von 10,12-FFA werden drei unabhängige Experimente mit unterschiedlichen Tieren durchgeführt, bei denen zwei Leberschnitte pro eingesetzter Konzentration untersucht werden. Für die Bestimmung der LPO unter Einfluss von 8,10-FFA wird ein Experiment durchgeführt, bei dem zwei Leberschnitte pro eingesetzter Konzentration untersucht werden.

# Literaturverzeichnis

- T. Akazawa. Chromatographic isolation of pure ipomeamarone and reinvestigation of its chemical properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 90:82–89, 1960.
- M. Andreani, J. L. Olivier, F. Berenbaum, M. Raymondjean, und G. Bereziat. Transcriptional regulation of inflammatory secreted phospholipases a2. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(1-2):149–158, 2000.
- N. a. Audi, M. D. Mesa, M. A. Martinez, E. Martinez-Victoria, M. Manas, und M. D. Yago. Membrane lipid composition of pancreatic ar42j cells: modification by exposure to different fatty acids. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, NJ, United States)*, 232(4):532–541, 2007.
- M. J. Azain. Conjugated linoleic acid and its effects on animal products and health in single-stomached animals. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(2):319–328, 2003.
- E. Bascetta, F. D. Gunstone, und C. M. Scrimgeour. Synthesis, characterization, and transformations of a lipid cyclic peroxide. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)*, (10):2199–2205, 1984.
- A. Batna und G. Spiteller. Effects of soybean lipoxygenase-1 on phosphatidylcholines containing furan fatty acids. *Lipids*, 29(6):397–403, 1994a.
- A. Batna und G. Spiteller. Oxidation of furan fatty acids by soybean lipoxygenase-1 in the presence of linoleic acid. *Chemistry and Physics of Lipids*, 70(2):179–185, 1994b.
- A. Batna und G. Spiteller. Origin of the oxygen atom in the furan ring of f acids. *Liebigs Annalen der Chemie*, (9):861–863, 1991.
- A. Batna, J. Scheinkönig, und G. Spiteller. The occurrence of furan fatty acids in isochrysis sp. and phaeodactylum tricorutum. *Biochimica et Biophysica Acta, Lipids and Lipid Metabolism*, 1166(2-3):171–176, 1993.
- S. Bauer und G. Spiteller. Identification and synthesis of previously unknown furancarboxylic acids from human urine. *Liebigs Annalen der Chemie*, (4):813–821, 1985a.

- S. Bauer und G. Spiteller. Furancarboxylic acids in urine of cattle. *Helvetica Chimica Acta*, 68(6):1635–1638, 1985b.
- H.-D. Belitz, W. Grosch, und P. Schieberle. In *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2001.
- F. P. Bell. Lipid exchange and transfer between biological lipid-protein structures. *Progress in lipid research*, 17(2):207–243, 1978.
- J. M. Berg, J. L. Tymoczko, und L. Stryer. In *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2003.
- S. Bergstrom, B. Borgstrom, N. Tryding, und G. Westoo. Intestinal absorption and metabolism of 2,2-dimethylstearic acid in the rat. *Biochemical Journal*, 58:604–608, 1954.
- C. O. III Bingham und K. F. Austen. Phospholipase a2 enzymes in eicosanoid generation. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 111(6):516–524, 1999.
- E. Boselli, K. Grob, und G. Lercker. Determination of furan fatty acids in extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7):2868–2873, 2000.
- M. R. Boyd. Toxicity mediated by reactive metabolites of furans. *Advances in experimental medicine and biology*, 136 Pt B:865–879, 1981.
- M. R. Boyd, L. T. Burka, T. M. Harris, und B. J. Wilson. Lung-toxic furanoterpenoids produced by sweet potatoes (*ipomoea batatas*) following microbial infection. *Biochimica et biophysica acta*, 337(2):184–195, 1974.
- R. F. Boyer, C. G. Lindstrom, B. Darby, und M. Hylarides. Peracid oxidation of singlet oxygen acceptors. *Tetrahedron Letters*, (47):4111–4114, 1975.
- R. F. Boyer, D. Litts, J. Kostishak, R. C. Wijesundera, und F. D. Gunstone. The action of lipoygenase-1 on furan derivatives. *Chemistry and Physics of Lipids*, 25(3):237–246, 1979.
- M. W. Bradbury und P. D. Berk. Cellular uptake of long chain free fatty acids: the structure and function of plasma membrane fatty acid binding protein. *Advances in Molecular and Cell Biology*, 33:47–80, 582–583, 582 Plates, 2004.
- M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2):248–254, 1976.

- L. T. Burka und L. Kuhnert. Biosynthesis of furanosesquiterpenoid stress metabolites in sweet potatoes (*ipomoea batatas*). oxidation of ipomeamarone to 4-hydroxymyoporone. *Phytochemistry*, 16(12):2022–2023, 1977.
- L. T. Burka, L. Kuhnert, B. J. Wilson, und T. M. Harris. Biogenesis of lung-toxic furans produced during microbial infection of sweet potatoes (*ipomoea batatas*). *Journal of the American Chemical Society*, 99(7):2302–2305, 1977.
- L. T. Burka, K. D. Washburn, und R. D. Irwin. Disposition of [14c]furan in the male f344 rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 34(2):245–257, 1991.
- M. C. Byrns, D. P. Predecki, und L. A. Peterson. Characterization of nucleoside adducts of cis-2-butene-1,4-dial, a reactive metabolite of furan. *Chemical Research in Toxicology*, 15(3):373–379, 2002.
- M. C. Byrns, C. C. Vu, J. W. Neidigh, J.-L. Abad, R. A. Jones, und L. A. Peterson. Detection of dna adducts derived from the reactive metabolite of furan, cis-2-butene-1,4-dial. *Chemical Research in Toxicology*, 19(3):414–420, 2006.
- N. M. Carballeira, A. Guzman, J. T. Nechev, K. Lahtchev, A. Ivanova, und K. Stefanov. Unusual lipid composition of a bacillus sp. isolated from lake pomorie in bulgaria. *Lipids*, 35(12):1371–1375, 2000.
- C. R. M. Chaves, P. R. P. Elias, W. Cheng, C. Zaltman, A. C. R. Iglesias, und V. B. Braulio. Long chain fatty acid uptake by human intestinal mucosa in vitro: mechanisms of transport. *Digestion*, 67(1-2):32–36, 2003.
- L.-J. Chen, S. S. Hecht, und L. A. Peterson. Identification of cis-2-butene-1,4-dial as a microsomal metabolite of furan. *Chemical Research in Toxicology*, 8(7):903–906, 1995.
- P. Ciminiello, E. Fattorusso, S. Magno, A. Mangoni, A. Ialenti, und M. Di Rosa. Furan fatty acid steryl esters from the marine sponge dictyonella incisa which show inflammatory activity. *Experientia*, 47(7):739–743, 1991.
- M. G. Costigan und W. E. Lindup. Plasma clearance in the rat of a furan dicarboxylic acid which accumulates in uremia. *Kidney International*, 49(3):634–638, 1996.
- S. Couloubaly, C. Delomenie, D. Rousseau, J. L. Paul, A. Grynberg, und M. L. Pourci. Fatty acid incorporation in endothelial cells and effects on endothelial nitric oxide synthase. *European Journal of Clinical Investigation*, 37(9):692–699, 2007.
- V. M. Dembitsky und T. Rexanka. Furan fatty acids of some brackish invertebrates from the caspian sea. *Comparative Biochemistry and Physiology, B: Biochemistry and Molecular Biology*, 114B(3):317–320, 1996.

- F. Destailats, J. P. Trottier, J. M. G. Galvez, und P. Angers. Analysis of alpha -linolenic acid biohydrogenation intermediates in milk fat with emphasis on conjugated linolenic acids. *Journal of Dairy Science*, 88(9):3231–3239, 2005.
- R. Devery, A. Miller, und C. Stanton. Conjugated linoleic acid and oxidative behaviour in cancer cells. *Biochemical Society transactions*, 29(Pt 2):341–344, 2001.
- L. J. K. Durling, K. Svensson, und L. Abramsson-Zetterberg. Furan is not genotoxic in the micronucleus assay in vivo or in vitro. *Toxicology Letters*, 169(1):43–50, 2007.
- T. A. Eisele, J. K. Yoss, J. E. Nixon, N. E. Pawlowski, L. M. Libbey, und R. O. Sinnhuber. Rat urinary metabolites of [9,10-methylene-14c]-sterculic acid. *Biochimica et Biophysica Acta, Lipids and Lipid Metabolism*, 488(1):76–87, 1977.
- P. Emmelot und R. P. Van Hoeven. Phospholipid unsaturation and plasma membrane organization. *Chemistry and Physics of Lipids*, 14(3):236–246, 1975.
- K. Eulitz, M. P. Yurawecz, und Y. Ku. The oxidation of conjugated linoleic acid. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, 1:55–63, 1999.
- A. R. Eynard und C. B. Lopez. Conjugated linoleic acid (cla) versus saturated fats/cholesterol: Their proportion in fatty and lean meats may affect the risk of developing colon cancer. *Lipids in Health and Disease*, 2:No pp given, 2003.
- J. Folch, M. Lees, und G. H. Sloane Stanley. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*, 226(1):497–509, 1957.
- C. S. Foote, M. T. Wuesthoff, S. Wexler, I. G. Burstain, R. W. Denny, G. O. Schenck, und K. H. Schulte-Elte. Photosensitized oxygenation of alkyl-substituted furans. 23(6): 2583–2599, 1967.
- C. G. Fraga, B. E. Leibovitz, und A. L. Tappel. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radical Biology & Medicine*, 4(3):155–161, 1988.
- C. Fuchs und G. Spiteller. Iron release from the active site of lipoxygenase. *Zeitschrift für Naturforschung, C: Journal of Biosciences*, 55(7/8):643–648, 2000.
- L. M. Gammal, R. A. Wiley, G. Traiger, W. M. Haschek, und S. Baraban. Toxicity-distribution relationships among 3-alkylfurans in the mouse lung. *Toxicology*, 30(2): 177–184, 1984.

- R. L. Glass, T. P. Krick, und A. E. Eckhardt. New series of fatty acids in northern pike (esox lucius). *Lipids*, 9(12):1004–1008, 1974.
- R. L. Glass, T. P. Krick, D. M. Sand, C. H. Rahn, und H. Schlenk. Furanoid fatty acids from fish lipids. *Lipids*, 10(11):695–702, 1975.
- R. L. Glass, T. P. Krick, D. L. Olson, und R. L. Thorson. The occurrence and distribution of furan fatty acids in spawning male freshwater fish. *Lipids*, 12(10):828–836, 1977.
- J. F. C. Glatz und J. H. Veerkamp. Intracellular fatty acid-binding proteins. *International Journal of Biochemistry*, 17(1):13–22, 1985.
- C. P. Gorst-Allman, V. Puchta, und G. Spiteller. Investigations of the origin of the furan fatty acids (f-acids). *Lipids*, 23(11):1032–1036, 1988.
- G. Graff, J. L. Gellerman, D. M. Sand, und H. Schlenk. Inhibition of blood platelet aggregation by dioxo-ene compounds. *Biochimica et Biophysica Acta*, 799(2):143–150, 1984.
- K. Green. The metabolism of prostaglandin f<sub>2</sub>-alpha in the rat. *Biochimica et biophysica acta*, 231(3):419–444, 1971.
- H. Grisebach und J. Ebel. Phytoalexins, chemical protective agents of higher plants. *Angewandte Chemie*, 90(9):668–681, 1978.
- F. D. Gunstone und R. C. Wijesundera. Fatty acids. part 54. some reactions of long-chain oxygenated acids with special reference to those furnishing furanoid acids. *Chemistry and Physics of Lipids*, 24(2):193–208, 1979.
- F. D. Gunstone, R. C. Wijesundera, R. M. Love, und D. Ross. Relative enrichment of furan-containing fatty acids in the liver of starving cod. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (16):630–631, 1976.
- F. D. Gunstone, R. C. Wijesundera, und C. M. Scrimgeour. The component acids of lipids from marine and freshwater species with special reference to furan-containing acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(6):539–550, 1978.
- H. Guth und W. Grosch. Furan fatty acids in butter and butter oil. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 194(4):360–362, 1992.
- H. Guth und W. Grosch. Detection of furanoid fatty acids in soya-bean oil - cause for light-induced off-flavor. *Fett Wissenschaft Technologie*, 93(7):249–255, 1991.

- K. Hac-Wydro und P. Wydro. The influence of fatty acids on model cholesterol/phospholipid membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 150(1):66–81, 2007.
- H. K. Hamadeh, S. Jayadev, E. T. Gaillard, Q. Huang, R. Stoll, K. Blanchard, J. Chou, C. J. Tucker, J. Collins, R. Maronpot, P. Bushel, und C. A. Afshari. Integration of clinical and gene expression endpoints to explore furan-mediated hepatotoxicity. *Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 549(1-2):169–183, 2004.
- K. Hannemann, V. Puchta, E. Simon, H. Ziegler, G. Ziegler, und G. Spiteller. The common occurrence of furan fatty acids in plants. *Lipids*, 24(4):296–298, 1989.
- H. Hasma und A. Subramaniam. The occurrence of a furanoid fatty acid in hevea brasiliensis latex. *Lipids*, 13(12):905–907, 1978.
- S. J. Henderson und W. E. Lindup. Interaction of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid, an inhibitor of plasma protein binding in uraemia, with human albumin. *Biochemical pharmacology*, 40(11):2543–2548, 1990.
- C. W. Heppner und J. R. Schlatter. Data requirements for risk assessment of furan in food. *Food additives and contaminants*, 24 Suppl 1:114–121, 2007.
- R. Homan, J. E. Grossman, und H. J. Pownall. Differential effects of eicosapentaenoic acid and oleic acid on lipid synthesis and secretion by hepg2 cells. *Journal of Lipid Research*, 32(2):231–241, 1991.
- M.-H. Hsu, U. Savas, K. J. Griffin, und E. F. Johnson. Human cytochrome p450 family 4 enzymes: Function, genetic variation and regulation. *Drug Metabolism Reviews*, 39(2-3):515–538, 2007.
- P. E. Hughes, W. J. Hunter, und S. B. Tove. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. purification and properties of cis-9,trans-11-octadecadienoate reductase. *The Journal of biological chemistry*, 257(7):3643–3649, 1982.
- K. Ishii, H. Okajima, T. Koyamatsu, Y. Okada, und H. Watanabe. The composition of furan fatty acids in the crayfish. *Lipids*, 23(7):694–700, 1988a.
- K. Ishii, H. Okajima, Y. Okada, und H. Watanabe. Studies on furan fatty acids of salmon roe phospholipids. *Journal of Biochemistry (Tokyo, Japan)*, 103(5):836–839, 1988b.
- K. Ishii, H. Okajima, Y. Okada, H. Konishi, und H. Watanabe. Fatty chain composition of phospholipids from muscle of crayfish, *procambarus clarkii*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 37(6):1564–1567, 1989a.

- K. Ishii, H. Okajima, Y. Okada, und H. Watanabe. Effects of phosphatidylcholines containing furan fatty acid on oxidation in multilamellar liposomes. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 37(5):1396–1398, 1989b.
- J. Jandke, J. Schmidt, und G. Spiteller. The behavior of f acids in the oxidation with lipoxidase in the presence of sh-containing compounds. *Liebigs Annalen der Chemie*, (1):29–34, 1988.
- R. Kazlauskas, P. T. Murphy, R. J. Wells, und R. P. Gregson. Two new furans from the brown alga *acrocarpia paniculata*: the use of 4-phenyl-4h-1,2,4-triazoline-3,5-dione to determine the substitution pattern of a furan. *Australian Journal of Chemistry*, 35(1):165–170, 1982.
- G. L. Kedderis und S. A. Ploch. The biochemical toxicology of furan. *CIIT Activities*, 19(12):1–10, 1999.
- G. L. Kedderis, M. A. Carfagna, S. D. Held, R. Batra, J. E. Murphy, und M. L. Gargas. Kinetic analysis of furan biotransformation by f-344 rats in vivo and in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 123(2):274–282, 1993.
- G. S. Kelly. Conjugated linoleic acid: a review. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, 6(4):367–382, 2001.
- C. R. Kepler und S. B. Tove. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. iii. purification and properties of a linoleate delta 12-cis,delta 11-trans-isomerase from *butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry*, 242(24):5686–5692, 1967.
- C. R. Kepler, K. P. Hiron, J. J. McNeill, und S. B. Tove. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry*, 241(6):1350–1354, 1966.
- L. A. Kerr, B. J. Johnson, und G. E. Burrows. Intoxication of cattle by *perilla frutescens* (purple mint). *Veterinary and human toxicology*, 28(5):412–416, 1986.
- T. Kimura, H. Fukuda, und N. Iritani. Labeled acetate incorporation into lipids and lipid elimination after oral administration in rat liver and adipose tissue. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 51(2):104–109, 2005.
- M. R. Klaas und S. Warwel. Chemoenzymatic epoxidation of alkenes by dimethyl carbonate and hydrogen peroxide. *Organic Letters*, 1(7):1025–1026, 1999.
- J. H. F. M. Kluytmans und D. I. Zandee. Lipid metabolism in the northern pike (*esox lucius*). 1. fatty composition of the northern pike. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 44(2):451–458, 1973.

- B. R. Kuhnt. *Investigations of free fatty acids and oils on in vitro cultured keratinocytes*. PhD thesis, 2003. CAN 144:387383 13-6 Mammalian Biochemistry Germany. Dissertation written in German.
- B. G. Lake. Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism. In K. Snell und B. Mulloch, Hrsg., *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*, Seiten 183–215. IRL Press, Oxford, 1987.
- H. M. Liebich, A. Pickert, und B. Tetschner. Gas chromatographic and gas chromatographic-mass spectrometric analysis of organic acids in plasma of patients with chronic renal failure. *Journal of Chromatography*, 289:259–266, 1984.
- H. M. Liebich, J. I. Bubeck, A. Pickert, G. Wahl, und A. Scheiter. Hippuric acid and 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid in serum and urine. analytical approaches and clinical relevance in kidney diseases. *Journal of Chromatography*, 500: 615–627, 1990.
- H. Mabuchi und H. Nakahashi. Inhibition of hepatic glutathione s-transferases by a major endogenous ligand substance present in uremic serum. *Nephron*, 49(4):281–283, 1988.
- J. A. Maga. Furans in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 11(4): 355–400, 1979.
- U. M. Marinari, M. Ferro, L. Sciaba, R. Finollo, A. M. Bassi, und G. Brambilla. Dna-damaging activity of biotic and xenobiotic aldehydes in chinese hamster ovary cells. *Cell Biochemistry and Function*, 2(4):243–248, 1984.
- H. Marquardt und S. Schäfer. In *Lehrbuch der Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2004.
- E. McKeown und W. A. Waters. Oxidation of organic compounds by singlet oxygen. *Journal of the Chemical Society [Section] B: Physical Organic*, (11):1040–1046, 1966.
- R. J. McMurtry und J. R. Mitchell. Renal and hepatic necrosis after metabolic activation of 2-substituted furans and thiophenes, including furosemide and cephaloridine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 42(2):285–300, 1977.
- J. R. Mitchell, W. L. Nelson, W. Z. Potter, H. A. Sasame, und D. J. Jollow. Metabolic activation of furosemide to a chemically reactive, hepatotoxic metabolite. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 199(1):41–52, 1976.
- C. A. Mugford, M. A. Carfagna, und G. L. Kedderis. Furan-mediated uncoupling of hepatic oxidative phosphorylation in fischer-344 rats: an early event in cell death. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 144(1):1–11, 1997.

- T. Niwa, N. Takeda, K. Maeda, M. Shibata, und A. Tatematsu. Accumulation of furan-carboxylic acids in uremic serum as inhibitors of drug binding. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 173(2):127–138, 1988.
- T. Niwa, T. Aiuchi, K. Nakaya, Y. Emoto, T. Miyazaki, und K. Maeda. Inhibition of mitochondrial respiration by furancarboxylic acid accumulated in uremic serum in its albumin-bound and non-dialyzable form. *Clinical Nephrology*, 39(2):92–96, 1993.
- J. O. Nossen, A. C. Rustan, S. H. Gloppestad, S. Maalbakken, und C. A. Drevon. Eicosapentaenoic acid inhibits synthesis and secretion of triacylglycerols by cultured rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta, Lipids and Lipid Metabolism*, 879(1):56–65, 1986.
- Y. Okada, H. Okajima, H. Konishi, M. Terauchi, K. Ishii, I. M. Liu, und H. Watanabe. Antioxidant effect of naturally occurring furan fatty acids on oxidation of linoleic acid in aqueous dispersion. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67(11):858–862, 1990.
- Y. Okada, M. Kaneko, und H. Okajima. Hydroxyl radical scavenging activity of naturally occurring furan fatty acids. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 19(12):1607–1610, 1996.
- H. Okajima, K. Ishii, und H. Watanabe. Studies on lipids of crayfish, *procambarus clarkii*. i. furanoid fatty acids. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 32(8):3281–3286, 1984.
- T. Ota und T. Takagi. Furan fatty acids in the lipids of the cresthead flounder. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(4):721–725, 1992.
- S. Pazouki, J. D. Baty, H. M. Wallace, und C. S. Coleman. Utilization of extracellular lipids by ht29/219 cancer cells in culture. *Lipids*, 27(11):827–834, 1992.
- S. L. Pelech, H. W. Cook, H. B. Paddon, und D. E. Vance. Membrane-bound ctp:phosphocholine cytidyltransferase regulates the rate of phosphatidylcholine synthesis in hela cells treated with unsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta, Lipids and Lipid Metabolism*, 795(3):433–440, 1984.
- C. Perez Locas und V. A. Yaylayan. Origin and mechanistic pathways of formation of the parent furan—a food toxicant. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(22):6830–6836, 2004.
- J. Pfordt, H. Thoma, und G. Spiteller. Identification, structure elucidation, and synthesis of previously unknown urofuranic acids in human blood. *Liebigs Annalen der Chemie*, (12):2298–2308, 1981.

- P. Priore, A. M. Giudetti, F. Natali, G. V. Gnoni, und M. J. H. Geelen. Metabolism and short-term metabolic effects of conjugated linoleic acids in rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(10):1299–1307, 2007.
- V. Puchta und G. Spiteller. Structure of f-acid-containing plasma lipids. *Liebigs Annalen der Chemie*, (12):1145–1147, 1988.
- V. Puchta, G. Spiteller, und H. Weidinger. F acids: a previously unknown component of the phospholipids of human blood. *Liebigs Annalen der Chemie*, (1):25–28, 1988.
- V. Ravindranath und M. R. Boyd. Metabolic activation of 2-methylfuran by rat microsomal systems. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 78(3):370–376, 1985.
- V. Ravindranath, L. T. Burka, und M. R. Boyd. Reactive metabolites from the bioactivation of toxic methylfurans. *Science*, 224(4651):884–886, 1984.
- V. Ravindranath, M. G. McMenamain, J. H. Dees, und M. R. Boyd. 2-methylfuran toxicity in rats - role of metabolic activation in vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 85(1):78–91, 1986.
- G. Rehner und H. Daniel. In *Biochemie der Ernährung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2002.
- A. C. Rustan, J. O. Nossen, E. N. Christiansen, und C. A. Drevon. Eicosapentaenoic acid reduces hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreasing the activity of acyl-coenzyme a:1,2-diacylglycerol acyltransferase. *Journal of Lipid Research*, 29(11):1417–1426, 1988.
- D. M. Sand, H. Schlenk, H. Thoma, und G. Spiteller. Catabolism of fish furan fatty acids to urofuran acids in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 751(3):455–461, 1983.
- D. M. Sand, R. L. Glass, D. L. Olson, H. M. Pike, und H. Schlenk. Metabolism of furan fatty acids in fish. *Biochimica et Biophysica Acta*, 793(3):429–434, 1984.
- L. M. Sayre, P. K. Arora, R. S. Iyer, und R. G. Salomon. Pyrrole formation from 4-hydroxynonenal and primary amines. *Chemical research in toxicology*, 6(1):19–22, 1993.
- J. Scheinkönig und G. Spiteller. F acid-containing phospholipids in sugar cane cells. *Liebigs Annalen der Chemie*, (2):121–124, 1993a.
- J. Scheinkönig und G. Spiteller. Origin of the methyl substituents of f-acids. *Liebigs Annalen der Chemie*, (5):451–453, 1991.

- J. Scheinkönig und G. Spiteller. Origin of the basic carbon chain of f acids. *Liebigs Annalen der Chemie*, (3):251–253, 1993b.
- J. Scheinkönig, K. Hannemann, und G. Spiteller. Methylation of the beta-positions of the furan ring in f-acids. *Biochimica et biophysica acta*, 1254(1):73–76, 1995.
- R. Schödel und G. Spiteller. On the occurrence of f-acids in cattle liver and their enzymic degradation during tissue damage. *Liebigs Annalen der Chemie*, (5):459–462, 1987.
- R. Schödel und G. Spiteller. Structure elucidation of (hydroxyoxocyclopentenyl)alkanoic acids, the aldol-condensation products of dioxoenoic acids from bovine liver. *Helvetica Chimica Acta*, 68(6):1624–1634, 1985.
- R. Schödel, P. Dietel, und G. Spiteller. F-acids as precursors of urofuranic acids. *Liebigs Annalen der Chemie*, (1):127–131, 1986.
- C. M. Scrimgeour. Quantitative analysis of furanoid fatty acids in crude and refined cod liver oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 54(5):210–211, 1977.
- X. Shen, K. Nuernberg, G. Nuernberg, R. Zhao, N. Scollan, K. Ender, und D. Dannenberger. Vaccenic acid and cis-9,trans-11 cla in the rumen and different tissues of pasture- and concentrate-fed beef cattle. *Lipids*, 42(12):1093–1103, 2007.
- N. Shirasaka, K. Nishi, und S. Shimizu. Occurrence of a furan fatty acid in marine bacteria. *Biochimica et biophysica acta*, 1258(3):225–227, 1995.
- N. Shirasaka, K. Nishi, und S. Shimizu. Biosynthesis of furan fatty acids (f-acids) by a marine bacterium, shewanella putrefaciens. *Biochimica et Biophysica Acta, Lipids and Lipid Metabolism*, 1346(3):253–260, 1997.
- S. Sorof. Modulation of mitogenesis by liver fatty acid binding protein. *Cancer and Metastasis Reviews*, 13(3-4):317–336, 1994.
- G. Spiteller. The relationship between changes in the cell wall, lipid peroxidation, proliferation, senescence and cell death. *Physiologia Plantarum*, 119(1):5–18, 2003.
- G. Spiteller. Furan fatty acids. *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium*, 35(12):1240, 1242–1243, 1987.
- G. Spiteller. Furan fatty acids: Occurrence, synthesis, and reactions. are furan fatty acids responsible for the cardioprotective effects of a fish diet? *Lipids*, 40(8):755–771, 2005a.
- G. Spiteller. The relation of lipid peroxidation processes with atherogenesis: a new theory on atherogenesis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(11):999–1013, 2005b.

- M. Spiteller und G. Spiteller. Separation and characterization of acidic urine constituents. *Journal of Chromatography*, 164(3):253–317, 1979.
- M. Spiteller, G. Spiteller, und G. A. Hoyer. Urofuranic acids - a hitherto unknown class of metabolic products. *Chemische Berichte*, 113(2):699–709, 1980.
- H. F. Stich, M. P. Rosin, C. H. Wu, und W. D. Powrie. Clastogenicity of furans found in food. *Cancer Letters*, 13(2):89–95, 1981.
- W. Stremmel und H. E. Diede. Fatty acid uptake by human hepatoma cell lines represents a carrier-mediated uptake process. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Cell Research*, 1013(3):218–222, 1989.
- F. F. Sun. Metabolism of prostaglandin f2alpha in the rat. *Biochimica et biophysica acta*, 348(2):249–262, 1974.
- R. Sundler, B. Akesson, und A. Nilsson. Effect of different fatty acids on glycerolipid synthesis in isolated rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 249(16):5102–5107, 1974.
- K. Takayama, T. Noguchi, und M. Nakano. Reactivities of diphenylfuran (a singlet oxygen trap) with singlet oxygen and hydroxyl radical in aqueous systems. *Biochemical and biophysical research communications*, 75(4):1052–1058, 1977.
- D. Thewke, M. Kramer, und M. S. Sinensky. Transcriptional homeostatic control of membrane lipid composition. *Biochemical and biophysical research communications*, 273(1):1–4, 2000.
- S. B. Tove, Jr. Andrews, J. S., und H. L. Lucas. Turnover of palmitic, stearic, and unsaturated fatty acids in rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 218:275–281, 1956.
- Y. Tsutsumi, T. Maruyama, A. Takadate, H. Shimada, und M. Otagiri. Decreased bilirubin-binding capacity in uremic serum caused by an accumulation of furan dicarboxylic acid. *Nephron*, 85(1):60–64, 2000.
- A. Vegusdal, T. Gjoen, R. K. Berge, M. S. Thomassen, und B. Ruyter. Effect of 18:1n-9, 20:5n-3, and 22:6n-3 on lipid accumulation and secretion by atlantic salmon hepatocytes. *Lipids*, 40(5):477–486, 2005.
- J. Vicanova, A. M. Weerheim, J. A. Kempenaar, und M. Ponc. Incorporation of linoleic acid by cultured human keratinocytes. *Archives of Dermatological Research*, 291(7/8):405–412, 1999.

- D. Voet und J.G. Voet. In *Biochemie*. VCH-Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1992.
- H. G. Wahl. The role of furan fatty acids as components of fish oil preparations. *GIT Labor-Fachzeitschrift*, 42(4):368–370,372, 1998.
- H. G. Wahl, B. Tetschner, und H. M. Liebich. The effect of dietary fish oil supplementation on the concentration of 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid in human blood and urine. *Journal of High Resolution Chromatography*, 15(12):815–818, 1992.
- H. G. Wahl, H. M. Liebich, und A. Hoffmann. Identification of fatty acid methyl esters as minor components of fish oil by multidimensional gc-msd: new furan fatty acids. *Journal of High Resolution Chromatography*, 17(5):308–311, 1994.
- K. U. Weithmann, H. Peterson, und A. Sevanian. Incorporation of arachidonic, dihomo-gammalinolenic and eicosapentaenoic acids into cultured v79 cells. *Lipids*, 24(3):173–178, 1989.
- D. C. White, R. Geyer, A. D. Peacock, D. B. Hedrick, S. S. Koenigsberg, Y. Sung, J. He, und F. E. Loffler. Phospholipid furan fatty acids and ubiquinone-8: lipid biomarkers that may protect dehalococcoides strains from free radicals. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12):8426–8433, 2005.
- R. A. Wiley, G. J. Traiger, S. Baraban, und L. M. Gammal. Toxicity-distribution relationships among 3-alkylfurans in mouse liver and kidney. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 74(1):1–9, 1984.
- G. M. Williams und J. R. Bend. Furan-substituted aliphatic hydrocarbons, alcohols, aldehydes, ketones, carboxylic acids, and related esters, sulfides, disulfides and ethers. *WHO Food Additives Series*, 56(Safety Evaluation of Certain Food Additives):101–153, 2006.
- D. M. Wilson, T. L. Goldsworthy, J. A. Popp, und B. E. Butterworth. Evaluation of genotoxicity, pathological lesions, and cell proliferation in livers of rats and mice treated with furan. *Environmental and molecular mutagenesis*, 19(3):209–222, 1992.
- P. L. Yeagle. Cholesterol and the cell membrane. *Biochimica et Biophysica Acta, Reviews on Biomembranes*, 822(3-4):267–287, 1985.
- M. P. Yurawecz, J. K. Hood, M. M. Mossoba, J. A. G. Roach, und Y. Ku. Furan fatty acids determined as oxidation products of conjugated octadecadienoic acid. *Lipids*, 30(7):595–598, 1995.
- M. P. Yurawecz, N. Sehat, M. M. Mossoba, J. A. G. Roach, und Y. Ku. Oxidation products of conjugated linoleic acid and furan fatty acids. *New Techniques and Applications in Lipid Analysis*, Seiten 183–215, 1997.

## Literaturverzeichnis

- A. Zhang und Z. Y. Chen. Oxidative stability of conjugated linoleic acids relative to other polyunsaturated fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(12): 1611–1613, 1997.
- J. R. Zhang und A. Sevanian. Effect of vitamin e on arachidonic acid peroxidation and its binding to chinese hamster v79 cell dna. *Biochimica et Biophysica Acta, Lipids and Lipid Metabolism*, 1085(2):159–166, 1991.

# A. Anhang

## A.1. Analytische Daten zu den Furanfettsäuren

### A.1.1. GC-MS-Fragmentierung der Furanfettsäuren

Tabelle A.1.: Fragmentierung der verwendeten Furanfettsäuren nach Methylierung mit TMSH bzw. nach Silylierung mit BSTFA in der GC-MS-Analyse; EI-Ionisierung; IE = 70 eV; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

FFA	Derivatisierung	RT (GC) [min]	Fragmentierung nach Derivatisierung <i>m/z</i> (relative Intensität)
8,10	TMSH	19,67	308 (M <sup>+</sup> ; 31), 277 (4), 234 (3), 223 (13), 205 (15), 193 (20), 191 (32), 179 (100), 163 (14), 149 (44), 135 (15), 121 (15), 107 (35), 95 (95), 81 (34)
8,10	BSTFA	21,17	366 (M <sup>+</sup> ; 83), 351 (90), 281 (11), 276 (15), 234 (30), 205 (44), 193 (36), 191 (47), 179 (100), 163 (27), 149 (44), 135 (33), 121 (22), 107 (30), 95 (66), 81 (21)
9,11	TMSH	19,72	308 (M <sup>+</sup> ; 27), 277 (8), 237 (15), 234 (0,5), 207 (7), 205 (13), 179 (20), 165 (100), 163 (33), 147 (21), 135 (13), 121 (14), 107 (20), 95 (73), 81 (30)
9,11	BSTFA	21,88	366 (M <sup>+</sup> ; 44), 351 (62), 295 (26), 276 (21), 248 (28), 234 (11), 205 (55), 179 (44), 165 (100), 163 (77), 145 (53), 131 (38), 121 (32), 107 (28), 95 (79), 81 (34)
10,12	TMSH	19,77	308 (M <sup>+</sup> ; 24), 277 (7), 251 (9), 234 (9), 207 (9), 177 (23), 165 (26), 159 (15), 151 (100), 135 (9), 121 (14), 107 (19), 95 (54), 81 (18)
10,12	BSTFA	21,97	366 (M <sup>+</sup> , 43), 351 (64), 309 (23), 276 (15), 248 (52), 234 (11), 205 (27), 177 (53), 165 (48), 159 (62), 151 (100), 135 (41), 121 (39), 107 (41), 95 (88), 81 (49)

### A.1.2. GC-MS-Fragmentierung der oxidativen Metaboliten der Furanfettsäuren

Tabelle A.2.: Fragmentierung der oxidativen Metaboliten bzw. derer Reaktionsprodukte von 8,10-FFA nach Methylierung mit TMSH bzw. nach Silylierung mit BSTFA in der GC-MS-Analyse; EI-Ionisierung; IE = 70 eV; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

HPLC-Peak	Derivatisierung	RT (GC) [min]	Fragmentierung nach Derivatisierung <i>m/z</i> (relative Intensität)
A1	TMSH	24,26	352 (M <sup>+</sup> ; 100), 321 (32), 289 (43), 223 (22), 206 (30), 191 (44), 177 (14), 163 (20), 149 (46), 133 (19), 121 (14), 107 (22), 95 (45), 81 (13)
A2	TMSH	22,59	338 (M <sup>+</sup> ; 70), 306 (100), 277 (45), 249 (59), 205 (23), 191 (39), 177 (62), 163 (59), 149 (56), 135 (56), 121 (31), 107 (63), 95 (37), 81 (24)
A2	TMSH	23,02	324 (M <sup>+</sup> ; 18), 306 (41), 277 (23), 249 (29), 205 (13), 191 (43), 177 (68), 163 (62), 149 (36), 135 (46), 121 (39), 107 (100), 95 (59), 81 (45)
A2	BSTFA	24,98	454 (M <sup>+</sup> ; 17), 439 (19), 364 (100), 349 (34), 275 (49), 205 (32), 191 (66), 177 (90), 163 (91), 149 (95), 135 (79), 121 (53), 107 (72), 95 (59), 81 (61)
A3	TMSH	23,20	338 (M <sup>+</sup> ; 100), 306 (15), 277 (10), 223 (23), 205 (19), 191 (42), 177 (21), 163 (22), 159 (30), 149 (45), 135 (42), 121 (24), 107 (49), 95 (61), 81 (8)
A3	TMSH	24,00	324 (M <sup>+</sup> ; 100), 306 (4), 277 (5), 223 (19), 205 (18), 191 (43), 177 (14), 163 (28), 159 (24), 149 (48), 135 (38), 121 (36), 107 (51), 95 (94), 81 (19)
A3	BSTFA	25,96	454 (M <sup>+</sup> ; 55), 439 (16), 364 (42), 349 (15), 275 (29), 205 (23), 191 (69), 177 (42), 163 (72), 149 (100), 135 (57), 121 (44), 107 (42), 95 (53), 81 (28)
A8	TMSH	21,87	338 (M <sup>+</sup> ; 5), 306 (19), 275 (6), 253 (100), 161 (11), 147 (22), 107 (6)
A8	TMSH	22,92	324 (M <sup>+</sup> ; 24), 306 (85), 277 (17), 275 (10), 263 (17), 249 (19), 207 (100), 177 (34), 161 (36), 107 (41)
A9	TMSH	21,83	338 (M <sup>+</sup> ; 14), 306 (12), 275 (6), 209 (100), 161 (2), 147 (3), 107 (3)
A9	TMSH	22,93	324 (M <sup>+</sup> ; 21), 306 (41), 277 (7), 275 (10), 205 (20), 195 (100), 161 (13), 147 (18), 107 (15), 95 (9)

Tabelle A.3.: Fragmentierung der oxidativen Metaboliten bzw. derer Reaktionsprodukte von 9,11-FFA nach Methylierung mit TMSH bzw. nach Silylierung mit BSTFA in der GC-MS-Analyse; EI-Ionisierung; IE = 70 eV; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

HPLC-Peak	Derivatisierung	RT (GC) [min]	Fragmentierung nach Derivatisierung $m/z$ (relative Intensität)
B1	TMSH	24,36	352 ( $M^+$ ; 100), 321 (29), 289 (69), 251 (12), 191 (16), 177 (36), 163 (31), 149 (29), 135 (22), 121 (10), 107 (14), 95 (29), 81 (6)
B2	TMSH	22,36	338 ( $M^+$ ; 4), 306 (100), 291 (33), 277 (14), 263 (35), 177 (12), 163 (62), 149 (68), 135 (24), 121 (23), 107 (52), 95 (26), 81 (35)
B2	TMSH	23,06	324 ( $M^+$ ; 22), 306 (69), 291 (57), 277 (40), 263 (62), 177 (45), 163 (94), 149 (68), 135 (30), 121 (47), 107 (100), 95 (61), 81 (63)
B2	BSTFA	24,91	454 ( $M^+$ ; 12), 439 (15), 364 (100), 349 (31), 275 (61), 246 (60), 191 (32), 177 (58), 163 (41), 149 (47), 135 (39), 121 (21), 107 (43), 95 (19), 81 (25)
B3	TMSH	23,23	338 ( $M^+$ ; 100), 306 (28), 277 (19), 263 (17), 237 (37), 191 (26), 177 (28), 163 (75), 149 (40), 145 (46), 135 (38), 121 (54), 107 (57), 95 (78), 81 (22)
B3	TMSH	24,02	324 ( $M^+$ ; 88), 306 (18), 277 (6), 263 (19), 237 (36), 191 (8), 177 (18), 163 (81), 149 (56), 145, (44), 135 (55), 121 (59), 107 (69), 95 (100), 81 (28)
B3	BSTFA	25,94	454 ( $M^+$ ; 100), 439 (40), 364 (50), 349 (14), 275 (32), 191 (29), 177 (22), 163 (32), 159 (21), 149 (46), 135 (25), 121 (26), 107 (39), 95 (46), 81 (8)
B7	TMSH	21,93	338 ( $M^+$ ; 11), 306 (15), 267 (100), 235 (4), 161 (17), 143 (6), 107 (5)
B7	TMSH	22,96	324 ( $M^+$ ; 13), 306 (100), 275 (12), 263 (24), 249 (15), 221 (95), 175 (24), 163 (34), 149 (22), 135 (26), 121 (25), 107 (51), 95 (22)
B8	TMSH	21,86	338 ( $M^+$ ; 10), 306 (12), 195 (100), 165 (4), 107 (3)
B8	TMSH	22,96	324 ( $M^+$ ; 23), 306 (69), 263 (9), 232 (52), 191 (30), 181 (100), 165 (15), 149 (8), 107 (13), 95 (13)

Tabelle A.4.: Fragmentierung der oxidativen Metaboliten bzw. derer Reaktionsprodukte von 10,12-FFA nach Methylierung mit TMSH bzw. nach Silylierung mit BSTFA in der GC-MS-Analyse; EI-Ionisierung; IE = 70 eV; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

HPLC-Peak	Derivatisierung	RT (GC) [min]	Fragmentierung nach Derivatisierung $m/z$ (relative Intensität)
C3	TMSH	22,65	338 ( $M^+$ ; 8), 306 (92), 291 (19), 264 (82), 177 (42), 163 (100), 149 (70), 135 (36), 121 (26), 107 (64), 95 (17), 81 (10)
C3	TMSH	23,09	324 ( $M^+$ ; 31), 306 (80), 291 (24), 275 (19), 264 (28), 177 (57), 163 (100), 149 (80), 135 (40), 121 (35), 107 (91), 95 (52), 81 (16)
C3	TMSH	23,26	338 ( $M^+$ ; 54), 306 (97), 277 (27), 265 (15), 251 (20), 237 (23), 177 (27), 163 (41), 149 (100), 135 (74), 121 (57), 107 (61), 95 (48), 81 (24)
C3	TMSH	24,07	324 ( $M^+$ ; 38), 306 (65), 277 (15), 265 (8), 251 (21), 237 (9), 177 (28), 163 (27), 149 (100), 135 (71), 121 (54), 107 (63), 95 (72), 81 (30)
C3	BSTFA	25,02	454 ( $M^+$ ; 0,5), 439 (8), 364 (49), 349 (16), 322 (100), 275 (31), 232 (30), 177 (39), 163 (61), 149 (54), 135 (44), 121 (34), 107 (36), 95 (22), 81 (15)
C3	BSTFA	26,04	454 ( $M^+$ ; 3), 439 (13), 364 (72), 349 (8), 275 (38), 246 (31), 177 (19), 163 (31), 149 (100), 135 (82), 121 (24), 107 (27), 95 (20), 81 (18)
C5	TMSH	22,12	338 ( $M^+$ ; 7), 306 (19), 281 (100), 275 (4), 175 (7), 121 (6), 107 (8), 95 (8)
C5	TMSH	23,00	324 ( $M^+$ ; 17), 306 (69), 277 (19), 263 (25), 235 (100), 205 (19), 171 (42), 149 (29), 135 (19), 121 (17), 107 (46), 95 (18)
C6	TMSH	21,94	338 ( $M^+$ ; 14), 306 (14), 275 (4), 181 (100), 177 (6), 151 (5), 107 (4)
C6	TMSH	23,04	324 ( $M^+$ ; 31), 306 (48), 275 (10), 263 (8), 205 (13), 191 (8), 177 (26), 167 (100), 149 (11), 135 (12), 121 (9), 107 (30), 95 (13)

### A.1.3. GC-MS-Fragmentierung der Reaktionsprodukte aus Dioxoenfettsäuren

Tabelle A.5.: Fragmentierung der ungesättigten 8,10-FFAs, die durch Recyclisierung in der GC-MS-Analyse aus Dioxoenfettsäuren entstehen; nach Methylierung mit TMSH; EI-Ionisierung; IE = 70 eV; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

Reaktionsprodukt	RT (GC) [min]	Fragmentierung nach Methylierung mit TMSH <i>m/z</i> (relative Intensität)
6,7-ungesättigte 8,10-FFA	21,04; 22,98	306 (M <sup>+</sup> ; 88), 277 (10), 275 (16), 232 (26), 205 (100), 189 (25), 179 (29), 161 (39), 147 (62), 121 (38), 107 (34), 81 (22)
12,13-ungesättigte 8,10-FFA	20,98; 22,83	306 (M <sup>+</sup> ; 73), 277 (17), 275 (15), 249 (17), 191 (22), 177 (92), 135 (18), 121 (37), 107 (100), 81 (30)

### A.1.4. GC-MS-Fragmentierung der $\beta$ -Oxidationsprodukte

Tabelle A.6.: Fragmentierung der  $\beta$ -Oxidationsprodukte von 8,10-FFA nach Methylierung mit TMSH in der GC-MS-Analyse; EI-Ionisierung; IE = 70 eV; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

$\beta$ -Oxidationsprodukt von 8,10-FFA	RT (GC) [min]	Fragmentierung nach Methylierung mit TMSH <i>m/z</i> (relative Intensität)
- 1 $\times$ Ac-CoA	19,03	280 (M <sup>+</sup> ; 81), 249 (36), 195 (20), 179 (60), 163 (31), 135 (19), 121 (100), 107 (34), 95 (41), 81 (13)
- 2 $\times$ Ac-CoA	14,68	252 (M <sup>+</sup> ; 37), 179 (25), 167 (25), 149 (6), 107 (100), 95 (14), 81 (5)
Zwischenprodukt I (Hydroxyverbindung)	23,08	324 (M <sup>+</sup> ; 81), 306 (41), 233 (56), 235 (11), 179 (56), 167 (100), 149 (31), 147 (80), 135 (30), 121 (29), 107 (68), 95 (93), 81 (64)
Zwischenprodukt II (Ketoüberbindung)	23,93	322 (M <sup>+</sup> ; 88), 277 (25), 251 (20), 237 (24), 193 (30), 179 (100), 163 (16), 149 (38), 121 (13), 107 (42), 95 (89)

Tabelle A.7.: Fragmentierung der  $\beta$ -Oxidationsprodukte von 10,12-FFA nach Methylierung mit TMSH in der GC-MS-Analyse; EI-Ionisierung; IE = 70 eV; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

$\beta$ -Oxidationsprodukt von 10,12-FFA	RT (GC) [min]	Fragmentierung nach Methylierung mit TMSH $m/z$ (relative Intensität)
- 1 $\times$ Ac-CoA	19,21	280 ( $M^+$ ; 66), 249 (8), 223 (18), 191 (36), 151 (100), 149 (52), 121 (11), 107 (22), 95 (63), 81 (28)
- 2 $\times$ Ac-CoA	14,71	252 ( $M^+$ ; 73), 221 (25), 195 (17), 177 (16), 163 (26), 151 (72), 121 (100), 107 (23), 95 (31), 81 (25)
- 3 $\times$ Ac-CoA	10,08	224 ( $M^+$ ; 33), 167 (26), 151 (33), 107 (100), 95 (9), 81 (6)
Zwischenprodukt I (Hydroxyverbindung)	23,07	324 ( $M^+$ ; 86), 281 (11), 251 (17), 193 (31), 179 (11), 165 (23), 151 (100), 149 (13), 135 (10), 107 (49), 95 (73), 81 (38)
Zwischenprodukt II (Keto-Verbindung)	23,18	322 ( $M^+$ ; 82), 277 (50), 265 (25), 193 (10), 165 (33), 151 (100), 149 (11), 135 (14), 107 (23), 95 (75), 81 (32)

#### A.1.5. GC-MS-Chromatogramme der Umsetzung von 9,11- und 10,12-FFA

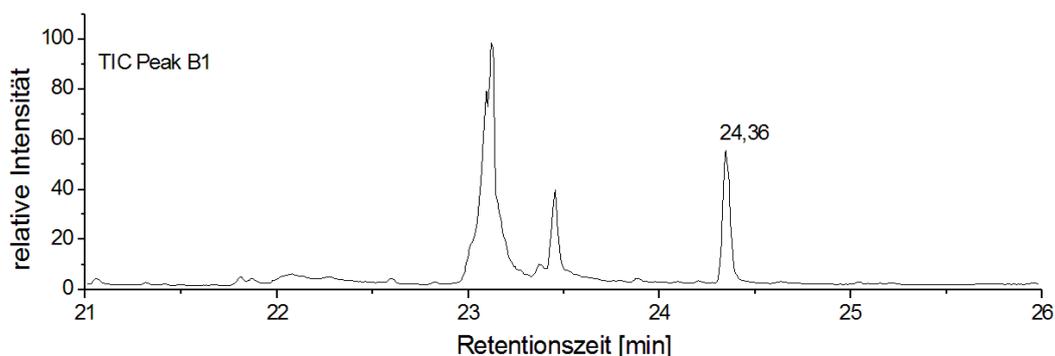


Abbildung A.1.: GC-MS-Chromatogramm (TIC) von HPLC-Peak B1 der oxidativen Umsetzung von 9,11-FFA mit Wi-Rattenlebermikrosomen nach Methylierung mit TMSH, Peak RT = 24,36 min (Molekülion  $m/z = 352$ ) ist als Produkt von 9,11-FFA nachweisbar; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

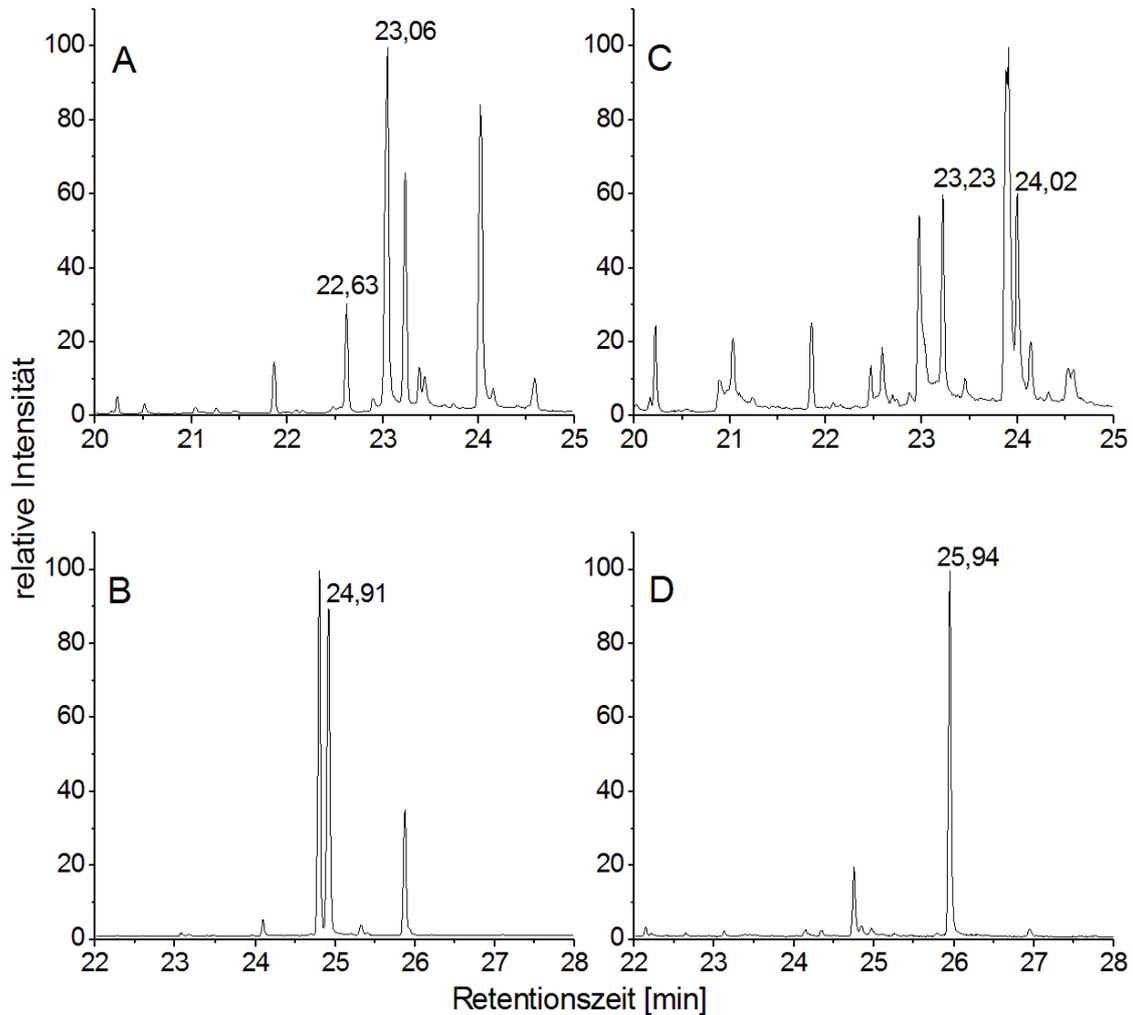


Abbildung A.2.: GC-MS-Chromatogramme (TIC) von HPLC-Peak B2 nach Methylierung mit TMSH (A; Produkte von 9,11-FFA: RT = 22,63 min ( $m/z = 338$ ); RT = 23,06 min ( $m/z = 324$ )) und Silylierung mit BSTFA (B; Produkt von 9,11-FFA: RT = 24,91 min ( $m/z = 454$ )), sowie von HPLC-Peak B3 nach Methylierung mit TMSH (C; Produkte von 9,11-FFA: RT = 23,23 min ( $m/z = 338$ ); RT = 24,02 min ( $m/z = 324$ )) und Silylierung mit BSTFA (D; Produkt von 9,11-FFA: RT = 25,94 min ( $m/z = 454$ )); GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

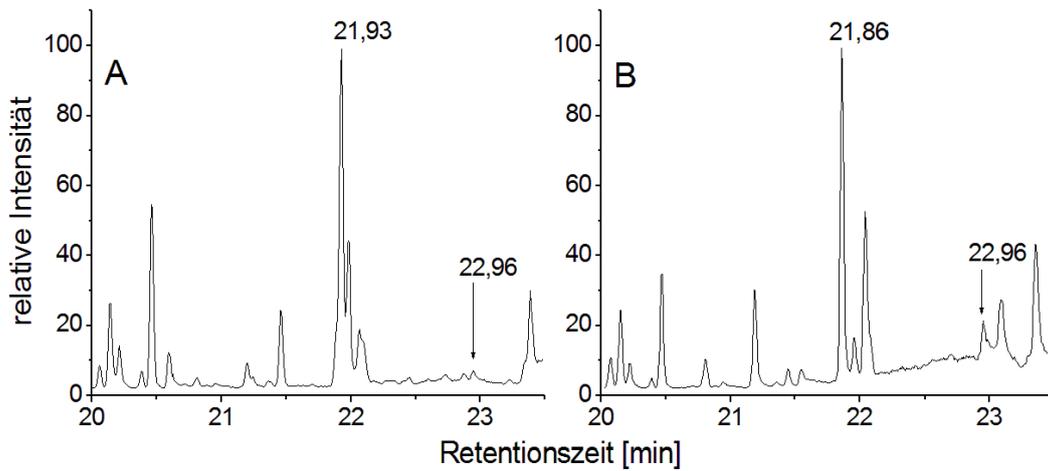


Abbildung A.3.: GC-MS-Chromatogramme (TIC) von HPLC-Peak B7 (A; Produkte von 9,11-FFA: RT = 21,93 min ( $m/z$  = 338); RT = 22,96 min ( $m/z$  = 324)) und HPLC-Peak B8 (B; Produkte von 9,11-FFA: RT = 21,86 min ( $m/z$  = 338); RT = 22,96 min ( $m/z$  = 324)) nach Methylierung mit TMSH; GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

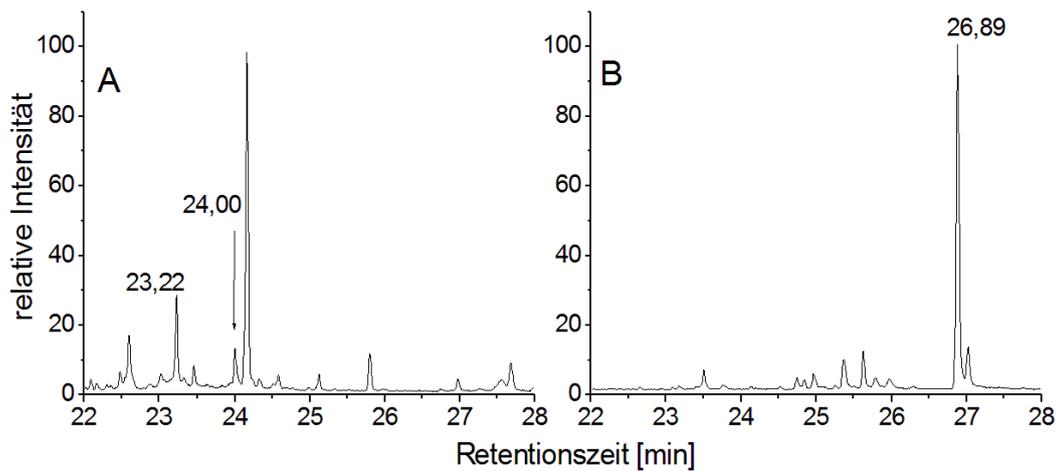


Abbildung A.4.: GC-MS-Chromatogramme (TIC) von HPLC-Peak B10 nach Methylierung mit TMSH (A; Produkte von 9,11-FFA: RT = 23,22 min ( $m/z$  = 338); RT = 24,00 min ( $m/z$  = 324)), sowie nach Silylierung mit BSTFA (B; Produkte aus 9,11-FFA: RT = 26,89 min ( $m/z$  = 424)); GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

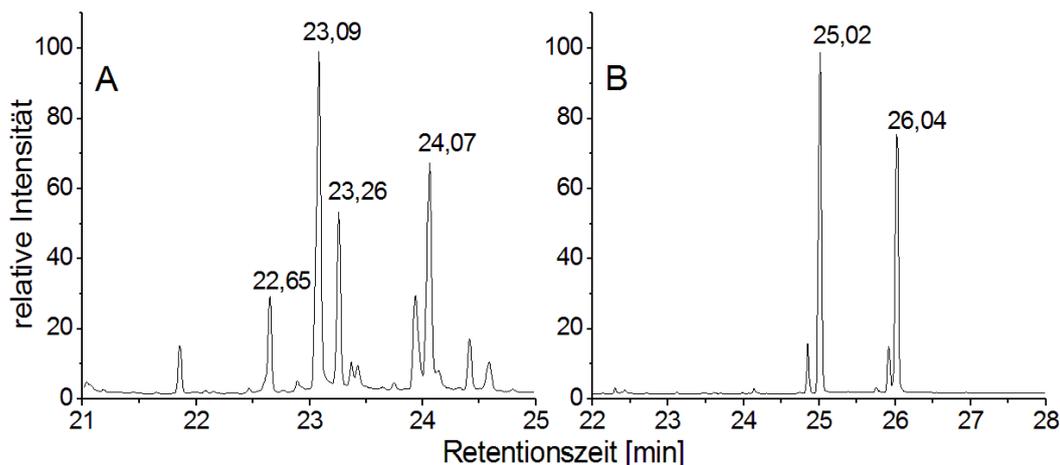


Abbildung A.5.: GC-MS-Chromatogramme (TIC) von HPLC-Peak C3 nach Methylierung mit TMSH (A; Produkte von 10,12-FFA: RT = 22,65 min ( $m/z = 338$ ); RT = 23,09 min ( $m/z = 324$ ); RT = 23,26 min ( $m/z = 338$ ); RT = 24,07 min ( $m/z = 324$ )), sowie nach Silylierung mit BSTFA (B; Produkte von 10,12-FFA: RT = 25,02 min ( $m/z = 454$ ); RT = 26,04 min ( $m/z = 454$ )); GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

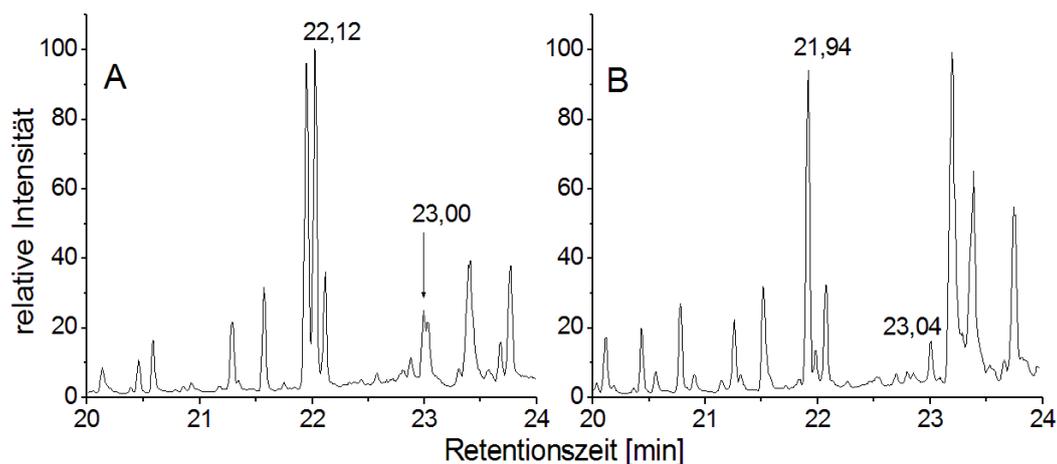


Abbildung A.6.: GC-MS-Chromatogramme (TIC) von HPLC-Peak C5 nach Methylierung mit TMSH (A; Produkte aus 10,12-FFA: RT = 22,12 min ( $m/z = 338$ ); RT = 23,00 min ( $m/z = 324$ )), sowie von HPLC-Peak C6 nach Methylierung mit TMSH (B; Produkte aus 10,12-FFA: RT = 21,94 min ( $m/z = 338$ ); RT = 23,04 min; ( $m/z = 324$ )); GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

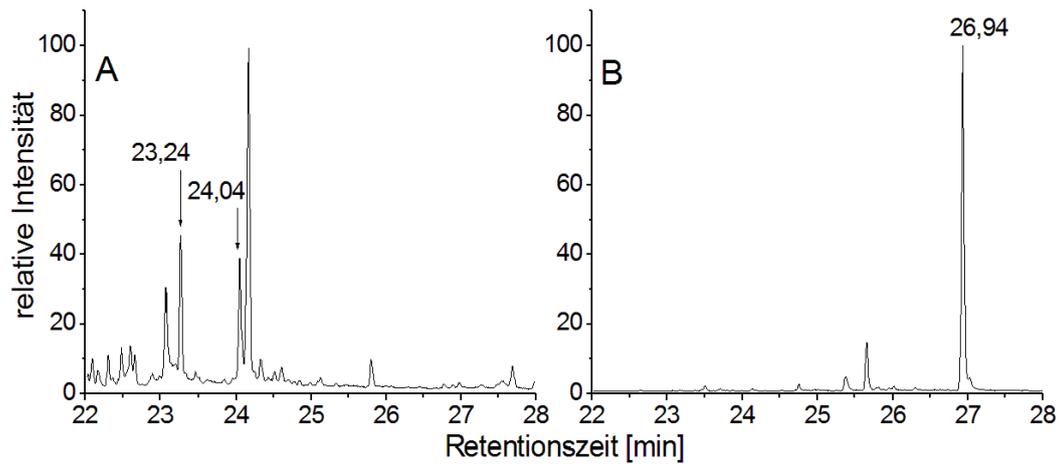


Abbildung A.7.: GC-MS-Chromatogramme (TIC) von HPLC-Peak C8 nach Methylierung mit TMSH (A; Produkte aus 10,12-FFA: RT = 23,24 min ( $m/z = 338$ ); RT = 24,04 min ( $m/z = 324$ )) und nach Silylierung mit BSTFA (B; Produkt aus 10,12-FFA: RT = 26,94 min ( $m/z = 424$ )); GC-MS-Bedingungen s. 6.2.1.2

A.1.6. Re-Analysen der Epoxide der Furanfettsäuren

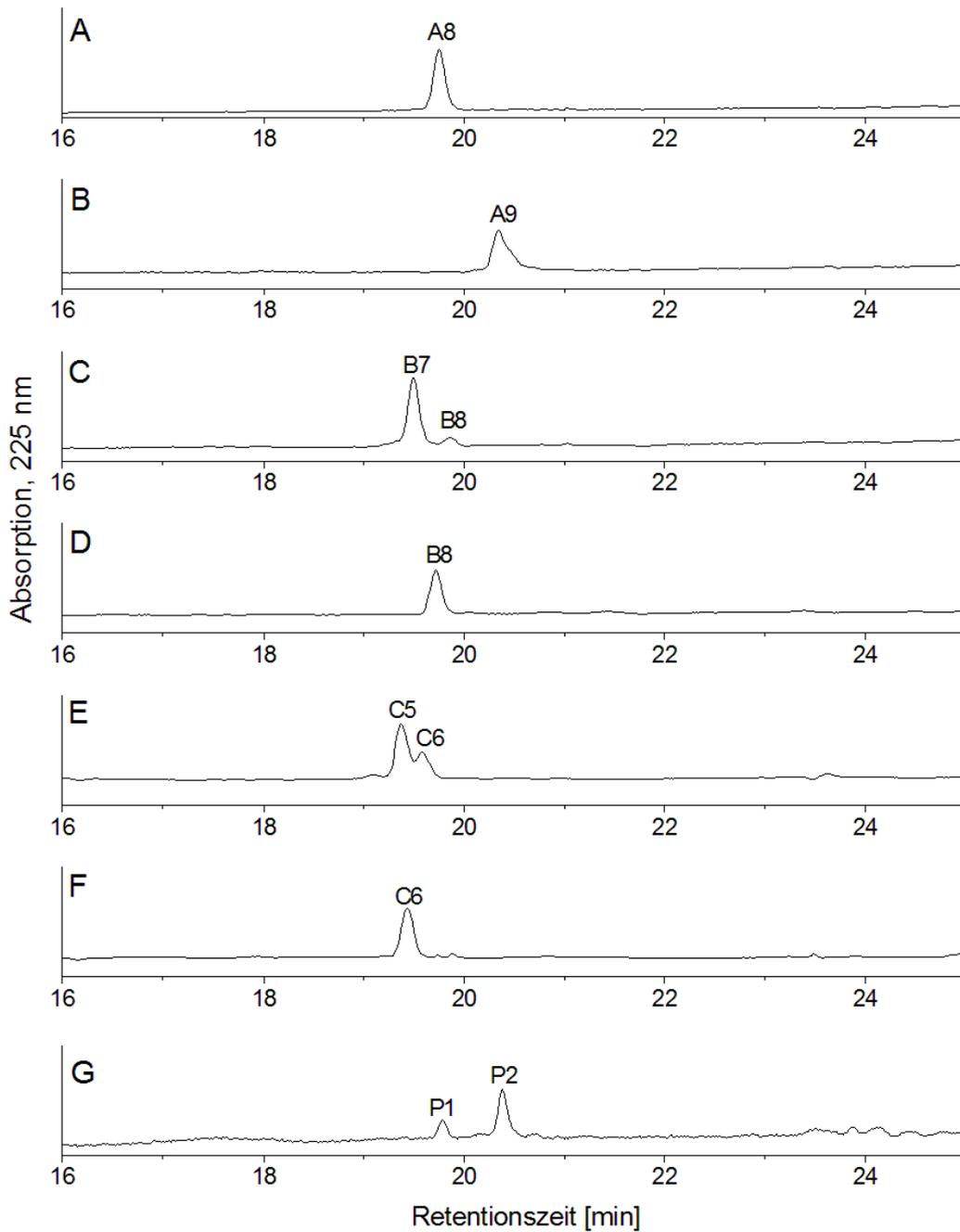


Abbildung A.8.: HPLC-DAD-Chromatogramme der Reanalysen der fraktionierten HPLC-Peaks A8 (A), A9 (B), B7 (C, enthält Spuren von B8), B8 (D), C5 (E, enthält Anteile von C6) und C6 (F) der oxidativen Umsetzungen der FFAs, sowie von Fraktion 1 (enthält P1 und P2) der chemo-enzymatischen Epoxidierung von 8,10-FFA (G); HPLC-Bedingungen s. 6.2.1.1

## A.2. Cytotoxizitäts- und Genotoxizitätsassay

Tabelle A.8.: MTT-Assay mit 8,10- bzw. 10,12-FFA in V79-Zellen; <sup>a</sup>inkubiert für 6 h mit FKS-freiem DMEM, <sup>b</sup>für 6 h mit FKS-freiem DMEM mit anschließender substanzfreier Nachinkubation für 24 h oder <sup>c</sup>für 6 h mit FKS-haltigem DMEM (FKS 10% (V/V)) mit anschließender substanzfreier Nachinkubation für 24 h; angegeben sind die Mittelwerte der Viabilität in %, aus drei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  S.D.; die Viabilität bezieht sich auf die Negativkontrolle (1% DMSO), die als 100%-Wert gesetzt wird, n.b. = nicht bestimmt

FFA	8,10-FFA			10,12-FFA		
c(FFA) [μM]	6 h (o. FKS) <sup>a</sup>	6 h + 24 h (o. FKS) <sup>b</sup>	6 h + 24 h (m. FKS) <sup>c</sup>	6 h (o. FKS) <sup>a</sup>	6 h + 24 h (o. FKS) <sup>b</sup>	6 h + 24 h (m. FKS) <sup>c</sup>
0,1	106,8±7,5	95,1±12,4	111,5±10	99,9±10,9	105±12,6	115,8±6,4
0,3	n.b.	90,9±10,4	110,0±4,4	n.b.	97,1±12,6	110,5±3,5
0,6	n.b.	87,9±26,3	107,2±4,5	n.b.	101,0±7,5	103,2±6,6
1	103,0±6,1	85,4±16,6	103,5±3,7	99,6±10,6	92,0±7,0	105,3±6,6
10	104,2±0,7	81,5±19,9	101,6±3,2	105,8±2,9	97,2±7,8	101,9±6,0
25	99,5±10,5	78,2±17,4	92,8±8,2	96,4±5,4	83,5±8,8	97,2±6,9
50	103,1±9,9	62,0±18,5	91,6±6,0	45,9±2,0	15,7±4,1	95,1±4,3
100	67,5±7,0	42,9±12,9	68,9±8,4	40,7±3,6	10,3±2,8	94,1±7,0
150	n.b.	9,9±1,3	18,9±2,4	n.b.	9,5±2,0	92,6±5,6
200	29,4±2,0	10,0±1,3	10,3±3,0	36,7±1,9	9,4±1,9	84,5±8,7
250	31,4±3,1	9,8±1,3	8,5±2,5	32,6±2,6	9,6±1,7	81,1±12,4

Tabelle A.9.: MN-Test mit 8,10- bzw. 10,12-FFA in V79-Zellen; inkubiert für 6 h mit FKS-freiem DMEM mit anschließender substanzfreier Nachinkubation für 24 h; angegeben sind die Mittelwerte der MN und Mitosen aus drei unabhängigen Bestimmungen, bezogen auf 1000 Zellen  $\pm$  S.D.; n.b. = nicht bestimmt

FFA	8,10-FFA		10,12-FFA	
c(FFA) [μM]	MN	Mitosen	MN	Mitosen
Kontrolle	8,4±3,0	32,9±9,9	11,8±1,7	35,2±3,7
10	9,5±0,5	41,5±3,5	n.b.	n.b.
20	8,3±1,7	43,3±5,4	13,3±1,7	36,8±2,6
30	n.b.	n.b.	18,3±3,0	34,5±3,9
40	n.b.	n.b.	21,2±0,5	19,2±1,7
100	9,0±0,5	36,0±5,3	n.b.	n.b.

### A.3. Abbau von Furanfettsäuren und Linolsäure in V79-Zellen

Tabelle A.10.: Zeitlicher Verlauf des Abbaus von 8,10-FFA, 9,11-FFA, 10,12-FFA und C 18:2 in V79-Zellen; 3 h Inkubation mit  $c(\text{FA}) = 50 \mu\text{M}$  mit FKS-freiem DMEM und anschließende substanzfreie Nachinkubation mit <sup>a</sup>FKS-freiem DMEM (8,10- und 9,11-FFA) und <sup>b</sup>FKS-haltigem DMEM (10,12-FFA und C 18:2); angegeben sind die Mittelwerte der Stoffmengen der Fettsäuren in nmol aus zwei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  Schwankungsbreite; TG = Triglyceride, PL = Phospholipide, n.b. = nicht bestimmt

Fraktion	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
Zeit [h]	8,10-FFA <sup>a</sup>		9,11-FFA <sup>a</sup>		10,12-FFA <sup>b</sup>		C 18:2 <sup>b</sup>	
0	42,2 $\pm 10,0$	69,2 $\pm 6,3$	62,3 $\pm 12,8$	97,5 $\pm 6,3$	90,9 $\pm 36,9$	113,3 $\pm 25,1$	134,1 $\pm 6,7$	100,8 $\pm 1,7$
0,5	15,1 $\pm 1,1$	40,2 $\pm 2,9$	33,5 $\pm 6,8$	59,6 $\pm 5,6$	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
1	7,6 $\pm 0,4$	24,0 $\pm 5,3$	16,5 $\pm 2,8$	48,8 $\pm 4,0$	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
3	4,1 $\pm 0,1$	15,4 $\pm 0,6$	9,9 $\pm 2,5$	32,4 $\pm 5,4$	10,2 $\pm 0,7$	47,6 $\pm 2,7$	55,7 $\pm 0,1$	84,9 $\pm 9,9$
6	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	17,1 $\pm 11,0$	53,3 $\pm 6,8$	26,3 $\pm 8,4$	80,6 $\pm 16,1$
12	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	4,9 $\pm 2,3$	27,6 $\pm 4,3$	4,5 $\pm 0,6$	64,2 $\pm 20,6$
24	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	2,7 $\pm 1,5$	29,2 $\pm 11,2$	3,4 $\pm 0,2$	39,8 $\pm 14,2$
36	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	2,2 $\pm 0,0$	66,4 $\pm 34,2$	2,4 $\pm 0,3$	61,4 $\pm 8,0$
48	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,0 $\pm 0,1$	15,9 $\pm 4,8$	1,6 $\pm 0,8$	42,4 $\pm 9,9$

## A.4. Lipidperoxidation

Tabelle A.11.: Lipidperoxidation in mit C 20:4 angereicherten V79-Zellen nach 2 h Inkubation mit 10,12-FFA und/oder *tert*-Butylhydroperoxid; angegeben sind die Mittelwerte der Stoffmengen der TBARS in nmol in den Zellen und im Kulturmedium, aus drei unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  S.D.; Negativkontrolle mit 0,5% DMSO;  $c(\text{tBuOOH}) = 500 \mu\text{M}$

c(FFA) [ $\mu\text{M}$ ]	Zellen	Medium
Kontrolle	2,2 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,3
tBuOOH	4,1 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,5
25	3,7 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,2
50	2,9 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,1
25 + tBuOOH	4,3 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,6
50 + tBuOOH	3,5 $\pm$ 1,0	1,6 $\pm$ 0,3

Tabelle A.12.: Lipidperoxidation in Präzisionsgewebeschnitten aus SD-Rattenleber nach 4 h Inkubation mit 8,10- bzw. 10,12-FFA und/oder *tert*-Butylhydroperoxid; angegeben sind die Mittelwerte der Konzentrationen der TBARS in nmol/mg in den Gewebeschnitten und im Kulturmedium, <sup>a</sup>aus einer Bestimmung bei 8,10-FFA (je Konzentration zwei inkubierte Schnitte)  $\pm$  Schwankungsbreite, <sup>b</sup>aus drei unabhängigen Bestimmungen bei 10,12-FFA (je Konzentration zwei inkubierte Schnitte)  $\pm$  S.D.; Negativkontrolle mit 1% DMSO;  $c(\text{tBuOOH}) = 1 \text{ mM}$

FFA	8,10-FFA <sup>a</sup>		10,12-FFA <sup>b</sup>	
	Gewebe	Medium	Gewebe	Medium
Kontrolle	0,10 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,04	0,03 $\pm$ 0,01
tBuOOH	0,16 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,07	0,12 $\pm$ 0,03
50	0,12 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,06	0,11 $\pm$ 0,01
100	0,11 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,03
200	0,11 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,03
50 + tBuOOH	0,15 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,07	0,15 $\pm$ 0,03
100 + tBuOOH	0,15 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,08	0,19 $\pm$ 0,05
200 + tBuOOH	0,13 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,09	0,16 $\pm$ 0,04

## B. Veröffentlichungen

### Beiträge auf Kongressen und Fachtagungen

S. Göckler, E. Pfeiffer, N. Hinrichsen, H. Steinhart, M. Metzler: Untersuchung der cytotoxischen und genotoxischen Wirkung von Furanfettsäuren; 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Nürnberg, 10. - 12. September 2007, Abstract: Lebensmittelchemie, 62(4), 101, 2008

S. Göckler, E. Pfeiffer, M. Metzler: Strukturaufklärung der Metaboliten von 8,10-Furanfettsäure nach in-vitro-Metabolisierung in Rattenlebermikrosomen; 35. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, 18. - 20. September 2006, Abstract: Lebensmittelchemie, 61(2), 40, 2007



## C. Danksagung

Danken möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit ihren Beitrag geleistet haben:

- Herrn Prof. Dr. Dr. Manfred Metzler für das Überlassen des interessanten Themas, seine wohlwollende und freundliche Unterstützung sowie seine Diskussionsbereitschaft
- Frau Erika Pfeiffer für die fortwährende Unterstützung bei theoretischen und praktischen Fragen, für die zahlreichen Anregungen und für ihre Geduld
- Nils Hinrichsen aus dem AK Steinhart (Universität Hamburg) für die Synthese diverser Furanfettsäuren im Rahmen des DFG-Verbundprojekts „Lipidnet“
- meinen Mitdoktoranden im Arbeitskreis (in alphabetischer Reihenfolge) Britta Burkhardt, Georg Damm, Julia Dempe, Silke Gerstner und Simone Höhle für das außergewöhnlich gute Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft
- Doris Honig für zahlreichen Einspritzungen in die GC-MS und für Hilfestellung bei technischen Problemen
- Dr. Renate Loske für stets gute Anregungen in Bezug auf SPE-Methoden und GC-Analytik
- Jutta Wiedenhöfer und Simone Haupt für ihre Beiträge zu dieser Arbeit während ihrer Diplomarbeiten
- allen anderen Mitdoktoranden und Mitarbeitern der Abteilungen für Lebensmittelchemie und Lebensmitteltoxikologie für eine tolle Zeit an der Universität Karlsruhe

Besonders danken möchte ich:

- Anne für ihre ständige Unterstützung in jeder Phase dieser Arbeit, ihre unerschöpfliche Geduld, ihr Verständnis und ihre Aufmunterungen, sowie für das Lesen dieser Arbeit
- meinen Eltern und meiner Schwester für ihre ständige Unterstützung und Hilfe in jeder Hinsicht und speziell meinem Vater für das Lesen dieser Arbeit



# Lebenslauf

**Name:** Simon Göckler  
**Geburtsdatum:** 12. September 1978  
**Geburtsort:** Waiblingen  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch

## Schulausbildung

September 1985 - Juli 1989 Grund- und Hauptschule in der Taus, Backnang  
August 1989 - Juni 1998 Gymnasium in der Taus, Backnang  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Wehrersatzdienst

Sept. 1998 - Sept. 1999 Zivildienst im St. Franziskus-Hospital, Köln

## Hochschulausbildung

Oktober 1999 - Mai 2004 Studium der Lebensmittelchemie an der  
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

09. März 2002 Zwischenprüfung für Lebensmittelchemiker

03. Mai 2004 1. staatliche Prüfung für Lebensmittelchemiker

Juni 2004 - Mai 2005 Berufspraktisches Jahr am CEL Recklinghausen

13. Juli 2005 2. staatliche Prüfung für Lebensmittelchemiker  
Abschluss: Staatlich geprüfter Lebensmittelchemiker

seit 01. Oktober 2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität  
Karlsruhe (TH), Fakultät für Chemie und  
Biowissenschaften, Institut für Angewandte  
Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie,  
Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. M. Metzler