Untersuchungen zur Zytotoxizität und Genotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in Leberzellmodellen

Vom Fachbereich Chemie der Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität Kaiserslautern-Landau zur Verleihung des akademischen Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte

Dissertation

D386

Rheinland-Pfälzische Technische Universität Kaiserslautern Landau

Vorgelegt von

Christina Marie Felske

Geboren in Kaiserslautern

Betreuer der wissenschaftlichen Arbeit: Prof. Dr. Jörg Fahrer

Datum der Promotionsaussprache: 23.03.2026

Kaiserslautern 2026

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in der Zeit von April 2022 bis Juni 2025 am Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität Kaiserslautern-Landau in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Fahrer durchgeführt.

Eröffnung des Promotionsvorhabens: 07.04.2022

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 23.03.2026

Promotionskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. Georg Manolikakes

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jörg Fahrer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Elke Richling

Prüfer: Prof. Dr. Antonio Pierik

Für meine Familie

Zusammenfassung

N-Nitrosamine zählen zu den alkylierenden Agenzien mit genotoxischen, mutagenen und karzinogenen Eigenschaften. Nach Absorption erfolgt die metabolische Aktivierung hauptsächlich in der Leber unter Cytochrom-P450 (CYP450)-Enzym-vermittelter Katalyse. Die Risikobewertung von *N*-Nitrosaminen in Arzneimitteln erfolgt nach Vorgaben der ICH M7 Guideline, in welcher die Ableitung von substanzspezifischen Aufnahmemengen (AIs) unter Zuhilfenahme bekannter Daten zur Tumorinzidenz gefordert ist (ICH M7, 2023). Dieser Ansatz ist bei Arzneimittelspezifischen Nitrosaminverunreinigungen, bekannt als Nitrosamin Drug Substance-Related Impurities (NDSRIs), für die robuste Kanzerogenitätsdaten strukturnaher Analoga oftmals fehlen, limitiert. Im Fokus dieser Arbeit stand die Etablierung einer *in vitro* Variante des alkalischen Comet Assays als ergänzende oder alternative Methode zum Ames Test, um die Prädiktivität im Hinblick auf genotoxische Effekte von *N*-Nitrosaminen zu verbessern. Die Bestimmung der Zytotoxizität und Genotoxizität von zehn strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen einschließlich der Ermittlung der metabolischen Kompetenz in PRH war ein wesentlicher Bestandteil dieser Aufgabe. Ferner sollten genotoxische Effekte in genetisch modifizierten HepG2 Zellen sowie in der Wildtyp Zelllinie untersucht werden. Die isolierten PRH verfügten über CYP2E1, CYP3A4, CYP1A2, CYP2D6, CYP2B6 und CYP2C9-Aktivität, wie mittels LC-MS basierter Messung der Stoffwechselverhältnisse mit etablierten CYP Substraten festgestellt wurde. Die beiden NDSRIs *N*-Nitrosodesloratadin (NND) und *N*-Nitrosofluoxetin (NFluo) zeigten bereits im µM Bereich zytotoxische Effekte, während *N*-Nitrosodimethylamin (NDMA), *N*-Nitrosodiethanolamin (NDELA), *N*-Methyl-*N*-Nitroso-iso-propylamin (NMIPA), (*S*)-*N'*-Nitrosonornikotin (S-NNN) und *N*-Methyl-*N*-Nitroso-tert-butylamin (NMtBu) nicht zytotoxisch waren. *N*-Nitrosofolsäure (NFA), *N*-Nitrosomethylanilin (NMA) und *N*-Nitrosoprolin (NPro) induzierten leichte zytotoxische Effekte in PRH. Für NFluo konnte das stärkste strangbruchinduzierende Potential gemessen werden, gefolgt von NDMA > NMIPA > NDELA, die ebenfalls positiv waren. Die übrigen *N*-Nitrosamine waren nicht eindeutig strangbruchinduzierend. Der *in vitro* Comet Assay in PRH resultierte in einer Spezifität von 100 % und in einer Sensitivität von 50 %. Für die NDSRIs *N*-Nitrosonortryptilin (NNT) und *N*-Nitrosobetahistin (NBH) war das Ausmaß verursachter

DNA-Strangbruchschäden höher als das durch NDMA induzierte. Neben dem Nachweis von O^6-Methylguanin- (O^6-MeG) und N7-Methylguanin- (N7-MeG) Addukten in mit NDMA behandelten PRH konnte gezeigt werden, dass die hohen Schweifintensitäten nach 2h aufgrund der recht geringen O^6-MeG-Adduktlevel vermutlich auf die gebildeten N7-MeG-Addukte und N3-MeA-Addukte zurückzuführen sind. Die Aktivität des Proteins CYP1A2 konnte in HepG2 Zelllinien eindeutig bestätigt werden. CYP2E1 war nur in HepG2-CYP2E1 Zellen nachweisbar. S-NNN war in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP1A2 Zellen zytotoxisch, während NDMA und NDELA zu zytotoxischen Effekten in HepG2-CYP2E1 Zellen führten. NDMA, NDELA und S-NNN induzierten mehrheitlich das p53 Proteinlevel in den verwendeten HepG2 Zelllinien. Die CYP2E1 abhängige metabolische Aktivierung von NDMA, NDELA und NMA ließ sich in HepG2-CYP2E1 Zellen demonstrieren. Ferner ließen sich klastogene Effekte von NDMA sowie die Induktion von DNA-cross-links durch NMA in HepG2-CYP2E1 Zellen feststellen. Der alkalische Comet Assay in PRH und in HepG2 Zellen zur Vorhersage des genotoxischen Potentials strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine konnte erfolgreich validiert werden.

Summary

N-nitrosamines belong to the group of alkylating agents with genotoxic and carcinogenic properties. After absorption, these compounds are metabolically activated in the liver via CYP450-mediated enzymatic catalysis. Risk assessment of *N*-nitrosamines in Drugs is defined by the ICH M7 Guideline, in which the derivation of compound specific acceptable intakes (AIs) is required under consideration of published data concerning tumor incidence (ICH M7, 2023). Due to the absence of carcinogenicity data this approach is limited for Active Pharmaceutical Ingredient (API) specific contaminants, known as Nitrosamine Drug Substance-related Impurities (NDSRIs). The focus of this work was the establishment of an *in vitro* version of the alkaline comet assay as complementary or alternative method to the Ames test in order to improve the predictivity of genotoxic properties of *N*-nitrosamines. The determination of the cytotoxicity and genotoxicity of ten structurally different *N*-nitrosamines, including the assessment of metabolic competence in PRH was an essential part of this task. Furthermore genotoxic effects should be determined in genetically modified HepG2 cells, including the wild-type

cell line. LC-MS based measurements of metabolic ratios demonstrated protein activity for CYP2E1, CYP3A4, CYP1A2, CYP2D6, CYP2B6 and CYP2C9 in PRH. The NDSRIs NND and NFluo showed cytotoxic effects in the µM range, while NDMA, NDELA, NMIPA, S-NNN and NMtBu were not cytotoxic. For NFA, NMA and NPro the extent of induced cytotoxicity was moderate. For NFluo, the strongest strand break-inducing potential could be measured, followed by NDMA>NMIPA> NDELA, which were tested positive as well. The other *N*-nitrosamines were not clearly strand-break inducing. The *in vitro* Comet Assay in PRH ultimately resulted in a specificity of 100% and a sensitivity of 50%. The NDSRIs NNT and NBH proved to be clearly more strand break-inducing than NDMA. Besides the detection of N7-MeG and N3-MeA adducts in PRH treated with NDMA, it could be demonstrated that the pronounced tail intensities after 2 h incubation are likely caused by N7-MeG and N3-MeA adducts due to the low O^6-MeG adduct levels. CYP1A2 protein activity could be confirmed in all genetically modified HepG2 cell lines, whereas CYP2E1 was only detectable in HepG2-CYP2E1 cells. S-NNN led to cytotoxic effects in HepG2 cells and in HepG2-CYP1A2 cells, whereas NDMA and NDELA induced cytotoxicity in HepG2-CYP2E1 cells. In sum, NDMA, NDELA, and S-NNN had a greater impact on the induction of p53-protein intensity in the HepG2 cell lines used. The CYP2E1-dependent metabolic activation of NDMA, NDELA and NMA could be demonstrated in HepG2-CYP2E1 cells. Furthermore clastogenic effects of NDMA as well as NMA mediated DNA cross-links in HepG2-CYP2E1 cells could be shown. The alkaline comet assay in PRH and in HepG2 cells for predicting the genotoxic potential of structural different *N*-nitrosamines has been successfully validated.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung V
Summary VI
Inhaltsverzeichnis VIII
Erklärungen XV
Abkürzungsverzeichnis XVI
Abbildungsverzeichnis XXI
Tabellenverzeichnis XXV
1. Einleitung 1
1.1 Bildung und chemische Eigenschaften von *N*-Nitrosaminen 1
1.2 Vorkommen von *N*-Nitrosaminen 3
1.2.1 NDMA 5
1.2.2 NDELA 7
1.2.3 NNN 7
1.2.4 NMA 9
1.3 Mutagene und karzinogene Eigenschaften und metabolische Aktivierung von *N*-Nitrosaminen 10
1.3.1 Chemische Eigenschaften 10
1.3.2 Beteiligung verschiedener CYP Enzyme an der metabolischen Aktivierung von *N*-Nitrosaminen 14
1.3.3 Faktoren, die zum karzinogenen Potential von *N*-Nitrosaminen beitragen 15
1.3.4 Einfluss von Lösungsmitteln auf die CYP Enzymaktivität 20
1.4 DNA-Addukte von *N*-Nitrosaminen 21
1.4.1 NDMA 22
1.4.2 NDELA 22
1.4.3 NNN 24
1.4.4 NMA 26
1.5 Von MMS, CPA und TMZ gebildete DNA-Addukte 26
1.6 DNA-Schadensantwort nach Alkylierungsschäden 27
1.6.1 Phosphatidylinositol 3-Kinasen ähnliche Kinasen ATM, ATR und DNA PKs 29
1.6.2 Die ATM vermittelte DNA-Schadensantwort bei Doppelstrangbrüchen 30
1.6.3 Die ATR vermittelte DNA-Schadensantwort bei DNA-Einzelsträngen und Replikationsstress 33
1.6.4 DNA-PK vermittelte DNA-Schadensantwort bei Doppelstrangbrüchen 35
1.7 Reparatur von DNA-Alkylierungsschäden 38
1.7.1 O^6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase 39

1.7.2 Basenfehlpaarungsreparatur 41
1.7.3 Basen-Exzisionsreparatur 44
1.7.4 Nukleotid-Exzisionsreparatur 45
1.7.5 Reparatur über die ALKBH Familie 49
1.8 Mutagenität und Kanzerogenität von *N*-Nitrosaminen: aktueller Stand der Forschung .. 50
1.8.1 NDMA 51
1.8.2 NDELA 52
1.8.3 NNN 54
1.8.4 NMA 56
1.9 Risikobewertung von DNA-reaktiven *N*-Nitrosaminen in Arzneimitteln nach ICH M7 57
1.9.1 Karzinogene *N*-Nitrosamine 57
1.9.2 *N*-Nitrosamine mit unbekanntem mutagenem und karzinogenem Potential 58
1.9.3 Nicht karzinogene *N*-Nitrosamine 66
1.10 Risikobewertung von *N*-Nitrosaminen in Lebensmitteln 67
1.11 Leberzellmodelle zur Untersuchung von *N*-Nitrosaminen 71
1.11.1 Primäre Rattenhepatozyten 71
1.11.2 HepG2 75
2. Zielsetzung 80
3. Material und Methoden 83
3.1 Allgemeine Laborgeräte 83
3.2 Testsubstanzen 83
3.3 Primäre Rattenhepatozyten 85
3.3.1 *In-situ* Perfusion 85
3.3.2 Zellaussaat und Behandlung 88
3.3.3 Einfrieren und Auftauen 89
3.4 Zellkultur 89
3.5 Untersuchungen der metabolischen Kompetenz mittels LC-MS 91
3.6 Resazurin-Reduktions-Assay 93
3.7 Western-Blot 95
3.7.1 Zellernte 96
3.7.2 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 96
3.7.3 Western Blot und Immundetektion 98
3.8 Comet Assay 103
3.9 BMD Modelling der mittels Comet Assay erhobenen Daten 106
3.10 Untersuchung des zeitabhängigen Anstiegs von O^6- Methylguanin und N7-Methylguanin in PRH 108

3.10.1 Isolierung genomischer DNA mittels Phenol-Chloroform Extraktion..... 108
3.10.2 Messung des zeitabhängigen Anstiegs von O^6-MeG und N7-MeG mittels LC-MS..... 110
3.11 Mikrokern Assay..... 110
4. Ergebnisse..... 112
4.1 Untersuchungen der metabolischen Kompetenz in frisch isolierten PRH und in kryokonservierten PRH mittels LC-MS..... 112
4.2 Untersuchung der Zytotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in PRH mittels Zellviabilitätstest..... 114
4.2.1 Effekt von CPA..... 114
4.2.2 Effekt von MMS..... 116
4.2.3 Effekte von NDMA und NDELA..... 117
4.2.4 Effekte von NMtBu und NMIPA..... 117
4.2.5 Effekte von NNN und S-NNN..... 118
4.2.6 Effekt von NPro..... 119
4.2.7 Effekt von NMA..... 120
4.2.8 Effekt von NFA..... 121
4.2.9 Effekt von NND..... 122
4.2.10 Effekt von NFluo..... 123
4.2.11 Effekt von Fluo..... 123
4.2.12 Zusammenfassung der Zytotoxizitätsdaten in PRH nach Behandlung mit strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen..... 124
4.3 Untersuchung der Genotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in PRH mittels Comet Assay..... 126
4.3.1 Effekte von NDMA und NDELA..... 126
4.3.2 Effekte von NMtBu und NMIPA..... 127
4.3.3 Effekte von NNN und S-NNN..... 128
4.3.4 Effekte von NPro und NMA..... 129
4.3.5 Effekte von NFA und NND..... 130
4.3.6 Effekte von NFluo und Fluo..... 132
4.3.7 Zusammenfassung der Comet Assay Daten in PRH nach Behandlung mit strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen..... 133
4.3.8 BMD Modelling der mittels Comet Assay erhobenen Daten..... 134
4.3.9 Vergleich des Comet Assays mit dem Ames Test hinsichtlich der Prädiktivität der Vorhersage des genotoxischen und mutagenen Potentials strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine..... 137
4.4 Untersuchung der DNA-Reparaturmechanismen in PRH..... 139
4.4.1 Messung der Genotoxizität nach Behandlung mit NDMA, NFluo, NBH und NNT vor und nach Erholungszeit mittels Comet Assay..... 139
4.4.2 Untersuchung des zeitabhängigen Anstiegs von O^6-MeG und N7-MeG und Einfluss der MGMT in PRH nach Behandlung mit NDMA mittels LC-MS..... 142

4.5 Untersuchungen der metabolischen Kompetenz in HepG2 mittels LC-MS..... 146
4.6 Untersuchung der Zytotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 mittels Zellviabilitätstest..... 147
4.6.1 HepG2, HepG2-CYP3A4 und HepG2-CYP1A2 Zellen nach Behandlung mit CPA 147
4.6.2 HepG2 und HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit MMS..... 148
4.6.3 HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit MMS..... 149
4.6.4 HepG2 Zellen nach Behandlung mit NDMA..... 150
4.6.5 HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit NDMA..... 151
4.6.6 HepG2-CYP1A2 Zellen nach Behandlung mit NDMA..... 152
4.6.7 HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NDMA..... 152
4.6.8 HepG2 Zellen nach Behandlung mit NDELA..... 153
4.6.9 HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit NDELA..... 154
4.6.10 HepG2-CYP1A2 Zellen nach Behandlung mit NDELA..... 154
4.6.11 HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NDELA..... 155
4.6.12 HepG2 Zellen nach Behandlung mit S-NNN..... 156
4.6.13 HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit S-NNN..... 156
4.6.14 HepG2-CYP1A2 Zellen nach Behandlung mit S-NNN..... 157
4.6.15 HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit S-NNN..... 158
4.6.16 Zusammenfassung der Zytotoxizitätsdaten in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 nach Behandlung mit strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen..... 159
4.7 Untersuchung der Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 nach Behandlung mit strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen mittels Western-Blot..... 160
4.7.1 HepG2 Zellen nach Behandlung mit NDMA..... 160
4.7.2 HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit NDMA..... 161
4.7.3 HepG2-CYP1A2 Zellen nach Behandlung mit NDMA..... 162
4.7.4 HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NDMA..... 162
4.7.5 HepG2-Zellen nach Behandlung mit NDELA..... 163
4.7.6 HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit NDELA..... 164
4.7.7 HepG2-CYP1A2 Zellen nach Behandlung mit NDELA..... 165
4.7.8 HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NDELA..... 166
4.7.9 HepG2-Zellen nach Behandlung mit S-NNN..... 167
4.7.10 HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit S-NNN..... 168
4.7.11 HepG2-CYP1A2 Zellen nach Behandlung mit S-NNN..... 169
4.7.12 HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit S-NNN..... 170
4.7.13 Zusammenfassung der Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 nach Behandlung mit strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen..... 171

4.8 Untersuchung der Genotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 mittels Comet Assay 172
4.8.1 HepG2 und HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit NDMA 172
4.8.2 HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NDMA 174
4.8.3 HepG2 und HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit NDELA 175
4.8.4 HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NDELA 176
4.8.5 HepG2 und HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit S-NNN 178
4.8.6 HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit S-NNN 179
4.8.7 HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NMA und H_2O_2 Nachbehandlung 180
4.8.8 HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NDELA und H_2O_2 Nachbehandlung 181
4.8.9 Zusammenfassung der Comet Assay Daten in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 nach Behandlung mit strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen 182
4.9 Vergleichende Untersuchung der Genotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in HepG2 und in HepG2-CYP2E1 Zellen und Einfluss der MGMT mittels Comet Assay 183
4.9.1 Effekt von NDMA 183
4.9.2 Effekte von NDELA und NMA 185
4.9.3 Zusammenfassung der Comet Assay Daten in HepG2 und in HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen 189
4.10 Vergleichende Untersuchung der Genotoxizität von NDMA in HepG2 und in HepG2-CYP2E1 Zellen mittels Mikrokern Assay 190
5. Diskussion 192
5.1 Untersuchungen der Metabolischen Kompetenz in frisch isolierten und in kryokonservierten PRH mittels LC-MS 192
5.2 Untersuchung der Zytotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in PRH mittels Zellviabilitätstest 197
5.2.1 Effekt von CPA 197
5.2.2 Effekt von MMS 199
5.2.3 Effekte von NDMA und NDELA 201
5.2.4 Effekte von NMtBu und NMIPA 203
5.2.5 Effekte von NNN und S-NNN 205
5.2.6 Effekt von NPro 207
5.2.7 Effekt von NMA 208
5.2.8 Effekt von NFA 209
5.2.9 Effekt von NND 210
5.2.10 Effekt von NFluo 212
5.2.11 Effekt von Fluo 213
5.3 Untersuchung der Genotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in PRH mittels Comet Assay 214

5.3.1 Effekte von NDMA und NDELA..... 214
5.3.2 Effekte von NMtBu und NMIPA..... 216
5.3.3 Effekte von NNN und S-NNN..... 218
5.3.4 Effekte von NPro und NMA..... 220
5.3.5 Effekte von NFA und NND..... 222
5.3.6 Effekte von NFluo und Fluo..... 224
5.3.7 BMD Modelling der mittels Comet Assay erhobenen Daten..... 225
5.3.8 Vergleich des Comet Assays mit dem Ames Test hinsichtlich der Prädiktivität der Vorhersage des genotoxischen und mutagenen Potentials strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine..... 229
5.4 Untersuchung der DNA-Reparaturmechanismen in PRH..... 230
5.4.1 Messung der Genotoxizität nach Behandlung mit NDMA, NFluo, NBH und NNT vor und nach Erholungszeit mittels Comet Assay..... 230
5.4.2 Untersuchung des zeitabhängigen Anstiegs von O^6-MeG und N7-MeG und Einfluss der MGMT in PRH mittels Comet Assay..... 235
5.5 Untersuchungen der Metabolischen Kompetenz in HepG2 mittels LC-MS..... 238
5.6 Untersuchung der Zytotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 mittels Zellviabilitätstest..... 240
5.6.1 Effekt von CPA..... 240
5.6.2 Effekt von MMS..... 243
5.6.3 Effekt von NDMA..... 245
5.6.4 Effekt von NDELA..... 246
5.6.5 Effekt von S-NNN..... 247
5.7 Untersuchung der Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 nach Behandlung mit strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen mittels Western-Blot..... 249
5.7.1 Effekt von NDMA..... 249
5.7.2 Effekt von NDELA..... 250
5.7.3 Effekt von S-NNN..... 251
5.8 Untersuchung der Genotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in HepG2,HepG2-CYP3A4,HepG2CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 mittels Comet Assay..... 252
5.8.1 Effekt von NDMA..... 252
5.8.2 Effekt von NDELA..... 254
5.8.3 Effekt von S-NNN..... 255
5.8.4 Effekt von NMA in mit H_2O_2 nachbehandelten HepG2-CYP2E1 Zellen..... 256
5.8.5 Effekt von NDELA in mit H_2O_2 nachbehandelten HepG2-CYP2E1 Zellen..... 257
5.9 Vergleichende Untersuchung der Genotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in HepG2 und in HepG2-CYP2E1 und Einfluss der MGMT mittels Comet Assay. 257
5.9.1 Effekt von NDMA..... 257

5.9.2 Effekte von NDELA und NMA..... 260
5.10 Vergleichende Untersuchung der Genotoxizität von NDMA in HepG2 und in HepG2-CYP2E1 mittels Mikrokern Assay..... 262
6. Fazit..... 264
7. Ausblick..... 265
Literaturverzeichnis..... 267
Anhang..... 316
Danksagung..... 318
Lebenslauf..... 320
Publikationsliste..... 322
Kongressteilnahme..... 324

Erklärungen

Hiermit erkläre ich, Christina Marie Felske, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zur Zytotoxizität und Genotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in Leberzellmodellen“ selbstständig verfasst und dabei nur die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Bestandteile dieser Arbeit wurden während der Promotion bereits vor Erstellung der Dissertation veröffentlicht (siehe Publikationsliste, siehe Kongressteilnahme). Die vorliegende Dissertation habe ich weder im Ganzen noch in Teilen als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht und kein anderes Promotionsverfahren bei einer Hochschule beantragt oder veröffentlicht. Die geltende Promotionsordnung des Fachbereiches Chemie vom 10.12.2019 ist mir bekannt.

Kaiserslautern, den _____

Christina Marie Felske

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v) ..... Volumenprozent

O^6-pobG ..... O^6-[4-oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanin

°C. ..... Grad Celsius

µg. ..... Mikrogramm

53BP1 ..... *tumor suppressor p53-binding protein 1*

A ..... Adenin

AI ..... *acceptable intake*, akzeptable Aufnahmemenge

AAD ..... ATR Aktivierungsdomäne

AAG ..... Alkyladenin-DNA-Methyltransferase

ALKBH ..... *alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog*

$AmNO_2$ ..... Amylnitrit

AOM ..... Azoxymethan

Apaf ..... *apoptotic protease activating factor 1*

APE1 ..... AP-Endonuklease 1

AT1 ..... Angiotensin I

ATM ..... *ataxia telangiectasia mutated*

ATP ..... Adenosin Triphosphat

ATR ..... *ataxia telangiectasia and RAD3 related*

ATRIP ..... *ATR-interacting protein*

BAX ..... *BCl2-associated X protein*

BER ..... Basenexzisionsreparatur

BfArM ..... Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte

BMD ..... *benchmark dose,* Schwellenwert Dosis

BRCA1 ..... *breast and ovarian cancer susceptibility gene 1*

BROD ..... Benzoxyresorufin-O-Dealkylase

BSA ..... Bovines Serum Albumin

Ca^{2+} ..... Calcium

cdc25A ..... *cell division cycle 25 a*

cdc25B ..... *cell division cycle 25b*

cdc25C ..... *cell division cycle 25 c*

CDKN1A ..... *cyclin dependent kinase inhibitor 1A*

CHK1 ..... Checkpoint-Kinase 1

CHK2 ..... Checkpoint-Kinase 2

CO_2 ..... *carbon dioxide*, Kohlendioxid

CoC ..... *cohort of concern*

CPA ..... Cyclophosphamid

CPDB..... *Carcinogenic Potency Database*

CRISPR .....*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

CSA ..... Cockayne's Syndrom A

CSB ..... Cockayne's Syndrom B

CYP450 ..... Cytochrom P450

Cys145.....Cystein 145

DDB1 .....*DNA damage-binding protein 1*

ddH_2O.....doppelt destilliertes H_2O

DMEM ..... *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO ..... Dimethylsulfoxid

DNA ..... Desoxyribonukleinsäure

DNA-PK..... *DNA-dependent protein kinase*

dsDNA ..... *double-stranded DNA*, doppelsträngige DNA

EGTA..... Ethylenglycolbis(aminoethylether)-N,N,N,N'-tetraessigsäure

EMA ..... *European Medicines Agency*

EPHX1..... Epoxid Hydrolase

EROD .....Ethoxyresorufin-O-Dealkylase

ETAA1 ..... Ewing Tumorassoziiertes Antigen1

et al.....*et alii,* und andere

EtOH.....Ethanol

EXO1.....Exonuklease 1

FAD..... Flavin Adenin Dinukleotid

FAT ..... *transformation-transcription domain associated protein*

FEN1.....FLAP-Endonuklease 1

FKS ..... Fetales Kälberserum

FMN.....Flavinmononukleotid

FTO.....*fat mass and obesity-associated protein*

g..... Gramm

GGR.....globale genomische Reparatur

GST.....Glutathion-S-Transferase

GSTM1 .....Glutathion S-Transferase M1

GTF2H1-H4 .....*general transcription factor IIH subunit H1-4*

h.. ..... *hora*, Stunde

H2AX..... Histone 2A family member X

HBSS ..... Hanks Balanced Salt Solution

HEPES.....2-(4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazinyl-)ethansulfonsäure

HG ..... *high glucose*

HPB 4-hydroxy-1-3-pyridyl-1-butanon

HPB-dAdo ..... N^6-[4-hydroxy-1-(pyridine-3-yl)butyl]-2'deoxyadenosin

HR ..... Homologe Rekombination

IARC ..... *International Agency for Research on Cancer*

K_{cat} ..... katalytische Aktivität

KCl ..... Kaliumchlorid

kDa ..... Kilodalton

kg ..... Kilogramm

KH_2PO_4 ..... Kaliumdihydrogenphosphat

K_m ..... Michaelis-Menten-Konstante

LCDB ..... *Lhasa Carcinogenicity Database*

LC-MS *Liquid chromatography-mass spectrometry*, Flüssigchromatographie-gekoppelte-Massenspektrometrie .....

MDC1 ..... *mediator of DNA damage checkpoint protein 1*

mg ..... Milligramm

$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ ..... Magnesiumchlorid Hexahydrat

MITC ..... Methyltriazenoimidazol Carboxyamid

mL ..... Milliliter

MMC ..... Mitomycin C

mmol ..... Millimol

MMR ..... *mismatch repair,* Basenfehlpaarungsreparatur

MMS ..... Methylmethansulfonat

Mre11 ..... *meiotic recombination 11*

N1-MeA N1-Methyladenin

N3-MeA N3-Methyladenin

N3-MeC N3-Methylcytosin

N3-MeT N3-Methylthymin

N7-MeG N7-Methylguanin

$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ ..... Dinatriumhydrogen-Monophosphat

NAB ..... N-Nitrosoanabasin

NaCl ..... Natriumchlorid

NAD ..... Nikotinamid Adenin Dinukleotid

NADP ..... Nikotinamidadenindinukleotidphosphat

NAT ..... N-Nitrosoanatabin

NBS1 ..... Nijmegen-Breakage-Syndrom
NDELA ..... *N*-Nitrosodiethanolamin
NDMA ..... *N*-Nitrosodimethylamin
NDSRI ..... *N-Nitrosamine drug substance-related impurities*
NER ..... Nukleotid-Exzisionsreparatur
NFA ..... *N*-Nitrosofolsäure
NFluo ..... *N*-Nitrosofluoxetin
NHEJ ..... *non-homologous end joining*, Nicht Homologe End-zu-End Verknüpfung,
NMA ..... *N*-Nitrosomethylanilin
NMIPA ..... *N*-Methyl-*N*-Nitroso-iso-propylamin
nmol ..... Nanomol
NMtBu ..... *N*-Methyl-*N*-Nitroso-tert-butylnitrosamin
NMU ..... *N*-Nitroso-*N*-Methylurea
NNAL ..... 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol,
NND ..... *N*-Nitrosodesloratadin
NNK ..... 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NNKOAc ..... 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol
NNN ..... *N'*-Nitrosonornikotin
NO ..... Stickstoffmonoxid
NOCs ..... *N-nitroso compounds*, N-Nitrosoverbindungen
NPro ..... *N*-Nitrosoprolin
NPYR ..... *N*-Nitrosopyrrolidin
NQO1 ..... NAD(P)H Dehydrogenase (Quinone 1)
NTCA *N*-Nitrosothiazolidin-4-carbonsäure
O^4-MeG ..... O^4-Methylguanin
O^6-ClEtG ..... O^6-chloroethylguanin
O^6-MeG ..... O^6-Methylguanin
OECD ..... *Organisation for Economic Co-operation and Development,* Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung.....
OECD TG 489 ..... Organisation for Economic Co-operation and Development Test Guideline 489
PATH ..... *assessment of smokeless tobacco use and oral cancer: A systematic review*
PBS ..... *phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA ..... *proliferating-cell-nuclear-antigen*
Pen ..... Penicillin
PIKKs ..... Phosphatidylinositol 3-Kinasen ähnlichen Kinasen
Pol β ..... Polymerase β
Pol δ ..... Polymerase δ
Pol ε ..... Polymerase ε

PRH ..... Primäre Ratten Hepatozyten
PROD ..... Pentoxyresorufin-O-Dealkylase
Puma ..... *p53 upregulated modulator of apoptosis*
Py-Py(OH)-dN ..... 6-[2-(3-pyridyl)-N-pyrrolidinyl-5-hydroxy]-2'deoxynebularin
Py-Py-dI ..... 2-2-(3-pyridyl)-N-pyrrolidinyl]-2'deoxyinosin
Py-Py-dN ..... 6-[2-(3-pyridyl)-N-pyrrolidinyl]-2'deoxxynebularin
qRT-PCR ..... real-time quantitative polymerase chain reaction
QSAR ..... *quantitative structure-activity relationship*, Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehung
RHINO ..... RAD9-RAD1-HUS1 interagierender Komplex
RNAPII ..... RNA Polymerase II
ROS ..... Reaktive Sauerstoffspezies
RPA ..... *replication protein 1*
rpm ..... *rounds per minute*, Umdrehungen pro Minute
S9 ..... *supernatant 9000,* Überstand der Zentrifugation bei 9000 g
SAM ..... *S*-Adenosyl-*L* -Methionin
Ser15 ..... Serin 15
Ser1981 ..... Serin 1981
Ser20 ..... Serin 20
Ser2056 ..... Serin 2056
S_N1 ..... nukleophile Substitution erster Ordnung
S_N2 ..... nukleophile Substitution zweiter Ordnung
Sp1 ..... *specificity protein 1*
$_{SS}$DNA ..... *single-stranded DNA*, einzelsträngige DNA
Strep ..... Streptomycin
SULT ..... Sulfotransferase
T ..... Thymin
TCR ..... *transcription coupled repair*, Transkriptions-gekoppelte Nukleotid-Exzisionsreparatur
TFIIH ..... Transkriptionsfaktor IIH
Thr1989 ..... Threonin 1989
TMZ ..... Temozolomid
TopBP1 ..... *DNA topoisomerase 2-binding protein 1*
TTC ..... *Threshold of Toxicological Concern*
UDP ..... Uridindiphosphat
UGT ..... UDP-Glucoronosyltransferase
UGT1A6 ..... UDP-Glykosyltransferase 1A6
VDJ ..... *variable-diversity-joining rearrangement*
WHO ..... *World Health Organization*
XLF ..... *XRCC4-like Facto*

XPB ..... *xeroderma pigmentosum group B*
XPD ..... *xeroderma pigmentosum group*
XPG ..... XPG endonuklease
XRCC4 ..... *X-Ray Repair Cross Complementing 4*
γH2AX ..... phosphoryliertes Histon H2AX
α-KG ..... α-Ketoglutarat
εA ..... 1, N^6-Ethenoadenin
εC ..... 3, N^4-Ethenocytosin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allgemeine Struktur von *N*-Nitrosaminen und *N*-Nitrosamiden 1
Abbildung 2: Entstehung von Alkylnitrosaminen aus Aminosäuren im Gastrointestinaltrakt 3
Abbildung 3: Chemische Struktur einfach konfigurierter *N*-Nitrosamine 4
Abbildung 4: Chemische Struktur sperriger *N*-Nitrosamine 4
Abbildung 5: Chemische Struktur von Nitrosamin Drug Substance-Related Impurities (NDSRIs) 4
Abbildung 6: Nitrosaminentstehung während der Synthese des Tetrazolringes von Losartan. Beispielhafter Syntheseweg 6
Abbildung 7: Hydroxylierung am α-C-Atom von Dialkylnitrosaminen und anschließende Alkylierung der DNA via S_N2 oder S_N1 10
Abbildung 8: Hydroxylierung am β-C-Atom von Dialkylnitrosaminen 11
Abbildung 9: Oxidation am β-C-Atom und anschließender Zerfall von *N*-Nitrosodipropylamin 12
Abbildung 10: Tandem ω-Oxidation-Knoop-Typ β-Oxidation von geradkettigen *N*-Nitrosomethylalkylnitrosaminen zu *N*-Nitrosomethyl-3-carboxypropylamin 13
Abbildung 11: Metabolische Aktivierung von NDMA 22
Abbildung 12: Metabolische Aktivierung von NDELA 23
Abbildung 13: Metabolische Aktivierung von NNN 25
Abbildung 14: Durch alkylierende Agenzien induzierte DNA-Schäden und involvierte DNA-Reparaturwege 28
Abbildung 15: Struktureller Aufbau der Phosphatidylinositol 3-Kinasen ähnlichen Kinasen (PIKKs): ATM 30
Abbildung 16: ATM Aktivierung nach Doppelstrangbrüchen. Überblick aller beteiligten Proteine der Signaltransduktionskaskade 32

Abbildung 17: An der Aktivierung von ATR beteiligte Proteine und nachfolgende Phosphorylierung von CHK1 33
Abbildung 18: Nicht Homologe End-zu-End Verknüpfung und beteiligte Proteine (NHEJ)..... 37
Abbildung 19: Reparatur von O^6-Methylguanin-Addukten durch die O^6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase und anschließender proteosomaler Abbau 41
Abbildung 20: Mechanismus der Basenfehlpaarungsreparatur (MMR)..... 42
Abbildung 21: Biologische Konsequenzen nicht reparierter O^6-Methylguanin-Addukte..... 43
Abbildung 22: Basen-Exzisionsreparatur (BER) von DNA-Addukten wie N7-MeG und N3-MeA... 45
Abbildung 23: Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) von sperrigen DNA-Alkylläsionen..... 48
Abbildung 24: Formel zur Berechnung akzeptabler Aufnahmemengen..... 59
Abbildung 25: Flussdiagramm zur Vorhersage der Potency Kategorie eines *N*-Nitrosamins..... 63
Abbildung 26: Formel zur Berechnung des Potency Scores nach dem CPCA Ansatz..... 63
Abbildung 27: Bildungsweg von *N*-Nitrosaminen in Lebensmitteln..... 67
Abbildung 28: Formel zur Berechnung des Margin of Exposure (MoE)..... 68
Abbildung 29: Formel zur Berechnung des Stoffwechselverhältnisses in %..... 92
Abbildung 30: Reduktion von Resazurin zu Resorufin unter Verbrauch von NADH..... 94
Abbildung 31: Formel zur Berechnung der Sensitivität und Spezifität der Zellmodelle..... 107
Abbildung 32: Formel zur Berechnung der Probenabsorption nach Lambert-Beer 108
Abbildung 33: Formel zur Berechnung der Anzahl an DNA-Addukten/10^8 Nukleoside 110
Abbildung 34: Stoffwechselverhältnis der verschiedenen Cytochrom-P450-Enzyme in PRH.... 113
Abbildung 35: Effekt von CPA auf die Zellviabilität in PRH. 115
Abbildung 36: Effekt von MMS auf die Zellviabilität in PRH 116
Abbildung 37: Effekt von NDMA und NDELA auf die Zellviabilität in PRH..... 117
Abbildung 38: Effekt von NMtBu und NMIPA auf die Zellviabilität in PRH 118
Abbildung 39: Effekt von NNN und S-NNN auf die Zellviabilität in PRH 119
Abbildung 40: Effekt von NPro auf die Zellviabilität in PRH..... 120
Abbildung 41: Effekt von NMA auf die Zellviabilität in PRH 121
Abbildung 42: Effekt von NFA auf die Zellviabilität in PRH. 121
Abbildung 43: Effekt von NND auf die Zellviabilität in PRH. 122
Abbildung 44: Effekt von NFluo auf die Zellviabilität in PRH 123
Abbildung 45: Effekt von Fluo auf die Zellviabilität in PRH..... 124
Abbildung 46: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDMA und NDELA in PRH 127
Abbildung 47: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NMtBu und NMIPA in PRH..... ..128

Abbildung 48: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NNN und S-NNN in PRH 129
Abbildung 49: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NPro und NMA in PRH 130
Abbildung 50: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NFA und NND in PRH..... 131
Abbildung 51: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NFluo und Fluo in PRH..... 132
Abbildung 52: BMD Modellierung der positiv getesteten *N*-Nitrosamine..... 137
Abbildung 53: Effekt von NDMA, NBH und NNT auf die Zellviabilität in PRH..... 139
Abbildung 54: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDMA, NBH, NFluo und NNT in PRH nach 2 h..... 140
Abbildung 55: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDMA, NBH, NFluo und NNT in PRH nach 2 h + 24 h 141
Abbildung 56: O^6-MeG-Addukte in PRH nach Behandlung mit NDMA..... 142
Abbildung 57: N7-MeG-Addukte in PRH nach Behandlung mit NDMA..... 144
Abbildung 58: Stoffwechselverhältnis der verschiedenen Cytochrom-P450-Enzyme in HepG2 Zellen. 147
Abbildung 59: Zellviabilität in HepG2 Zellen nach Behandlung mit CPA 148
Abbildung 60: Effekt von MMS auf die Zellviabilität in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP3A4 Zellen. 149
Abbildung 61: Effekt von MMS auf die Zellviabilität in HepG2-CYP1A2 Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen..... 150
Abbildung 62: Effekt von NDMA auf die Zellviabilität in HepG2 Zellen 151
Abbildung 63: Effekt von NDMA auf die Zellviabilität in HepG2-CYP3A4 Zellen 151
Abbildung 64: Effekt von NDMA auf die Zellviabilität in HepG2-CYP1A2 Zellen 152
Abbildung 65: Effekt von NDMA auf die Zellviabilität in HepG2-CYP2E1 Zellen 153
Abbildung 66: Effekt von NDELA auf die Zellviabilität in HepG2 Zellen..... 153
Abbildung 67: Effekt von NDELA auf die Zellviabilität in HepG2-CYP3A4 Zellen 154
Abbildung 68: Effekt von NDELA auf die Zellviabilität in HepG2-CYP1A2 Zellen 155
Abbildung 69: Effekt von NDELA auf die Zellviabilität in HepG2-CYP2E1 Zellen 155
Abbildung 70: Effekt von S-NNN auf die Zellviabilität in HepG2 Zellen..... 156
Abbildung 71: Effekt von S-NNN auf die Zellviabilität in HepG2-CYP3A4 Zellen 157
Abbildung 72: Effekt von S-NNN auf die Zellviabilität in HepG2-CYP1A2 Zellen 157
Abbildung 73: Effekt von S-NNN auf die Zellviabilität in HepG2-CYP2E1 Zellen 158
Abbildung 74: Effekt von NDMA auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2 Zellen 160
Abbildung 75: Effekt von NDMA auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP3A4 Zellen 161

Abbildung 76: Effekt von NDMA auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP1A2 Zellen 162
Abbildung 77: Effekt von NDMA auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP2E1 Zellen 163
Abbildung 78: Effekt von NDELA auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2 Zellen 164
Abbildung 79: Effekt von NDELA auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP3A4 Zellen 165
Abbildung 80: Effekt von NDELA auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP1A2 Zellen 166
Abbildung 81: Effekt von NDELA auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP2E1 Zellen 167
Abbildung 82: Effekt von S-NNN auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2 Zellen 168
Abbildung 83: Effekt von S-NNN auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP3A4 Zellen 169
Abbildung 84: Effekt von S-NNN auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP1A2 Zellen 170
Abbildung 85: Effekt von S-NNN auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP2E1 Zellen 171
Abbildung 86: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDMA in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP3A4 Zellen 173
Abbildung 87: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDMA in HepG2-CYP1A2 Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen 174
Abbildung 88: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDELA in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP3A4 Zellen 176
Abbildung 89: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDELA in HepG2-CYP1A2 Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen 177
Abbildung 90: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von S-NNN in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP3A4 Zellen 178
Abbildung 91: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von S-NNN in HepG2-CYP1A2 Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen 179
Abbildung 92: DNA-quervernetzende Wirkung von NMA in HepG2-CYP2E1 Zellen 180
Abbildung 93: DNA-quervernetzende Wirkung von NDELA in HepG2-CYP2E1 Zellen 181
Abbildung 94: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDMA in HepG2-Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen und Einfluss der MGMT 184

Abbildung 95: Effekt von NDELA auf die Zellviabilität in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen 185
Abbildung 96: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDELA und NMA in HepG2 Zellen und in HepG2 CYP2E1 Zellen 186
Abbildung 97: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDELA und NMA in HepG2 Zellen und in HepG2 CYP2E1 Zellen und Einfluss der MGMT 187
Abbildung 98: Mikrokern-induzierender Effekt von NDMA in HepG2 Zellen und in HepG2- CYP2E1 Zellen 191

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Relevante Isoformen der CYP Enzyme und Hauptsubstrate 15
Tabelle 2: Daten zu Mutagenität und Kanzerogenität der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *N*-Nitrosamine 50
Tabelle 3: Allgemeine Laborgeräte 83
Tabelle 4: Verwendete Testsubstanzen 84
Tabelle 5: Reagenzien für die *in situ* Perfusion 86
Tabelle 6: Materialien für die *in situ* Perfusion 87
Tabelle 7: Zellkulturschalenformate, Zellzahlen, Volumina Kultivierungsmedium und Inkubationszeiten für Versuche in PRH 88
Tabelle 8: Reagenzien für die Kultivierung der HepG2 Zellen 90
Tabelle 9: Zellkulturschalenformate, Zellzahlen, Volumina Kultivierungsmedium und Inkubationszeiten für Versuche in HepG2 Zellen 91
Tabelle 10: Zusammensetzung der Substratlösungen zur Testung der metabolischen Kompetenz in PRH 93
Tabelle 11: Zusammensetzung der Substratlösungen zur Testung der metabolischen Kompetenz in den HepG2 Zelllinien HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 93
Tabelle 12: Reagenzien und Geräte für den Zellviabilitätstest 94
Tabelle 13: Zusammensetzung Sammelgel und Trenngel für die SDS-PAGE 97
Tabelle 14: Geräte und Materialien für den Western Blot 99
Tabelle 15: Reagenzien für den Western Blot 100
Tabelle 16: Verwendete Antikörper für den Western Blot 103
Tabelle 17: Verwendete Puffer für den Comet Assay 105
Tabelle 18: Zusammensetzung der für die Phenol-Chloroform Extraktion verwendeten Lösungen 109
Tabelle 19: Nach mathematischer Modellierung erhaltene EC_{50}-Werte in PRH 124

Tabelle 20: Maximale medianbasierte Schweifintensitätsunterschiede in PRH 133

Tabelle 21: BMD Konfidenzintervalle (BMD CIs) BMDl, BMDu und BMDmedian in PRH 134

Tabelle 22: Nach mathematischer Modellierung erhaltene EC_{50} Werte in HepG2 Zellen..... 159

Tabelle 23: Zusammenfassung der mit Western Blot erhobenen Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2 Zellen..... 171

Tabelle 24: Maximale medianbasierte Schweifintensitätsunterschiede in HepG2 Zellen..... 182

Tabelle 25: Maximale medianbasierte Schweifintensitätsunterschiede in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen..... 189

1. Einleitung

1.1 Bildung und chemische Eigenschaften von *N*-Nitrosaminen

Alkylierungen der DNA zählen zu den mit am häufigsten vorkommenden Schäden und können sowohl durch verschiedene endogene Substanzen, als auch durch exogene Verbindungen wie Umweltkarzinogene oder Zytostatika induziert werden (Fahrer *et al.*, 2023). Der Gruppe der alkylierenden Spezies sind beispielsweise Alkylnitrosamine und Alkylnitrosamide zugehörig, die man neben weiteren Substanzen zur Gruppe der *N*-Nitrosoverbindungen (NOCs) zusammenfasst (Dietrich *et al.*, 2005). Alkylierende und genotoxische Eigenschaften von Alkylnitrosaminen setzen die metabolische Aktivierung vorraus, während Alkynitrosamide in wässriger Umgebung spontan zerfallen und Diazoniumionen sowie Carbeniumionen als alkylierende Spezies bilden (Fahrer *et al.*, 2023). Zugehörige allgemeine Strukturen von *N*-Nitrosaminen und *N*-Nitrosamiden sind in Abbildung 1 dargestellt.

N-Nitrosamine	*N*-Nitrosamide
$R^1R^2N\text{-}N{=}O$	$R^1C(=O)N(\text{-}R^2)\text{-}N{=}O$
R^1,R^2 = Alkyl, Aryl	R^1,R^2 = H-Atom, organischer Rest

Abbildung 1: Allgemeine Struktur von N-Nitrosaminen und N-Nitrosamiden. Modifiziert nach Fahrer *et al.*, 2023. Erstellt mit ChemSketch.

Alkylnitrosamine und Alkylnitrosamide können im Magen endogen durch eine säurekatalysierte Reaktion entstehen (Fahrer *et al.*, 2017; Lundberg *et al.*, 2013; Fahrer *et al.*, 2013). Zudem können Bakterien im Dünndarm die Entstehung von Nitrosaminen begünstigen (Bingham *et al.*, 1996). In diesem Zusammenhang werden die über die Nahrung aufgenommenen Aminosäuren zu Alkylaminen decarboxyliert, die im Anschluss unter Anwesenheit nitrosierender Agenzien zu Alkylnitrosaminen reagieren können (s. Abb.1, Bingham *et al.*, 1996). Diese Art der Reaktion wird insbesondere in Anwesenheit von Hämeisen sowie Stickstoffmonoxid (NO) unter inflammatorischen Bedingungen begünstigt (Lundberg *et al.*, 2013). Hämeisen in Form der prosthetischen Gruppe von Myoglobin kommt insbesondere in rotem Fleisch vor und kann die Entstehung von nitrosierenden Substanzen fördern. Neben rotem Fleisch trägt insbesondere prozessiertes Fleisch, zu welchem neben rotem Fleisch weißes Fleisch und

Fleischnebenprodukte wie Blut zählt, zur Entstehung von Tumoren durch Bildung von NOCs bei (Norat *et al.*, 2005). Dieses entsteht durch Räuchern, Härtung, Salzen oder Erhitzen (Sugimura, 2000; Fahrer *et al.*, 2017; Lundberg *et al.*, 2013; Fahrer *et al.*, 2013). Organisches Eisen scheint im Vergleich zu anorganischem Eisen die Nitrosierungreaktion zu begünstigen, wobei in diesem Zusammenhang angenommen wird, dass Nitrosyl-Hämoglobin das nitrosierende Agenz ist (Cross *et al.*, 2003; Lunn *et al.*, 2007). Neben Aminosären zählen auch Gallensäurenkonjugate zum Substratspektrum der enzymatisch katalysierten Nitrosierungsreaktion (Busby *et al.*, 1985). In einer Studie von Rydberg *et al.* konnte der intrazelluläre Methylgruppendonor *S*-Adenosyl-*L*-Methionin (SAM) als weitere endogene Quelle für nicht enzymatisch katalysierte Alkylierungsreaktionen identifiziert werden (Rydberg *et al.*, 1982). Den größten Anteil der in der Umwelt vorkommenden alkylierenden Substanzen haben Nitrosamine, während Nitrosamide hauptsächlich in der Grundlagenforschung sowie in der Herstellung von Arzneimitteln verwendet werden (Fahrer *et al.*, 2023). Nitrosamine findet man vor allem in Tabakrauch, Arzneimitteln, Trinkwasser, Lebensmitteln sowie Kosmetikprodukten (Fahrer *et al.*, 2023). Die chemische Gruppe der Nitrosamide umfasst *N*-Nitrosoharnstoffe, *N*-Nitrosocarbamate und *N*-Nitrosoguanidine, wobei die *N*-Nitrosoharnstoffe stark mutagen wirken und die größte Bedeutung aufgrund ihrer häufigen Anwendung innerhalb der Krebstherapie und in der Grundlagenforschung haben (Fahrer *et al.*, 2023). Die Gruppe der Triazene, darunter Procarbazin oder Temozolomid (TMZ), die Alkylsulfonate wie Methylmethansulfonat (MMS) sowie Stickstofflostverbindungen wie Cyclophosphamid (CPA) gehören neben Alkylnitrosaminen und Alkylnitrosamiden ebenfalls zur alkylierenden Spezies (Fahrer *et al.*, 2023; De Jonge *et al.*, 2005). Die alkylierenden Agenzien weisen toxische, mutagene, teratogene, klastogene und karzinogene Eigenschaften auf (Druckrey *et al.*, 1967). In Abhängigkeit strukturellen Eigenschaften können alkylierende Substanzen via nukleophiler Substitutionsreaktion zweiter Ordnung (S_N2) oder nukleophiler Substitutionsreaktion erster Ordnung (S_N1) reagieren (Fahrer *et al.,* 2023). Die S_N1 Reaktion ist insbesondere bei Substanzen bevorzugt, deren Zielkohlenstoffatom durch interferierende Gruppen in sterisch gehinderter Form auftritt, weshalb für die Addition des Nukleophils und die Eliminierung der Abgangsgruppe zwei getrennte Reaktionen erforderlich sind (Beranek *et al.*, 2019). Zu den Zielatomen alkylierender Spezies zählen

neben Phosphotriestern des DNA-Rückgrates alle N-, sowie O-Atome von Purinen und Pyrimiden (Fahrer *et al.*, 2023). Die Art der nukleophilen Substitutionsreaktion nimmt Einfluss auf das jeweilige Zielatom (Fahrer *et al.*, 2023). So konnte bislang demonstriert werden, dass zum Substratspektrum von S_N1 Alkylanzien sowohl O als auch N-Atome zählen, während nach S_N2 reagierende Substanzen bevorzugt N-Atome alkylieren (Beranek *et al.*, 1990). Sowohl N-Alkylierungen als auch O-Alkylierungen weisen mutagene und zytotoxische Eigenschaften auf, wobei O^6-Methylguanin (O^6-MeG) ein sehr zytotoxisches Addukt darstellt (Beranek *et al.*, 1990; Kaina *et al.*, 2007). Dieses macht nach Exposition gegenüber NDMA 8 % aller durch Alkylierung induzierter Schäden aus und kann zu einer Basenfehlpaarung mit Thymin führen, was innerhalb zweier nachfolgender Replikationsrunden zu GC-AT Mutationen führt (Beranek *et al.*, 1990; Loechler *et al.*, 1984). Mit Ausnahme des mutagenen N3-Methyladenin Adduktes (N3-MeA) sind für N-Alkylierungen vor allem zytotoxische und weniger mutagene Effekte bekannt (Kay *et al.*, 2021). Die folgende Abbildung zeigt schematisch ein Beispiel der endogenen Entstehung von Alkylnitrosaminen aus Alkylaminen im Dünndarm (s. Abb. 2).

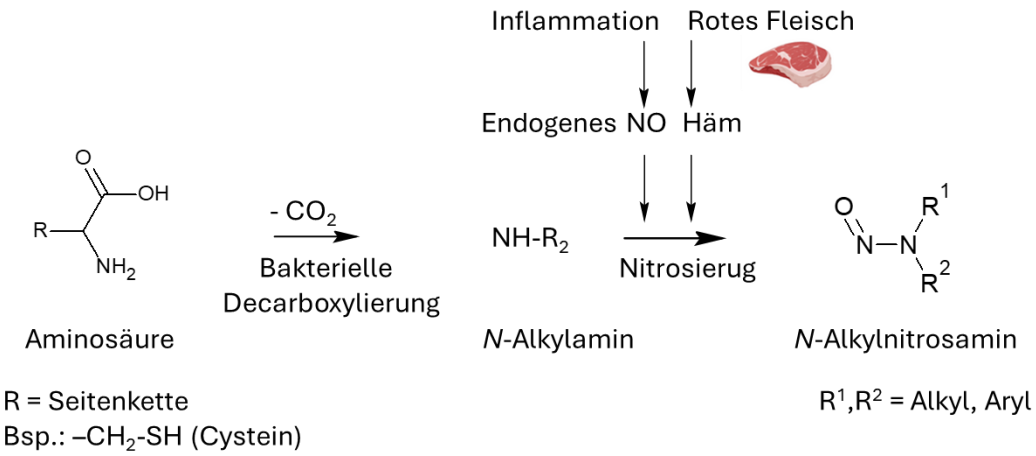

Abbildung 2: Entstehung von Alkylnitrosaminen aus Aminosäuren im Gastrointestinaltrakt. Modifiziert nach Fahrer *et al.*, 2013. Erstellt mit BioRender.com.

1.2 Vorkommen von *N*-Nitrosaminen

Der Anteil der endogenen NOC-Exposition beträgt zwischen 45 % und 75 % der Gesamtexposition gegenüber NOCs (Tricker *et al.*, 1997). Ferner treten NOCs in Lebensmitteln wie prozessiertem Fleisch, geräuchertem Fisch und Käse auf (Lijinsky, 1999). Im Allgemeinen liegt der Entstehung diverser NOCs eine Reaktion zwischen einem Nitrit oder einem Nitrogenoxid mit einem sekundären Amin oder einem Alkylamin zugrunde (Fahrer *et al.*, 2017). Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung von zehn

N-Nitrosaminen unterschiedlicher Struktur, darunter NDMA, NDELA, NMA, S-NNN, NPro, NMtBu, NMIPA, NFA, NFluo und NND in PRH, Die chemischen Strukturen dieser Substanzen sind nachfolgend aufgeführt (s. Abb. 3 - 5).

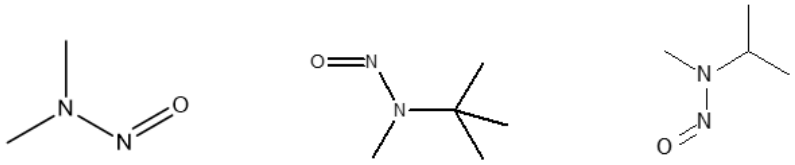

Abbildung 3: Chemische Struktur einfach konfigurierter N-Nitrosamine.
Von links nach rechts: *N*-Nitrosodimethylamin (NDMA), *N*-Methyl-*N*-Nitroso-tert-butylamin (NMtBu), *N*-Methyl-*N*-Nitroso-iso-propylamin (NMIPA). Dargestellt mit ChemSketch. Modifiziert nach Djuari & Londenberg *et al.,* 2023.

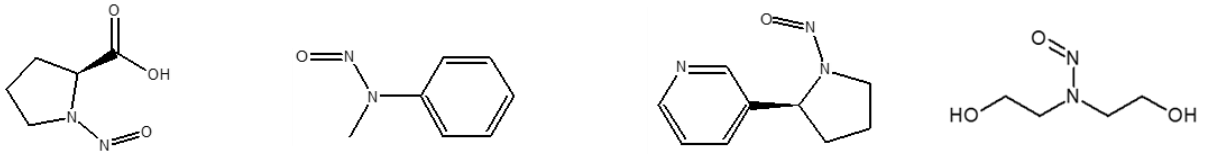

Abbildung 4: Chemische Struktur sperriger N-Nitrosamine.
Von links nach rechts: *N*-Nitrosoprolin (NPro), *N*-Nitrosomethylanilin (NMA), (*S*)-*N'*-Nitrosonornikotin (*S*-NNN), *N*-Nitrosodiethanolamin (NDELA). Dargestellt mit ChemSketch. Modifiziert nach Djuari & Londenberg *et al.,* 2023.

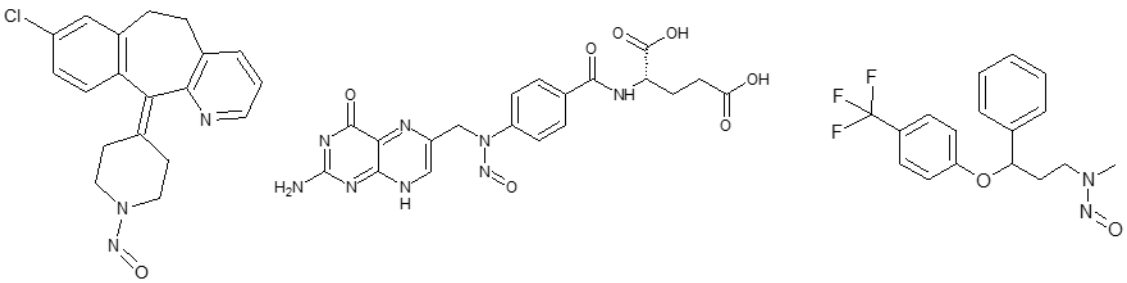

Abbildung 5: Chemische Struktur von N-Nitrosamin Drug Substance-Related Impurities (NDSRIs).
Von links nach rechts: *N*-Nitrosodesloratadin (NND), *N*-Nitrosofolsäure (NFA), *N*-Nitrosofluoxetin (NFluo). Dargestellt mit ChemSketch. Modifiziert nach Djuari & Londenberg *et al.,* 2023.

Bei NND, NFA und NFluo handelt es sich um Wirkstoffspezifische Arzneimittelverunreinigungen (vgl. Abb. 5). Sie zählen damit zu den NDSRIs. NMA tritt in Form einer sogenannten small-molecule impurity ohne struktureller Ähnlichkeit zum jeweiligen kontaminierten Arzneimittel auf (Abb. 4, Carlsson *et al.*, 2025). Darüberhinaus kommt NMA in Lebensmitteln vor (Contam-Panel, 2023; Carlsson *et al.*, 2025). S-NNN findet man am häufigsten in Tabakrauch (Abb. 4, Fahrer *et al.*, 2023). NPro kommt in verschiedenen Fleischprodukten und in luftgetrocknetem Schinken vor (Abb. 4, Pensabene *et al.*, 1979). Ferner tritt NPro in Tabakrauch auf (Brunnemann *et al.*, 1983).

Es wurden hauptsächlich experimentelle Daten zu NDMA, NDELA, S-NNN und NMA erhoben (vgl. Abb. 3, 4). Aufgrund ihres karzinogenen Potentials (vgl. Abschnitte 1. 4.1 – 1. 4. 4) und des Vorhandenseins veröffentlichter Daten hinsichtlich Vorkommen und Entstehung, erfolgt für diese vier Verbindungen in den nachfolgenden Abschnitten eine genauere Beschreibung (vgl. Abschnitte 1. 2. 1 - 1. 2.4).

1.2.1 NDMA

NDMA ist das am häufigsten in Lebensmitteln vorkommende Nitrosamin (Fahrer *et al.*, 2023). Oftmals betroffen sind geräucherte Produkte wie Wurst, Käse, Schinken und Fisch, wobei jeweils Höchstmengen von 12 µg/kg, 5 µg/kg, 17 µg/kg und 25 µg/kg detektiert wurden (Lijinsky, 1999). Auch in Tabakrauch tritt NDMA auf, wobei man die Aufnahmemenge in einer in China durchgeführten Studie auf 484 ng/Tag basierend auf der Auswertung des Zigarettenkonsums in 30 verschiedenen Regionen schätzt (Li *et al.*, 2024). Die Entdeckung von NDMA im Angiotensinrezeptorantagonisten (AT1-Rezeptorantagonisten) Valsartan erregte große Aufmerksamkeit und führte dazu, dass Arzneimittelhersteller aufgrund der Sicherheitsbedenken und der assoziierten strikten Regularien unter Druck gerieten (Tuesuwan *et al.*, 2021). Daraufhin wurden seitens regulatorischer Behörden und der pharmazeutischen Industrie verstärkt Anstrengungen unternommen, diese Kontamination durch sensitive Methoden frühzeitig zu detektieren und die Exposition gegenüber dieser karzinogenen Substanz zu reduzieren (Tuesuwan *et al.*, 2021). Ferner versuchte man Vorraussetzungen chemischer Art abzuleiten, welche die Nitrosaminentstehung im Rahmen der Arzneimittelherstellung begünstigen (Tuesuwan *et al.*, 2021). Die Behörden unterscheiden Arzneimittelwirkstoff-spezifische Verunreinigungen, die als NDSRIs bezeichnet werden und *N*-Nitrosaminverunreinigungen, die aus Kontamination mit strukturell einfachen Verbindungen, sogenannten „small molecule impurities“, resultieren (FDA, 2023; FDA, 2024; EMA, 2025). Für NDSRIs ist das Vorkommen auf bestimmte Arzneimittel, die den Wirkstoff enthalten, beschränkt, während einfache Verunreinigungen keine gemeinsamen strukturellen Eigenschaften mit dem Wirkstoff aufweisen und in verschiedenen Arzneimitteln auftreten können (FDA, 2024). Im Folgenden soll die Entstehung von NDMA im Rahmen der Wirkstoffsynthese beispielhaft erläutert werden. So ist für die Herstellung von AT1-Rezeptorantagonisten die Überführung der Nitrilgruppe in den pharmakologisch wirksamen Tetrazolring unter Addition eines Azides wie

Natriumazid (NaN_3) Vorraussetzung (Himo *et al.*, 2002). Die hochreaktive Natur des Azides erfordert den Einsatz von Nitrit in saurem Milieu, wobei Distickstoffoxid (N_2O) entsteht (Stedman *et al.*, 1959). Zur Erzeugung saurer Bedingungen wird oftmals HCl verwendet. Befinden sich Rückstände von Alkylaminen wie Dimethylformamid (DMF) innerhalb des Prozesses der Wirkstoffherstellung, beispielsweise in Form einer Kontaminante in anderen Reagenzien oder als Restbestandteil von vorherigen Prozessen innerhalb der Synthese, so kann dieses mit Nitriten wie Natriumnitrit ($NaNO_2$) reagieren, wobei *N*-Nitrosamine wie NDMA entstehen können (Tuesuwan *et al.*, 2021). Ein konkretes Beispiel der Entstehung von NDMA im Verlauf der Synthese des AT1-Rezeptorantagonisten Losartan ist in folgender Abbildung dargestellt (s. Abb. 6).

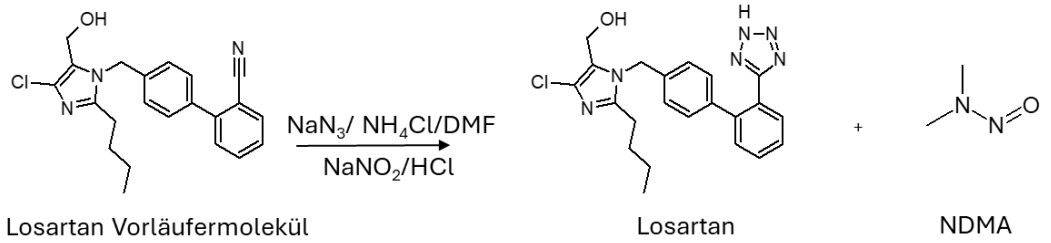

Abbildung 6: Nitrosaminentstehung während der Synthese des Tetrazolringes von Losartan. Beispielhafter Syntheseweg. Modifiziert nach Tuesuwan *et al.*, 2021. Dargestellt mit ChemSketch.

So kann aus dem im Rahmen der Losartan Herstellung als Lösungsmittel eingesetzten DMF Dimethylamin entstehen, welches dann unter NDMA Entstehung mit Nitrit oder salpetriger Säure reagiert (Tuesuwan *et al.*, 2021). Im Prozess der Losartan Herstellung kommt auch Ammoniumchlorid zum Einsatz (NH_4Cl, vgl. Abb. 6). Um das Risiko für Kontamination mit Nitrosaminen wie NDMA in Arzneimitteln zu senken wäre die Einführung von Grenzwerten für DMF in Lösungsmitteln und Reagenzien zielführend (Tuesuwan *et al.*, 2021). Weitere der im Rahmen der Arzneimittelherstellung relevanten Prozesse, die zur Entstehung von Nitrosaminen beitragen können, sind Arzneimittelformulierung, Herstellung, Verpackung und Lagerung (Tuesuwan *et al.*, 2021). Zu anderen mit NDMA kontaminierten Arzneimitteln zählen weitere Sartane wie beispielsweise Candesartan sowie Sartane ohne Tetrazolring wie Telmisartan, aber auch einzelne Verbindungen diverser pharmazeutischer Produkte wie die Antidiabetika Metformin und Pioglitazon, die Antibiotika Rifampin und Rifapentin sowie die H2-Antihistaminika Ranitidin und Nizatidin (Whomsley *et al.*, 1993; FDA, 2020, 01; FDA, 2020, 09; FDA, 2020,11; EMA, 2020, 04; Tuesuwan *et al.*, 2021). NDMA zählt zu den

Nitrosaminen, die endogen entstehen können (Jakszyn *et al.*, 2006). Innerhalb der prospektiven europäischen Studie zu Krebs und Ernährung von 2006 (Jakszyn, 2006) wurde eine im Verhältnis zur exogenen Exposition um 96-fach erhöhte endogene Exposition gegenüber NDMA ermittelt (Jakszyn *et al.,* 2006).

1.2.2 NDELA

NDELA detektierte man bisher besonders häufig in Kosmetikprodukten (Fahrer *et al.*, 2023). In einer Studie von Schothorst *et al.* wurde der Gehalt von NDELA in Seife, Haarölen, Peeling, Badeschaum und weiteren Pflegeprodukten untersucht (Schothorst *et al.*, 2005). Weitere Expositionsquellen stellen Tabakrauch und Lebensmittel dar (Liu *et al.*, 2008). Auch in synthetischen Schneidölen innerhalb der Metallbearbeitungsindustrie konnte NDELA bisher nachgewiesen werden (Lijinsky *et al.*, 1980). Die renale Ausscheidung des unveränderten NDELA konnte in Arbeitern, die gegenüber Metallbearbeitungsflüssigkeiten exponiert waren, gezeigt werden (IARC, 2000). In einer *in vivo* Studie an F344 Ratten konnte gezeigt werden, dass NDELA die Haut penetrieren kann (Lijinsky *et al.*, 1981). In diesem Zusammenhang konnten 1 h nach dermaler Applikation von 50 mg maximale Blutkonzentrationen von 130 – 220 mg/mL Blut gemessen werden, was einer 78 %-igen Aufnahme dieser Verbindung entspricht (Lijinsky *et al.*, 1981). Darüberhinaus kommt NDELA in Pestiziden vor (IARC, 2000).

1.2.3 NNN

N'-Nitrosonornikotin (NNN) zählt wie 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) zu den tabakspezifischen Nitrosaminen und entsteht nach Nitrosierung aus Nikotin (Fahrer *et al*, 2023; Hecht *et al.*, 1978; Hecht *et al.*, 1980; Hecht *et al.*, 1998; Hecht *et al.*, 2008). Beide Verbindungen sind an der Krebsentstehung beteiligt (Hecht *et al.* 1978). NNK wird unter Beteiligung von CYP2A13 und CYP2A6 metabolisch aktiviert (DeVore *et al.*, 2012). Zum genotoxischen Potential führen die durch NNK induzierten Methylierungsaddukte N7-MeG, N3-MeA, N3-Methylguanin (N3-MeG), O^6-MeG und O^4-Methylguanin (O^4-MeG) sowie die nach Pyridyloxobutylierung entstehenden Addukte, darunter O^6-[4-oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanin (O^6-pobG) (Li *et al.*, 2022). In Studien von Hecht *et al.* konnte gezeigt werden, dass NNN aus Nornikotin gebildet werden kann (Hecht *et al.*, 1978). Zur Quantifizierung wurde kohlenstoffmarkiertes [2'-14C] Nikotin und Nornikotin in Tabakblättern luftgetrocknet (Hecht *et al.*, 1978). Anschließend wurde

die Bildung von [2'-14C] NNN ermittelt (Hecht *et al.*, 1978). Dabei lag der Ertrag von NNN bei 0.009 % für Nikotin und bei 0.007 % für Nornikotin (Hecht *et al.,* 1978). Aufgrund des 20-100:1 Verhältnisses von Nikotin zu Nornikotin in herkömmlichem Tabak wird Nikotin als Hauptquelle für die NNN Entstehung betrachtet (Hecht *et al.*, 1978). NNN wird von CYP2A6 und CYP3A4 metabolisch aktiviert (Patten *et al.*, 1997). Im Vergleich zu NNK werden durch NNN hauptsächlich aus Pyridyloxobutylierung der DNA entstehende Addukte wie O^6-pobG gebildetet (Hecht *et al.*, 1999; Hecht *et al.*, 1986). NNN und NNK sind zwei Nitrosamine mit kanzerogenen Eigenschaften, während für die restlichen fünf existenten, tabakspezifischen Nitrosamine, darunter *N*-Nitrosoanabasin (NAB), *N*-Nitrosoanatabin (NAT), 4-(methylnitrosamino)− 4-(3-pyridyl)-butanol (NNAL), iso-4-(methylnitrosamino)− 4-(3-pyridyl)− 1-butanol (iso-NNAL) sowie 4-(methylnitrosamino)− 4-(3-pyridyl)buttersäure (iso-NNAC) keine eindeutig karzinogenen Effekte nachgewiesen werden konnten (Hecht *et al.*, 2008; Fahrer *et al.*, 2023). Im Hinblick auf Exposition ist das von NNN und NNK ausgehende geseundheitliche Risiko insobesondere wegen ihres konsistenten Vorkommens in Tabak und in Tabakrauch bedenklich (IARC, 2007). In einer umfassenden Metaanalyse wurde die Exposition gegenüber rauchfreien Tabakprodukten untersucht, wobei Daten aus Studien von Europa, der Südostasienregion, des östlichen Mittelmeerraumes sowie Süd-, und Nordamerika innerhalb der „Association of Smokeless Tobacco Use and Oral Cancer: A Systematic Global Review and Meta-Analysis“ einflossen (Asthana *et al.*, 2018). Hierbei ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Konsum von rauchfreien Tabakprodukten und dem Auftreten von Mundhöhlenkrebs in der Südostasienregion und der östlichen Mittelmeerregion feststellen (Asthana *et al.*, 2018). Darüberhinaus war das Risiko bei weiblichen Konsumenten signifikant erhöht (Asthana *et al.*, 2018). In einer weiteren Studie wurden neben brennbaren, rauchfreien Produkten E-Zigaretten untersucht (NCI, 2014). Die höchste Exposition gegenüber tabakspezifischen Nitrosaminen konnte dabei in Mehrfachverwendern von rauchfreien Tabakprodukten festgestellt werden, wobei die Exposition nach dem Report des National Cancer Institute „Smokeless Tobacco and Public Health: A Global Perspective“ je nach Region zwischen 0.1 % und 17 % lag (Hatsukami *et al.*, 2014). Im Hinblick auf das kanzerogene Potential ist dies insbesondere bedenklich, da der Konsum rauchfreier Tabakprodukte weltweit ansteigt (Sinha *et al.*, 2015). So konnten im Jahr 2015 weltweit 351.9 Millionen

Verbraucher rauchfreier Tabakprodukte in 121 Ländern evaluiert werden, darunter 67 % Männer und 33 % Frauen, während die Anzahl der Konsumenten von rauchfreien Tabakprodukten 2010 bei 302.4 Millionen lag (Sinha *et al.*, 2015). Dies zeigt, dass rauchfreie Tabakprodukte erheblich zur Exposition gegenüber NNN und NNK beitragen.

1.2.4 NMA

Die nicht nitrosierte Form von *N*-Nitrosomethylanilin (NMA), *N*-Methylanilin, findet in der chemischen Industrie Anwendung, beispielsweise als Lösungsmittel oder als Säureakzeptormolekül (Sitarek *et al.*, 2016). Die Synthese von *N*-Methylanilin kann beispielsweise unter Verwendung von Anilin, das nach Reaktion mit Formaldehyd am Zeolith Katalysator zu *N*-Methylidenanilin und Wasser reagiert und anschließend zu *N*-Methylanilin hydriert, erfolgen (Derouane *et al.*, 2002). Eine Exposition des Menschen erfolgt aufgrund des Vorkommens von *N*-Methylanilin in Lebensmitteln, darunter Käse, Gemüse und Orangenöl (Sitarek *et al.*, 2016). NMA kommt am häufigsten in Lebensmitteln vor (CONTAM-Panel, 2023). Darüberhinaus tritt NMA in Arzneimitteln auf (Carlsson *et al.*, 2025). Mirvish *et al.* konnte die endogene Bildung von NMA in *in vivo* Studien an Mäusen zeigen (Mirvish *et al.,* 1987). NMA enstand hierbei nach Reaktion von Amylnitrit ($AmNO_2$) mit *N*-Methylanilin (Mirvish *et al.*, 1987). Nach intravenöser Applikation von 250 mg/kg *N*-Methylanilin und der Gabe von 40 mg/ kg Amilnitrit über die Schlundsonde an Mäusen konnte nach 30 Minuten eine durchschnittliche NMA Konzentration von 630 nmol +/- 140 nmol/ kg Magengewebe detektiert werden (Mirvish *et al.*, 1987). In Fleisch und Fleischprodukten konnten Aufnahmemengen von NMA bestimmt werden, die die humane Exposition widerspiegeln (EFSA, 2023). Zudem existieren von der Europäischen Lebensmittelsicherheitsbehörde (EFSA) publizierte Daten, in denen Gesamtaufnahmemengen von *N*-Nitrosaminen (TCNAs) für Säuglinge und Kleinkinder im Bereich von 7.4 ng/kg und 87.7 ng/kg beschrieben sind (EFSA, 2023). Hierbei war gekochtes, unprozessiertes Fleisch berücksichtigt (EFSA, 2023). Die Exposition der Tiere in der Studie von Mirvish *et al.* lag damit bis zu 10^6-fach oberhalb der von der EFSA veröffentlichten tolerierbaren Aufnahmemengen über die Nahrung (Mirvish *et al.*,1987).

1.3 Mutagene und karzinogene Wirkmechanismen und metabolische Aktivierung von *N*-Nitrosaminen

Der komplexe Prozess der durch *N*-Nitrosamine hervorgerufenen Karzinogenese umfasst mehrere einzelne molekulare Ereignisse wie metabolische Aktivierung, Bindung der resultierenden aktiven Metabolite an die DNA sowie Reparaturmechanismen gebildeter DNA-Addukte, weshalb die Vorhersage kanzerogener Eigenschaften mit höherer Unsicherheit verbunden ist (Cross *et al.*, 2021; Thresher *et al.*, 2020). Insbesondere Art und Umfang der metabolischen Aktivierung sind für die Mutagenität von Nitrosaminen verantwortlich, wobei beides mit strukturellen Eigenschaften einzelner Verbindungen im Sinne des Konzeptes der Struktur-Wirkungsbeziehung korrelliert (Cross *et al.*, 2021).

1.3.1 Chemische Eigenschaften

Das Reaktionsschema der α-C-Hydroxylierungsreaktion ist in Abbildung 7 aufgeführt. Nach CYP450 katalysierter metabolischer Aktivierung von Dialkylnitrosaminen [1] entsteht das α-Hydroxydialkylnitrosamin [2]. Nach Heterolyse unter Abspaltung eines Aldehyds entsteht das Hydroxyalkyldiazoniumion [3], aus welchem nach Verlust einer OH-Gruppe das reaktive Alkyldiazoniumion entsteht [4]. Dieses kann schließlich in Abhängigkeit des Restes R2 nach S_N1 oder S_N2 mit der DNA reagieren, wobei N_2 die Abgangsgruppe darstellt (Cross *et al.*, 2021). Im Falle des S_N1 Mechanismus entsteht zunächst das reaktive Carbokation [5]. Weitere reaktive Moleküle wie Aldehyde, die nach Heterolyse entstehen, sowie Nitrosamide, Nitrosoharnstoffe und Nitrosoaldehyde können im Zuge der α-C-Hydroxylierung gebildet werden.

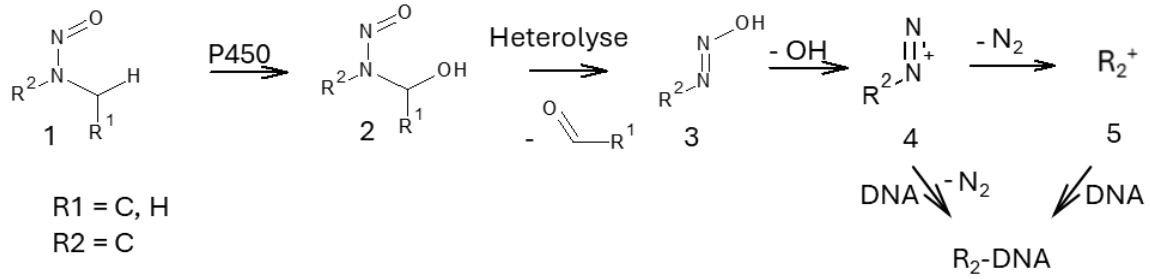

Abbildung 7: Hydroxylierung am α-C-Atom von Dialkylnitrosaminen und anschließende Alkylierung der DNA via S_N2 (links) oder S_N1 (rechts). Erläuterung einzelner Schritte s. Text. Modifiziert nach Cross *et al.*, 2021. Dargestellt mit ChemSketch.

Die ungehinderte metabolische Aktivierung von Dialkylnitrosaminen am α-C-Atom führt zur Entstehung der potentesten Karzinogene (Cross *et al.*, 2021). Das Ausmaß der α-C-

Hydroxylierung ist abhängig von der Präsenz und Verfügbarkeit von α-H-Atomen am α-C-Atom (Cross *et al.*, 2021). Im Falle eines Mangels von α-H-Atomen oder sterischer Hinderung durch Substituenten am α-C Atom kann es zur kompletten Inhibition der Hydroxylierungsreaktion kommen (Cross *et al.*, 2021). Es gibt weitere Aktivierungswege, wie beispielsweise β-C-Hydroxylierung, welche für NDELA bereits demonstriert werden konnte (Bonfanti *et al.*, 1986, Loeppky, Chen *et al.*, 2002). In Abbildung 8 ist der allgemeine Hydroxylierungsweg am β-C-Atom dargestellt.

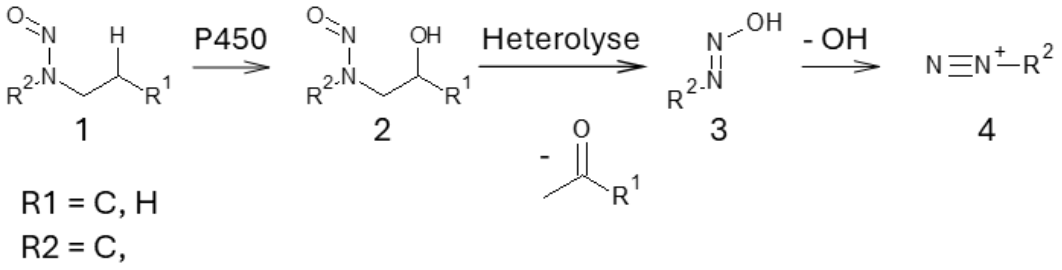

Abbildung 8: Hydroxylierung am β-C-Atom von Dialkylnitrosaminen. Erläuterung einzelner Schritte s. Text. Modifiziert nach Djuari & Londenberg *et al.*, 2021. Dargestellt mit ChemSketch.

Nach CYP450 vermittelter metabolischer Aktivierung am β-C-Atom von Dialkylnitrosaminen kommt es zur Entstehung eines β-Hydroxydialkylnitrosamins [2], welches durch ein H-Atom mit der Nitrosogruppe über einen 7-gliedrigen Ring anstelle eines 6-gliedrigen Ringes wie im Falle der nach α-Hydroxylierung entstehenden Verbindung stabilisiert wird (vgl. Abb. 7; Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Nach Verlust eines Aldehyds entsteht das Hydroxyalkyldiazoniumion [3], aus welchem schließlich das DNA reaktive Diazoniumion hervorgeht [4]. Während die α-C-Hydroxylierung mit der Initiierung des karzinogenen Wirkmechanismus von Nitrosaminen verknüpft ist, sind die Effekte der nach β-Oxidation entstehenden Verbindungen komplex (Hecht *et al.*, 1980; Djuari & Londenberg *et al.,* 2023). Ein Mechanismus, welcher zu reaktiven Spezies nach β-Oxidation führt, ist die umgekehrte Aldol-Spaltung, die zu weniger stabilen Nitrosaminen führt (Preussmann & Stewart, 1984; Krüger *et al.*, 1971). Das Ausmaß dieser Reaktion ist mit dem Grad der Stabilität des Cabonylproduktes assoziiert (Preussmann & Stewart, 1984). Ein Beispiel dualer Alkylierungsaktivität, die durch β-Hydroxylierung hervorgerufen wird, kann anhand von *N*-Nitrosodipropylamin demonstriert werden (Krüger *et al.*, 1971, s. Abb. 9).

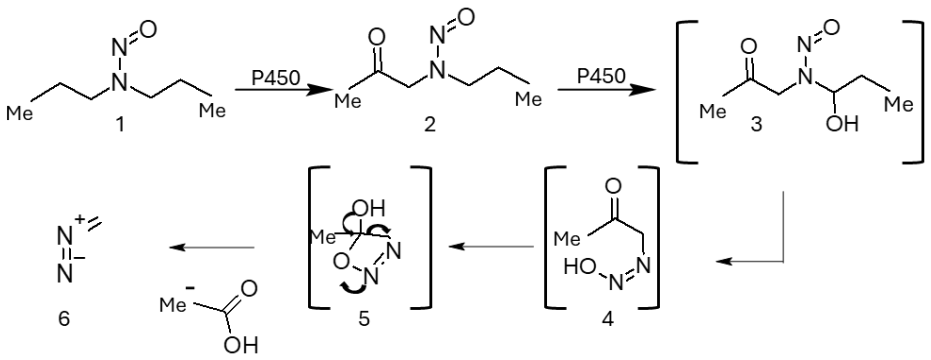

Abbildung 9: Oxidation am β-C-Atom und anschließender Zerfall von N-Nitrosodipropylamin. Erläuterung einzelner Schritte s. Text**.** Modifiziert nach Carlson *et al.*, 2019; Djuari & Londenberg *et al.*, 2023. Dargestellt mit ChemSketch.

Aufgrund der Länge der Kohlenstoffkette dieser Verbindung würde man eine Propylierung der DNA erwarten (Krüger *et al.*, 1971). Neben dieser vermag *N*-Nitrosodipropylamin allerdings auch Methyladdukte zu bilden (Krüger *et al.*, 1971). Die Methylierungsaktivität ist mit dem zugrundeliegenden Mechanismus erklärbar (Krüger *et al.*, 1971). So kommt es nach zwei aufeinanderfolgenen β-Oxidationen von *N*-Nitrosodipropylamin [1] zur α-Hydroxylierung des β-oxo-Nitrosamins [2] (Krüger *et al.*, 1971). Nach Dealkylierung des α-Hydroxy-β-oxo-Nitrosamins [3] kommt es zur 5-oxo-Zyklisierungsreaktion [4, 5] (Krüger *et al.*, 1971). Das entstehende Tetrahedral-Intermediat [4, 5] zerfällt unter Entstehung von Diazomethan [6] und Essigsäure, wobei die beschriebene Reaktionskaskade auch bereits für andere Nitrosaminverbindungen nach β-Oxidation beschrieben ist (Lijinsky *et al.*, 1985; Okada *et al.*, 1976). Nach β-Oxidation entstehende β-Hydroxynitrosamine können auch sulfatiert werden (Koepke *et al.*, 1990; Michejda *et al.*, 1987). Die β-Oxidation führt nicht zwingend zu reaktiven Verbindungen, was anhand von *N*'-Nitrosonornikotin demonstriert werden kann (Hecht *et al.*, 1980). Neben α-C-Hydroxylierung und β-C-Oxidation ist die γ-C-Oxidationsreaktion sowie die ω-C-Oxidationsreaktion für einzelne Nitrosamine beschrieben (Carlsson *et al.*, 2019; Lijinsky *et al.*, 1987). Unsymmetrische, geradkettige Methylalkylnitrosamine sind Substrate der ω-C-Oxidation, die diesen Verbindungen oftmals Gewebespezifität verleiht (Carlson *et al.*, 2019; Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Am Beispiel von unsymmetrischen, geradkettigen *N*-Nitrosomethylalkylnitrosaminen [1] kann der dem ω-C-Oxidationsreaktionsweg zugrunde liegende Aktivierungsmechanismus, veranschaulicht werden (Carlson *et al.*, 2019, Abb. 10). Für diese Verbindungen erfolgt durch CYP450 katalysierte Hydroxylierung eine Verstoffwechslung zur Säure [2], welche dann zum

Substrat der am Fettsäurestoffwechsel involvierten Knoop-Typ β-Oxidationsenzyme wird, was die Bildung des bekannten Blasenkarzinogens *N*-nitrosomethyl-3-carboxypropylamin [3] zur Folge hat (Okada *et al.*, 1976). Die Carbonsäurestruktur ist ausschlaggebend für die Gewebespezifität, da das Molekül aufgrund seiner Ladung außerhalb der Zelle bleibt und in die Blase transportiert wird, wo schließlich das karzinogene Potential entfaltet wird (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die α-Hydroxylierung der 3-Carboxypropylkette führt zur Bildung einer Verbindung [4], die durch Mesomerie mit dem zugehörigen Lacton [5] stabilisiert wird (Mochizuki *et al.*, 1980). Anschließender Zerfall führt zur Bildung des reaktiven Alkyldiazoniumions [6] (Mochizuki *et al.*, 1980).

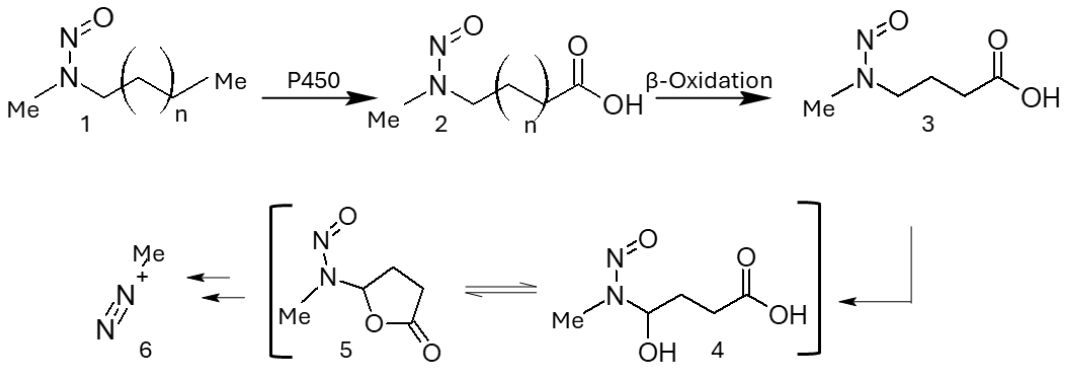

Abbildung 10: Tandem ω-Oxidation-Knoop-Typ β-Oxidation von geradkettigen N-Nitrosomethylalkylnitrosaminen zu N-Nitrosomethyl-3-carboxypropylamin. Beschreibung zugrunde liegender Schritte s. Text. n = jede gerade Zahl. Modifiziert nach Carlson *et al.*, 2019; Djuari & Londenberg *et al.*, 2023. Dargestellt mit ChemSketch.

Neben Hydroxylierungsreaktionen erfolgt die Verstoffwechslung von *N*-Nitrosaminen enzymatisch und nicht enzymatisch durch eine Reihe weiterer Reaktionen (Djuari & Londenberg *et al.*,2023; Streeter *et al.*, 1990; Arcos *et al.*1982; ATSDR, 2017). In diesem Zusammenhang existieren Studien, die die Transnitrosierung beschreiben (Arcos *et al.*, 1982; ATSDR, 2017). Für *N*-Nitrosodiphenylamin konnte in einer *in vivo Studie* nach Verabreichung über die Schlundsonde an Ratten gezeigt werden, dass Prolin nach simultaner Applikation nitrosiert wird, wobei die nicht karzinogene Verbindung *N*-Nitrosoprolin entsteht (Ohshima *et al.*, 1982). In diesem Zusammenhang wird auch der umgekehrte Weg postuliert, wobei *N*-Nitrosophenylamin, welches Blasentumore induzieren kann, aus *N*-Nitrosoprolin entsteht (Ohshima *et al.*, 1982). In Studien von Inami *et al.*, konnte gezeigt werden, dass *N*-Nitroso-*N*-methylurea nach Transnitrosierung durch *N*-Nitrosoprolin unter sauren Bedingungen, die denen im Magen

ähneln, entsteht (Inami *et al.*, 2015). Neben der durch Hydroxylierung und Transnitrosierung hervorgerufenen metabolischen Aktivierung kann es auch zur Detoxifizierung von Nitrosaminen kommen, wobei in diesem Zusammenhang enzymatisch vermittelte als auch spontane Denitrosierung in der Literatur beschrieben sind (Streeter *et al*. 1990; Arcos *et al.*, 1982; ATSDR, 2017). Die Denitrosierung findet dabei am gleichen Radikal Intermediat wie die α-C-Hydroxylierung statt, weshalb es sich um einen konkurrierenden Reaktionsmechanismus handelt (Ji *et al.*, 2012). So wurde Monomethylamin (MA) als aus der Denitrosierungsreaktion hervorgehender Metabolit von NDMA im Urin sowie im Blut von Ratten nach intravenöser und peroraler Applikation identifiziert (Streeter *et al.*, 1990). *In vitro* Untersuchungen, in denen MA Mikrosomen von Ratten nach Inkubation mit NDMA detektiert wurde, weisen daraufhin, dass der *in vivo* detektierte Metabolit aus Cytochrom-P450 vermittelter Detoxifizierung resultiert (Lorr *et al.*, 1982).

1.3.2 Beteiligung verschiedener CYP Enzyme an der metabolischen Aktivierung von *N*-Nitrosaminen

Die metabolische Aktivierung von *N*-Nitrosaminen wird von CYP Enzymen katalysiert, wobei oftmals nur eine Isoform an der aus mehren Schritten bestehenden Reaktionskaskade beteiligt ist (Cross *et al.* 2021; Chowdhury *et al.*, 2010; Chowdhury *et al.*, 2012). Cytochrom-P450-2E1 (CYP2E1) ist eine der CYP-Isoformen, welche an der metabolischen Aktivierung von *N*-Nitrosaminen beteiligt ist (Bringezu *et al*., 2022; Cross *et al.*, 2021). Zum Substratspektrum zählen insbesondere kleine Dialkylnitrosamine, was nach Bindung an CYP2E1 die Bildung von α-Hydroxyintermediaten zur Folge hat (Cross *et al.*, 2021). Dennoch existieren Daten, die eine Beteiligung dieser Isoform an etwas größeren Dialkylnitrosaminen wie NMA belegen (Nedelcheva *et al.*, 1994; Yamazaki *et al.*, 1992). Für das jeweilige Substratspektrum der an der metabolischen Aktivierung von *N*-Nitrosaminen beteiligten CYP450 Proteine, mit Eigenschaften wie Größe und Komplexität, ist der Aufbau des aktiven Zentrums des Enzyms relevant (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Kleinere Nitrosamine, welche oftmals Substrate von CYP2E1 sind, werden auch durch CYP2A6 metabolisch aktiviert (Camus *et al.*, 1993; Yamazaki *et al*.,1992; Chowdhury *et al.*, 2010). Demgegenüber besteht das Substratspektrum für CYP3A4 aus größeren Nitrosaminen wie z.B. NNN (Lewis *et al.*, 2010). Weitere, an der metabolischen Aktivierung von Nitrosaminen beteiligte CYP-Enzyme sind CYP2C9,

CYP2C19 und CYP2D6 (Lewis *et al.*, 2010; Lonsdale *et al.*, 2013). Darunter ist für CYP2C9 die Bindung an anionische Substrate mit spezieller Orientierung bekannt, während CYP2C19 an der Katalyse von zwitterionischen Molekülen beteiligt ist (Lewis *et al.*, 2010; IARC 1978). CYP2D6 vermag die Umsetzung von kationischen Substraten zu katalysieren (Lewis *et al.*, 2010). CYP2E1 ist an der Aktivierung verschiedener Substrate, darunter organischen Lösungsmitteln, Nitrosaminen und Arzneimitteln beteiligt ist, wobei in *in vivo* und in *in vitro* Studien größere Speziesunterschiede zwischen Mensch, Ratte und Hamster im Hinblick auf Vorkommen und Aktivität feststellbar waren (Nedelcheva *et al.*, 1994; Phillipson *et al.*,1984; Synder *et al.*, 1987). In der nachfolgenden Tabelle sind die für den Metabolismus von *N*-Nitrosaminen wichtigen CYP Enzymisoformen und deren Hauptsubstrate dargestellt (vgl. Tab. 1, Djuari & Londenberg *et al.*, 2023).

Tabelle 1: Relevante Isoformen der CYP Enzyme und Hauptsubstrate. Modifiziert nach Djuari & Londenberg *et al.*, 2023.

CYP Enzymisoform	Substrate
CYP3A4	Midazolam
CYP2E1	Chlorzoxazon
CYP2A6	Nikotin
CYP1A2	Phenacetin
CYP2C9	Tolbutamid
CYP2D6	Dextromethorphan
CYP2C19	Mephenytoin
CYP2B6	Bupropion

1.3.3 Faktoren die zum karzinogenen Potential von *N*-Nitrosaminen beitragen

Das karzinogene Potential von *N*-Nitrosaminen wird vom Ausmaß der metabolischen Aktivierung und der damit verbundenen Entstehung reaktiver Verbindungen beeinflusst (Cross *et al.*, 2021). In diesem Zusammenhang spielen sowohl Vorkommen als auch Aktivität der für die metabolische Aktivierung relevanten CYP-Enzyme eine Rolle (Cross

et al., 2021; Camus *et al.*, 1993). Physikochemische Parameter wie Löslichkeit, Molekülgröße und Sterik sind ebenfalls relevant, da diese für die Absorption und das Erreichen des Targetorgans ausschlaggebend sind (Cross *et al.,* 2021; Druckrey *et al*, 1967). Für das Erreichen der Zielstruktur haben zudem Natur sowie Stabilität der Intermediate, darunter der Beständigkeit der Carbokation und Diazoniummoleküle großen Einfluss (Cross *et al.,* 2021), wobei insbesondere für die CYP Isoform 2E1 Daten existieren (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Yamazaki *et al.*, 1992). Im Rahmen der Risikobewertung von Nitrosaminen in Arzneimitteln existieren in der ICH M7 Leitlinie entscheidende Kriterien, die zur Bestimmung des karzinogenen Potentials von Nitrosaminen genutzt werden (EMA, 2020; Cross *et al.*, 2021). Diese stützen sich auf in Tieren erhobenen TD_{50}-Werten (Cross *et al.*, 2021). Für *N*-Nitrosamine ohne Karzinogenitätsdaten hingegen erfolgt die Ableitung provisorischer AIs, welche auf dem Konzept der Struktur-Aktivitätsbeziehung (engl. structure activity relationship; (SAR)) ähnlicher Verbindungen basiert (Cross *et al.*, 2021; SwissMedic., 2021; EMA, 2020; FDA, 2021). In diesem Zusammenhang wurden für die SAR Kriterien ermittelt, die den Haupteinfluss auf die Mutagenität definieren und eine Eingruppierung der *N*-Nitrosamine in fünf verschiedene Gruppen erlauben (EMA, 2023; Kruhlak *et al.*, 2024). Basierend auf diesem Konzept wurden für jede dieser Hauptgruppen akzeptable Aufnahmemengen (AIs) festgelegt (EMA, 2023; Kruhlak *et al.*, 2024). Diese basieren auf den beiden potentesten *N*-Nitrosaminen NDMA und *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA) (Kruhlak *et al.*, 2024; Cross *et al.*, 2021). Hauptkriterien für mutagene Effekte bestehen aus metabolischer Aktivierung, der Bildung von DNA-Addukten und der Reparatur gebildeter DNA-Addukte (Cross *et al.*, 2021).

Metabolische Aktivierung

Für Dialkylnitrosamine, die durch α-Hydroxylierung metabolisch aktiviert werden, konnten in Tierstudien und *in vitro* die Entstehung der potentesten Karzinogene ermittelt werden (Lijinsky *et al.*, 1987; Guttenplan *et al.*, 1987; Cross *et al.*, 2021; Camus *et al.,* 1993; Yamazaki *et al.*,1992). Dabei wird das Ausmaß der α-Hydroxylierung durch die chemische Umgebung des Moleküls bestimmt, wobei sowohl sterische als auch elektronische Effekte dazu führen können, dass das Ausmaß der α-Hydroxylierung reduziert wird, alternative Mechanismen stattfinden oder Reaktionen ausbleiben (Cross

et al., 2021). Sowohl die Reduktion der α-Hydroxylierung, das Ausbleiben von Reaktionen als auch alternative Mechanismen haben eine Senkung des karzinogenen Potentials zur Folge (Cross *et al.*, 2021). Cross und Ponting konnten mithilfe kuratierter Daten, basierend auf TD_{50}-Studien welche in Tierstudien erhoben wurden, sowie der Nutzung von auf Algorithmen basierenden Datenbanken, unter Verwendung von *in silico* Toxikologie bestimmte substrukturelle Kategorien von *N*-Nitrosaminen ermitteln und demonstrieren, dass das Ausmaß der α-Hydroxylierung insbesondere vom Grad der Verzweigung am α-C Atom als auch vom Vorhandensein elektronegativer Atome, die einen elektronenziehenden (-I-Effekt) induzieren, abhängig ist (Cross *et al.*, 2021). Die ansteigende Anzahl an Substituenten am α-C Atom resultiert in diesem Zusammenhang in einer Abnahme des karzinogenen Potentials durch zunehmende Ersetzung der H-Atome (Cross *et al.*, 2021). Einen ähnlichen Effekt haben beidseitige Substituenten am Aminstickstoff des Nitrosamins (Cross *et al.*, 2021). Dabei ist für das Ausbleiben des karzinogenen Effektes nicht die vollständige Ersetzung aller H-Atome am Stickstoff-, oder Kohlenstoffatom notwendiges Kriterium (Cross *et al.*, 2021). Eine zunehmende Substitution der Kettenlänge, Ringgröße und Molekulargewicht können die Karzinogenität ebenfalls verringern, dennoch hat die Art der funktionellen Gruppe eine größere Bedeutung für das Ausmaß der α-Hydroxylierung und damit für das karzinogene Potential (Cross *et al.*, 2021). Verbindungen mit stark elektronenanziehenden Gruppen am β-C Atom zeigen eine Abnahme der Karzinogenität, was auf eine reduzierte α-Hydroxylierung schließen lässt. In Übereinstimmung mit diesem Prinzip zeigen Verbindungen mit zwei starken elektronenanziehenden Gruppen eine vergleichsweise ausgeprägtere Abnahme des Auftretens karzinogener Effekte (Cross *et al.*, 2021).

DNA-Alkylierung

Die DNA-Alkylierung als Ursache hervorgerufener Mutagenität und damit Karzinogenität ist aufgrund des fehlenden Nachweises einer quantitativen Beziehung sowie des zugrunde liegenden Mechanismus bisher kein regulatorisch anerkannter Endpunkt, wird jedoch als Biomarker verwendet und stellt ein weiteres Hauptkriterium zur Bestimmung der übergeordneten SAR dar (Cross *et al.*, 2021). Dabei geht man davon aus, dass zunehmende Alkylierung mit einem Anstieg der karzinogenen Potenz verbunden ist (Cross *et al.*, 2021). Für das Ausmaß der Bildung von DNA-Addukten spielt das

Vorkommen der für die α-Hydroxylierung kleiner Dialkylnitrosamine wie NDMA und NDEA relevanten Enzyme, CYP2E1 und CYP2A6, eine entscheidende Rolle (Yamazaki *et al.*, 1992; Camus *et al.*, 1993; Chowdhury *et al.*, 2010.) Das Vorkommen dieser Isoformen in verschiedenen Spezies und Individuuen sowie in Zielorganen und die Berücksichtigung der damit einhergehenden Unterschiede ist daher bedeutsam (Cross *et al.*, 2021). Speziesunterschiede zwischen Hamster und Mensch sowie zwischen verschiedenen Organen konnten in diesem Zusammenhang für CYP2E1 in verschiedenen Studien ermittelt werden (Phillipson *et al.*, 1984; Scherer *et al.*, 1980; Wani *et al.*, 1990). Aufgrund der kleinen aktiven Bindungsstelle von CYP2E1, die die Bindung großer Moleküle verhindert, ist für die Vorhersage des karzinogenen Potentials sperriger *N*-Nitrosamine das Vorkommen anderer CYP Enzyme wie CYP3A4, CYP2A6 sowie CYP2C9 bedeutsam (Lonsdale *et al.*, 2013; Lewis *et al.*, 2010; Cross *et al.*, 2021). Neben dem Vorkommen der CYP Enzyme im Targetorgan muss die Präsenz in weiteren Organen zur Vorhersage des karzinogenen Potentials berücksichtigt werden (Ding *et al.*, 2003). Für das Ausmaß der Alkylierung spielt auch in diesem Zusammenhang die Anzahl der H-Atome am α-C Atom eine Rolle, da durch diese die Wahrscheinlichkeit der metabolischen Aktivierung via α-Hydroxylierung bestimmt wird (Cross *et al.*, 2021; EMA, 2020). Weiterhin wird das Ausmaß karzinogener Effekte von der Art der Substitutionsmuster am N-Atom des Amins bestimmt, da verschiedene Substituenten die Bildung unterschiedliche Addukte zur Folge haben (Cross *et al.*, 2021). Symmetrische Substituenten am N-Atom weist beispielsweise NDMA auf, was zur Bildung von Methyaddukten führt, während Verbindungen mit unsymmetrischen Substituenten verschiedene Addukte erzeugen können (Cross *et al.*, 2021). Organotrope karzinogene Effekte konnten für verschiedene Substituenten innerhalb symmetrischer und asymmetrischer Nitrosamine ebenfalls nachgewiesen werden (Cross *et al.*, 2021; Druckrey *et al.*, 1967). Da Elektrophilität und damit Reaktivität durch elektronenziehende Gruppen beeinflusst wird, kann das Ausmaß der α-Hydroxylierung durch diese Gruppen verringert werden, was mit einer abnehmenden Alkylierung einhergeht (Cross *et al.*, 2021). Für das Ausmaß der DNA-Alkylierung weiterhin relevant ist die potentielle Bildung des Wasserstoffbrückenbindungsintermediats, für das aufgrund der Bindung des Hydroxylwassertoffatoms an das Nitrososauerstoffatom die korrekte strukturelle Ausrichtung erforderlich ist (Cross *et al.*, 2021). So kann das Vorhandensein zusätzlicher

Funktionalitäten an *N*-Nitrososubstituenten (wie β-, oder γ-Hydroxylgruppen) die Bildung des Intermediats stören (Cross *et al.*, 2021). Darüberhinaus kann es zur Bildung von wasserstoffbrückenbildenden Ringen zwischen den beiden Seiten des Nitrosamins kommen, die energetisch günstiger sein können als das für die Bildung des Diazoniumnions erforderliche Intermediat (Cross *et al.*, 2021, Yu *et al*.1996). Auch können Hydroxylierung an (β-, γ- und ω-) Kohlenstoffatomen sowie Denitrosierung mit der α-Hydroxylierung konkurrieren und in der Folge zur Senkung des karzinogenen Potentials aufgrund verminderter DNA-Alkylierung führen (Lijinsky *et al.*, 1987; Streeter *et al.*, 1990; Carlson *et al.,* 2019. Für das Ausmaß der DNA-Alkylierung spielt zudem die Stabilität und Löslichkeit von *N*-Nitrosaminen eine Rolle (Cross *et al*., 2021; Druckrey *et al.*, 1967). So reduzieren Hydroxylgruppen am α-C Atom des Nitrosamins die Halbwertszeit des Moleküls von entscheidendem Ausmaß, weshalb die Hydroxylierung im Organ zu einem höheren Anteil an alyklierter DNA, als die Hydroxylierung vor Erreichen der jeweiligen Zielstrukturen führt (Mochizuki *et al.*, 1980). Hierbei können weitere Oxidationen zu Aldehyden oder Carboxylsäuren durch Alkoholdehydrogenasen die Reaktivität und damit das karzinogene Potential durch Bildung direkt wirkender alkylierender Agenzien verstärken (Hecht *et al.*, 1984). Auch möglicherweise infrage kommende Detoxifizierungswege wie beispielsweise Phase II-Reaktionen, welche durch enzymatisch katalysierte Konjugation der in Phase-I nach beispielsweise Oxidationsreaktion entstandenen, modifizierten oder eingefügten funktionellen Gruppen mit einem wasserlöslichen Molekül wie UDP-Glucoronsäure definiert ist, haben Einfluss auf die Reaktivität der resultierenden Metaboliten und damit auf das karzinogene Potential (Cross *et al*., 2021). Entscheidend für die Konjugation mit Glutathion, UDP-Glucoronsäure oder einer Sulfatgruppe, die mit einer erhöhten Wasserlöslichkeit und damit einer effizienten Eliminierung von Fremdstoffen einhergeht, ist abhängig vom Vorhandensein funktioneller Gruppen innerhalb des *N*-Nitrosomoleküls (Carlson *et al.*, 2019; Jancova *et al.*, 2010; Michejda *et al.*, 1987; Cross *et al*., 2021). Auch die Denitrosierungsreaktion, welche eine Rolle für NDMA und NDELA spielt, trägt zur Detoxifizierung durch Bildung eines sekundären Amins, welches verminderte DNA-Alkylierungsreaktivität aufweist, bei (Streeter *et al*., 1990; Keefer *et al*., 1987). Weiterhin Einfluss auf die Reaktivität haben labile Thiol oder Ethergruppen, die zur Konjugatbildung oder Molekülspaltung führen können. Schließlich kann prä-metabolische Oxidation bei

langen Substituenten zur Verstärkung karzinogener Effekte durch Oxidationskürzung der Kohlenstoffkette führen (Lijinsky *et al.*, 1987; Okada *et al.*, 1976; Suzuki *et al.*, 1981).

DNA Reparatur

Schließlich besteht eine Abhängigkeit des karzinogenen Potentials von zelleigenen DNA-Reparaturkapazitäten (Cross *et al.,* 2021). Für die Art und Anzahl der involvierten DNA-Reparaturenzyme spielt hierbei die Größe des gebildeten Addukts eine Rolle (Cross *et al.*, 2021). So sind an der Reparatur sperriger Addukte eine Vielzahl unterschiedlicher Enzyme beteiligt, während Methyl-, und Ethylgruppen durch Alkyltransferasen entfernt werden (Cross *et al.*, 2021; Peterson *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2021; Bellec *et al.*, 1996). Hierbei sind Nukleotid-Exzisionsreparatur und Basen-Exzisionsreparatur als involvierte Mechanismen der Schadensreversion zu nennen (Cross *et al.*, 2021; Peterson *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2021; Bellec *et al.*, 1996). Für die Kapazität diese Reparaturwege existieren sowohl speziesabhängige, als auch intraindividuelle Unterschiede, beispielsweise für die Schadensreversion durch die MGMT (Fahrer *et al.*, 2023). Dies muss bei der Dateninterpretation und damit einhergehender Vorhersage des karzinogenen Potentials von *N*-Nitrosaminen berücksichtigt werden. Damit wird das karzinogene Potential unterschiedlicher *N*-Nitrosamine von einer Vielzahl unterschiedlicher Variablen bestimmt. Bei der auf read-across von Cross und Ponting angewendeten Methode bleibt aus diesem Grund zu berücksichtigen, dass die Genauigkeit der Vorhersage karzinogener Effekte für Verbindungen, die im Hinblick auf Molekülgröße und Molekülform sowie in Art der funktionellen Gruppen stark von NDMA und NDEA abweichen, weniger genau ist (Cross *et al.*, 2021). Für die Zukunft wird daher die Berücksichtigung weiterer substruktureller Kategorien, welche die Karzinogenität beeinflussen können, mithilfe von *in silico* Methoden adressiert (Cross *et al.*, 2021).

1.3.4 Einfluss von Lösungsmitteln auf die CYP Enzymaktivität

Die Beeinflussung der CYP Enzymaktivität durch Lösungsmittel muss für die Testung indirekt wirkender Substanzen validiert werden, um die Prädiktivität der jeweiligen Screening Methoden durch mögliche Enzyminhibition nicht zu gefährden (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Dabei ist zu beachten, dass verwendete Lösungsmittel und pH-Werte der Substanzen mit den verwendeten Testmethoden kompatibel sind (Djuari & Londenberg *et al.,* 2023). In diesem Zusammenhang ließen sich in verschiedenen Studien

inhibierende Effekte auf CYP Enzyme durch organische Lösungsmittel ermitteln (Mori *et al.*,1985; Patil *et al.*, 2015). Unter idealen Vorraussetzungen, worunter eine möglichst geringe Assayinterferenz zu verstehen ist, erfolgt die Testung von Substanzen in wässrigen Medien und neutralem pH-Wert (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Für den Ames Test wird meistens DMSO aufgrund geringer Zytotoxizität und gutem Lösungsvermögen unterschiedlicher Substanzen angewendet (Maron *et al.*, 1983; Maron *et al.*, 1981; Amberg *et al.*, 2015). Dieses organische Lösungsmittel ist neben den bereits beschriebenen Eigenschaften durch gute Zellkompatibilität und geringer Reaktivität gegenüber organischen Testchemikalien charakterisiert (Maron *et al.*, 1983; Maron *et al.*, 1981; Amberg *et al*., 2015). Die zu verwendende DMSO Konzentration ist zudem abhängig vom jeweiligen Zellmodell. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass CYP2E aus Lebermikrosomen der Ratte am sensitivsten gegenüber den Lösungsmitteln DMSO, EtOH, MeOH und Aceton sind (Li *et al.*, 2010; Patil *et al.*, 2015). Der zugrunde liegende Endpunkt für die Beurteilung der Empfindlichkeit unterschiedlicher Zellen gegenüber einem Lösungsmittel stellt das Ausmaß der Hemmung des Zellwachstums dar (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023. Literaturdaten belegen in diesem Zusammenhang, dass speziell im *in vitro* Comet Assay eine Hemmung der Zellproliferation ab Konzentrationen > 0.5 % (v/v) in HepG2 Zellen auftritt, während eine Inhibition primärer Zellen erst ab Konzentrationen ≥ 2 % (v/v) nachweisbar ist (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Für kleinere *N*-Nitrosamine wie NDMA und NDELA konnte ein inhibierender Effekt durch DMSO basierend auf reduzierter metabolischer Aktivierung festgestellt werden (Mori *et al.*, 1985; Yahagi *et al.*, 1977). In der Literatur existieren Daten, die belegen, dass insbesondere die Mutagenität von NDMA durch DMSO gehemmt wird (Bringezu *et al.*, 2022). Neben den relevanten CYP-Isoformen spielen demnach Zellmodell, Substanz, Testmethode und Testsubstrat für die Wahl des Lösungsmittels eine Rolle (Djuari & Londenberg *et al.,* 2023; Bringezu *et al.*, 2022).

1.4 DNA-Addukte von *N*-Nitrosaminen

Aufgrund der Verfügbarkeit von Literaturdaten hinsichtlich der an der metabolischen Aktivierung von NDMA, NDELA, NNN und NMA beteiligten CYP Enzyme und resultierenden DNA-Addukten erfolgt in nachfolgenden Abschnitten eine genauere Beschreibung dieser vier Verbindungen (vgl. 1.4.1 - 1.4.4).

1.4.1 NDMA

Nach enzymatisch katalysierter Aktivierung von NDMA durch CYP2E1 und CYP2A6 via α-Hydroxylierung entstehen N7-MeG, N3-MeA und O^6-MeG als Hauptaddukte in humanen Lebermikrosomen (Yamazaki *et al.*, 1992; Den Engelse *et al.,* 1986). Dabei konnte festgestellt werden, dass CYP2E1 den größten Anteil an der metabolischen Aktivierung hat (Yamazaki *et al.*, 1992). In der folgenden Abbildung ist die metabolische Aktivierung von NDMA und die hauptsächlich induzierten DNA-Addukte in der Leber der Ratte nach 2 h Exposition und zugehörigen prozentualen Anteilen aufgeführt (s. Abb. 11). Nach CYP2E1 katalysierter α-Hydroxylierung von NDMA [1] entsteht N-Nitroso-Hydroxymethyl-methylamin [2], aus welchem nach Abspaltung von Formaldehyd und H_2O das instabile Methyldiazoniumion entsteht [3]. Nach spontanem Zerfall entsteht aus diesem das reaktive Methylcarbokation [4], welches nach Reaktion mit der DNA zu den Addukten N7-MeG [5], N3-MeA [6] und O^6-MeG [7] führt.

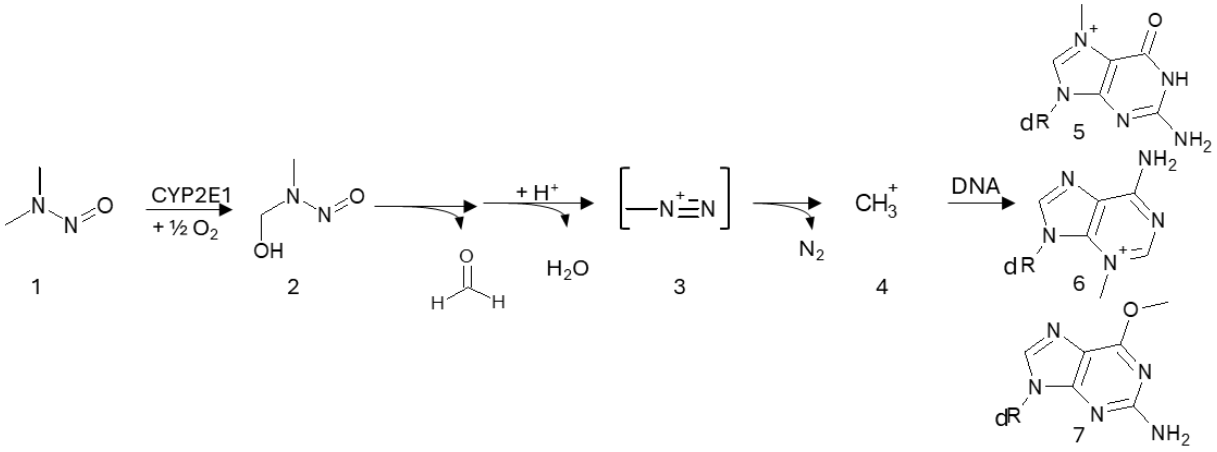

Abbildung 11: Metabolische Aktivierung von NDMA. Erläuterung zugrunde liegender Schritte s. Text. Hauptaddukte nach NDMA Exposition in der Ratte: N7-Methylguanin (N7-MeG), N3-Methyladenin (N3-MeA) und O^6-Methylguanin (O^6-MeG). Modifiziert nach Fahrer *et al*. 2017; Engelse *et al.*, 1986. Dargestellt mit ChemSketch.

Den Engelse stellte die *in vivo* Bildung dieser Addukte in Ratten fest, wobei der prozentuale Anteil gebildeter N7-MeG-Addukte an der Gesamtheit gebildeter Methylierungsaddukte nach 2 h zwischen 67-75 % lag, der Anteil gebildeter N3-MeA-Addukte bei 2 - 5 % und der Anteil gebildeter O^6-MeG-Addukte bei 6 - 8 % (Den Engelse *et al.*, 1986).

1.4.2 NDELA

NDELA wird durch CYP2E1 metabolisch aktiviert, wobei die Hydroxylierung sowohl am α-C-Atom als auch am β-C-Atom stattfinden kann (Liu *et al.*, 2008). Nach Hydroxylierung

entstehen hierbei *N*-Nitroso-2-Hydroxymorpholin sowie 2-Hydroxyethyldiazoniumionen, welche zur Bildung der beiden Addukte O^6-2-hydroxyethyl-2‘-deoxyguanosin (OHEdG) und 3-(2‘-deoxy-*ß*-D-*erythro*-pentofuranosyl)-5,6,7,9-tetrahydro-6,7-dihydroimidazo[1, 2-a]purin-9-on (gdG) in Lebermikrosomen der Ratte führen (Dennehy *et al.*, 2005; Loeppky, Chen *et al.*, 2002). Die Aktivierungswege von NDELA sind in nachfolgender Abbildung dargestellt (s. Abb. 12). Nach α-Hydroxylierung von NDELA [1] entsteht das instabile, α-Hydroxynitrosamin [2], das zum reaktiven 2-Hydroxyethyldiazoniumion [3] und zum Glykolaldehyd [4] zerfällt. Nach Bindung an die DNA entsteht schließlich OHEdG [8]. β-Hydroxylierung hat die Bildung des instabilen Aldehyd Isomers zur Folge [5], aus welchem *N*-Nitroso-2-Hydroxymorpholin (NHMOR) entsteht [6]. Nach Oxidation von NHMOR sowie des Glykolaldehyds [4] kann Glyoxal entstehen [7], welches im Anschluss mit der DNA reagiert und zur Entstehung von gdG führt [9] .

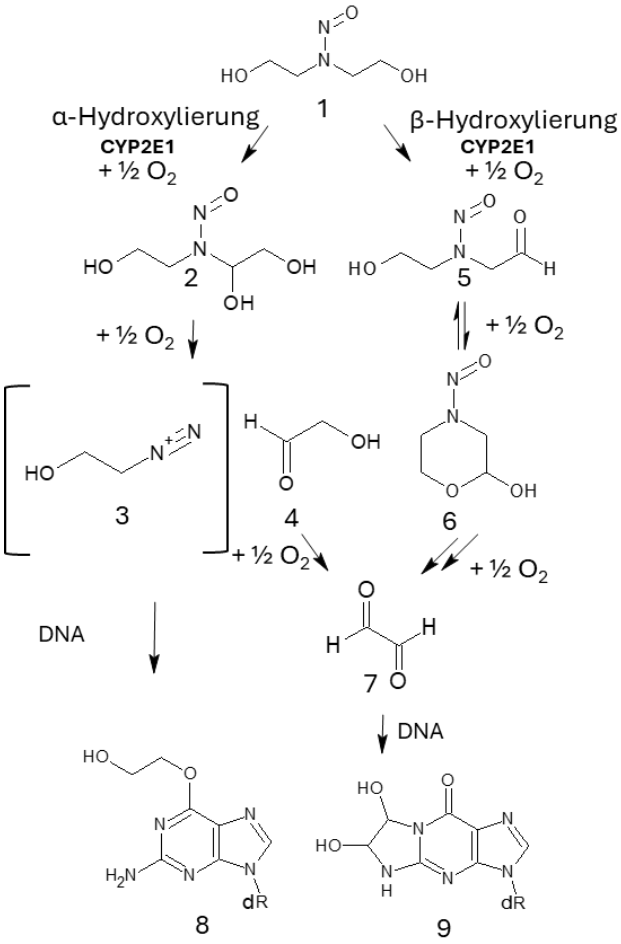

Abbildung 12: Metabolische Aktivierung von NDELA. Erläuterung zugrunde liegender Schritte s. Text. In Lebermikrosomen der Ratte gebildetete Hauptaddukte: OHEdG und gdG. Modifiziert nach Dennehy *et al*., 2005; Loeppky Chen *et al*., 2002. Dargestellt mit ChemSketch.

1.4.3 NNN

NNN wird durch CYP3A4 und durch CYP2A6 metabolisch aktiviert (Carlson *et al.*, 2021). Dabei erfolgt die α-Hydroxylierung durch CYP2A6 bevorzugt am C5-Atom des Pyrrolidinringes, während das C2-Atom die bevorzugte Targetstruktur von CYP3A4 darstellt (Patten *et al.*, 1997). CYP2A6 ist auch an der Hydroxylierung am C2-Atom beteiligt (Patten *et al.*, 1997). Die Aktivierungswege von NNN einschließlich gebildeter DNA-Addukte sind in Abbildung 13 dargestellt. Die Hydroxylierung von NNN [1] am 2‘-C-, sowie am 5‘-C-Atom des Pyrrolidinringes führt zur Entstehung von Hydroxy-NNN [2, 6]. Diese zerfallen spontan zu den entsprechenden reaktiven Diazoniumionen [3, 7], welche nach enzymatischer Hydrolyse und Reaktion mit der DNA zur Bildung der beiden Addukte N6-[4-(3-pyridyl)-4-oxo-1-butyl]-2'-deoxyadenosin (N^6-POB-dAdo) und N6-[4-oxo-1-(pyridin-3-yl)butyl]-2'-deoxyadenosin) (N^6-OPB-dAdo) führen [4, 8]. Aus N^6-POB-dAdo kann nach Reduktion N6-[4-(3-pyridyl)-4-hydroxy-1-butyl]-2'-deoxyadenosin (N^6-PHB-dAdo) entstehen [5]. Die Reduktion von N^6-OPB-dAdo führt zur Entstehung von N6-[4-hydroxy-1-(pyridin-3-yl)butyl]-2'-deoxyadenosin) (N^6-HPB-dAdo) [9]. N^6-OPB-dAdo steht im Gleichgewicht mit 6-[2-(3-pyridyl)-N-pyrrolidinyl-5-hydroxy]-2'-deoxynebularin (Py-Py-OH-dN) [10], das im Gleichgewicht mit der Schiff-Base steht [11]. Nach Reduktion entsteht 6-[2-(3-pyridyl)-*N*-pyrrolidinyl]-2'-deoxynebularin (Py-Py-dN) [12].

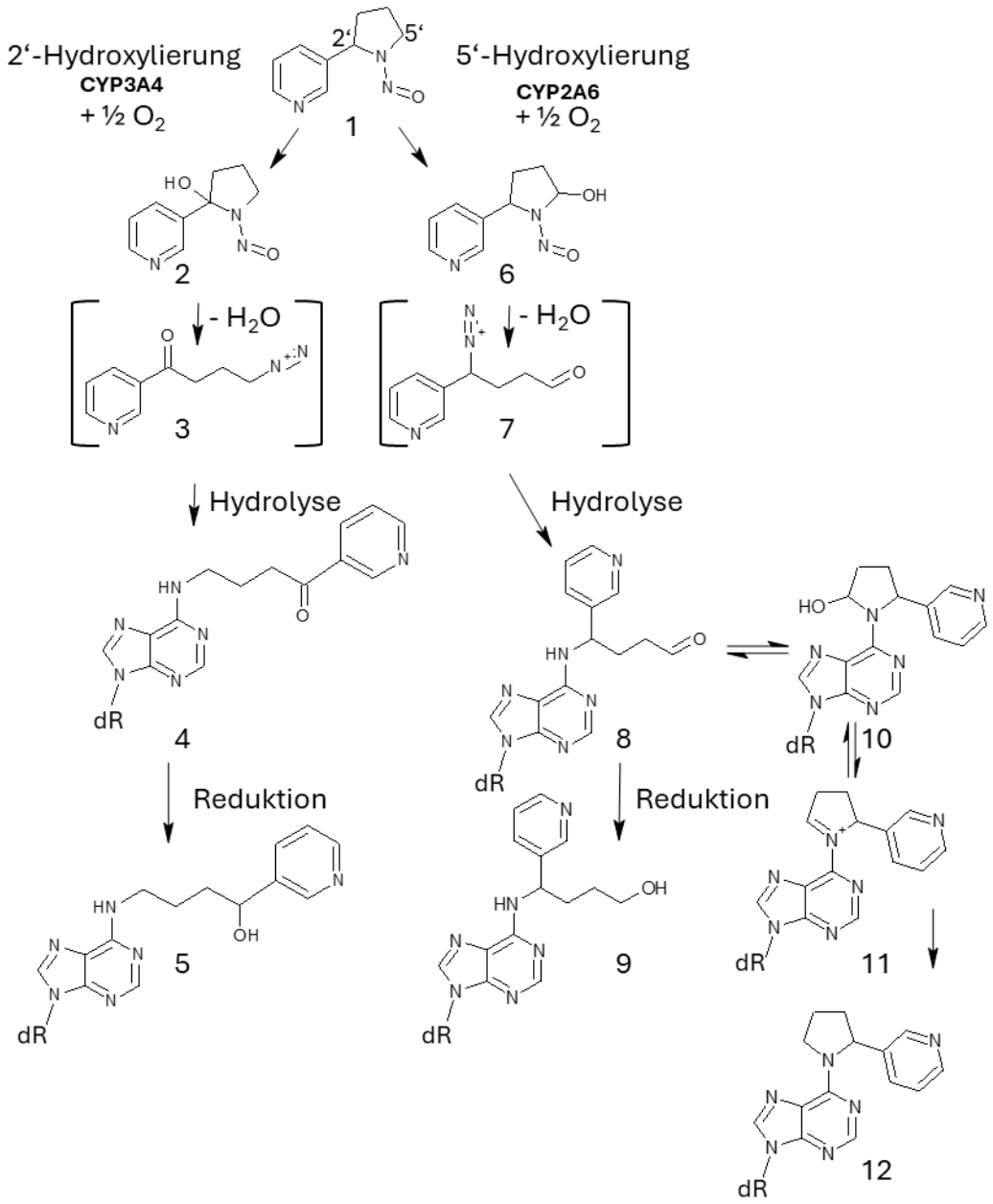

Abbildung 13: Metabolische Aktivierung von NNN. Erläuterung zugrunde liegender Schritte s. Text. *In vivo* und *in vitro* gebildete DNA-Addukte in der Ratte**.** Modifiziert nach Carlson *et al.*, 2021; Patten *et al.*, 1997. Dargestellt mit ChemSketch.

Der 2'-Hydroxylierungsweg scheint auf Basis zur Verfügung stehender Daten insbesondere im Ösophagus der Ratte von Bedeutung zu sein, während die 5'-Hydroxylierung in humanem Gewebe und Patasaffen als Hauptweg identifiziert werden konnte (Li *et al.*, 2021; Hecht *et al.*, 1982). Ferner ließen sich Unterschiede zwischen R-NNN und S-NNN für die beiden α-Hydroxylierungswege feststellen. So scheint die 2'-Hydroxylierung für S-NNN im Vergleich zur metabolischen Aktivierung von R-NNN bevorzugter Aktivierungsweg zu sein, was durch ein Stoffwechselverhältnis von 6.22 - 8.06 für S-NNN im Vergleich zu 1.12 - 1.33 für R-NNN demonstriert werden konnte

(McIntee *et al.*, 2000). Die Adduktbildung ist insbesondere in der Nagerspezies gut untersucht. Zu den nach 5-Hydroxylierung gebildeten Addukten in der Ratte zählen 2-[2-(3-pyridyl)-*N*-pyrrolidinyl]-2'-deoxyinosin (Py-Py-dI), (Py-Py-dN) sowie N^6-HPB-dAdo (vgl. Abb. 13; Li *et al.*, 2021). Zudem konnte Py-Py(OH)-dN detektiert werden (Abb. 13; Li *et al.*, 2021). Insbesondere Pyridyloxobutyladdukte, darunter O(6)-[4-oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanin (O^6-pobG), entstehen über den 2'-Hydroxylierungsweg nach Bildung eines elektrophilen Diazohydroxides und anschließender Freisetzung von 4-hydroxy-1-3-pyridyl-1-butanon (HPB) (Hecht *et al.*, 1999; Patten *et al.*, 1997).

1.4.4 NMA

NMA wird durch CYP2E1 metabolisch am α-C Atom hydroxyliert, was zur Entstehung eines reaktiven Benzendiazoniumion führt, das Addukte mit N^6-Adenin sowie 8-(Phenylazo)guaninaddukte bilden kann (Kroeger-Koepke *et al.*, 1981; Quan *et al.*, 1992; Carlsson *et al.*, 2025; Koepke *et al.*, 1990). Für eine genauere Charakterisierung der von NMA gebildeten Addukte sind weitere Studien notwendig.

1.5 Von MMS, CPA und TMZ gebildete DNA-Addukte

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem das direkt wirksame und im Hinblick auf DNA-Adduktbildung gut untersuchte Alkylanz MMS als Positivkontrolle eingesetzt, welches die DNA nach S_N2 Reaktion alkyliert und so die Bildung von N7-MeG und N3-MeA induziert (Carlsson *et al.*, 2025; Glaab *et al.*, 1999; Pascucci *et al.*, 2005). Als weitere Positivkontrolle diente CPA, das erst nach metabolischer Aktivierung zur Alkylierung der DNA führen kann. Die Bioaktivierung zum bifunktionellen Alkylanz Phosphoramidlost erfolgt nach CYP2B6 katalysierter Hydroxylierung am C4-Atom des Oxazaphosporinringes unter spontaner Abspaltung von Acrolein nach β-Eliminierung (De Jonge *et al.*, 2005). Die Reaktion von Phosphoramidlost mit Nukleophilen wie der DNA kann über die Entstehung von Aziridinyl-Ion-Intermediaten erfolgen (Flowers *et al.*, 2000). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass CPA sowohl zur Quervernetzung von Proteinen als auch der DNA führen kann (Shulman-Roskes *et al.*,1998; Colvin *et al.*, 1976; Povirk *et al.*, 1994). TMZ, das wie CPA als Zytostatikum angewendet wird und ebenfalls als Positivkontrolle in dieser Arbeit verwendet wurde, zerfällt spontan zu Methyltriazenoimidazol Carboxamid (MITC) (Fahrer *et al.*, 2023). Zur Alkylierung der DNA

führen die anschließend aus MITC entstehenden Carbeniumionen (Zhang *et al.*, 2012). Dabei entstehen neben N7-MeG N3-MeA und O^6-MeG (Zhang *et al.*, 2012).

1.6 DNA-Schadensantwort nach Alkylierungsschäden

Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben werden durch *N*-Nitrosamine Alkylierungsschäden in Form von DNA-Addukten induziert (Fahrer *et al.*, 2023). Die Art des gebildeten DNA-Adduktes ist abhängig von den strukturellen Eigenschaften des alkylierenden Agenz (Cross *et al*, 2021; vgl. Abschnitt 1.3.3). Zu den wichtigsten Reparaturwegen zur Behebung von kleineren DNA-Alkylierungsaddukten wie N7-MeG, N3-MeA, oder O^6-MeG, die durch *N*-Nitrosamine wie NDMA induzierten werden können, zählen die Basen-Exzisionreparatur (BER) sowie die direkte Schadensreversion über MGMT (Fahrer *et al.*, 2023). Für sperrige Addukte wie O^6-pobG, welches durch tabakspezifische Nitrosamine wie NNN induziert werden kann, konnte eine Beteiligung der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) sowie der MGMT demonstriert werden (Fahrer *et al.*, 2023; Mijal *et al.*, 2004; Urban *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2009). Werden DNA-Addukte wie O^6-MeG nicht durch die MGMT repariert, so kommt es nach der Basenfehlpaarung von O^6-MeG und Thymin und infolge weiter Replikationszyklen zur Aktivierung des Mismatch Repair (MMR) Systems sowie zunehmender Instabilität (Fahrer *et al.*, 2023). Dies hat die Induktion von Doppelstrangbrüchen aufgrund verstärkter Inkorporation von Thymin als Basenpartner von O^6-MeG und die Aktivierung der DNA-Schadensantwort zur Folge (Fahrer *et al.*, 2023). Der katalytische Prozess der MGMT vermittelten Reaktion soll im nachfolgenden Abschnitt näher erläutert werden, ebenso die biologischen Konsequenzen der nicht durch MGMT reparierten DNA-Addukte. Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die die Zusammenhänge zwischen den durch Alkyladdukten induzierten Reparaturwegen sowie der nach DNA-Strangbruchformation eingeleiteten DNA-Schadensantwort (vgl. Abb. 14).

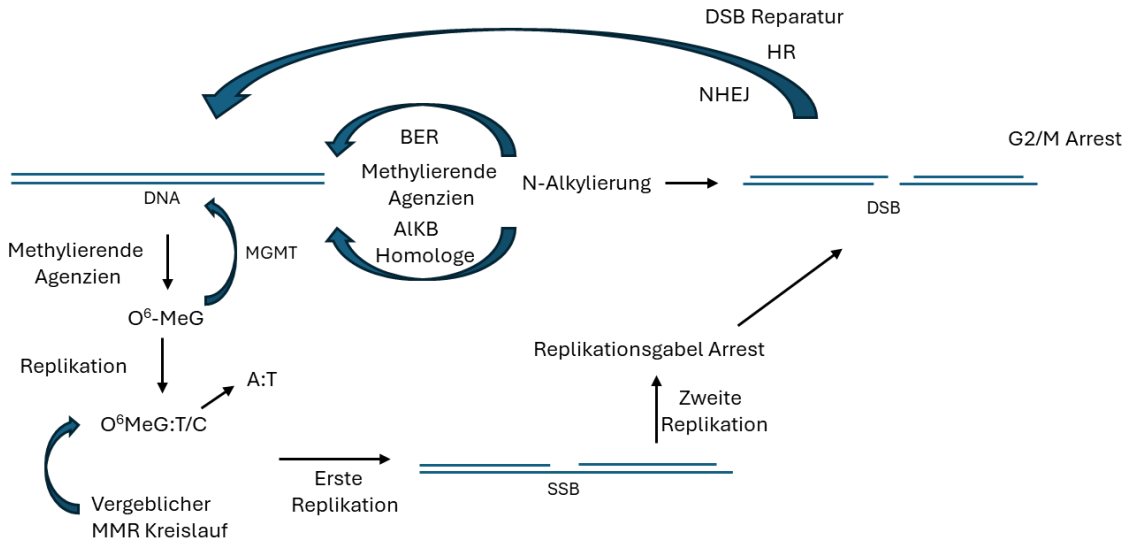

Abbildung 14: Durch alkylierende Agenzien induzierte DNA-Schäden und involvierte DNA-Reparaturwege. *Erläuterung s. Text.* Modifiziert nach Kondo *et al.*, 2010.

Die MGMT entfernt die Methylgruppe von O^6-MeG-Läsionen, wobei die DNA-Base Guanin wiederhergestellt wird (s. Abb. 14; Kondo *et al.*, 2010; Fahrer *et al.*, 2023). Falls diese Läsion nicht repariert wird, kommt es im darauffolgenden Replikationszyklus zur Entstehung von O^6-MeG:C oder O^6-MeG:T Fehlpaarungen (vgl. Abb. 14; Kondo *et al.*, 2010; Fahrer *et al.,* 2023). In der nächsten Replikationsrunde können O^6-MeG:T-Paare zu A:T-Übergangsmutationen werden (vgl. Abb. 14; Kondo *et al.*; 2010; Fahrer *et al.*, 2023). O^6-MeG:C und O^6-MeG:T Basenpaare werden vom Mismatch-Reparatursystem erkannt, welches DNA-Einzelstrangbrüche erzeugt, zum Replikationsstopp führt und schließlich einen DNA-Doppelstrangbruch induziert (s. Abb. 14; Kondo *et al.*, 2010). O^6MeG:T/C Läsionen verursachen keinen Zellzyklusarrest am ersten G2/M-DNA-Schadens-Checkpoint (s. Abb. 14; Kondo *et al.,* 2010). Im zweiten Zellzyklus wird häufig ein G2/M-Arrest beobachtet (vgl. Abb. 14; Kondo *et al.*, 2010). Homologe Rekombination und Nicht-Homologe End-zu-End Verknüpfung können eine Rolle bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen spielen (s. Abb. 14; Kondo *et al.*, 2010). N-Alkylierungen werden entweder durch Basen-Exzisionsreparatur (BER) oder AlkB-Homologe repariert (vgl. Abb. 14; Kondo *et al.*, 2010). Nicht reparierte N-Alkylierungsschäden führen zu Doppelstrangbrüchen (Abb. 14; Kondo *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die DNA-Schadensmarkerproteine p53 und γH2AX untersucht. Zum Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Zusammenhänge, beginnend nach Induktion des Schadens infolge der Exposition gegenüber alkylierenden Agenzien, einschließlich der

am Ende durch Signaltransuktion in Gang gesetzten zellulären Prozesse wird im Folgenden erklärt, an welcher Stelle p53 und γH2AX im Rahmen der DNA-Schadensantwortsignalkaskaden aktiviert werden, welche wesentlichen Wechselwirkungen zwischen den verschieden DNA Schadensantwortwegen bestehen und welche Downstream Effektorproteine zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität aktiviert werden.

1.6.1 Phosphatidylinositol 3-Kinasen ähnliche Kinasen ATM, ATR and DNA PKs

Unterschiedliche Noxen können DNA-schädigende Wirkung entfalten, darunter ionisierende Strahlung, karzinogene Substanzen aus der Umwelt sowie Zytostatika (Roos *et al.*, 2013). Die Schädigung der DNA führt zur Aktivierung dreier spezifischer Proteinkinasen, die im Folgenden die Initiierung von Signalkaskaden in Gang setzen, welche in Abhängigkeit des Schadens entweder zum Zellzyklusarrest, Reparatur der DNA oder dem Zelltod führen (Paull *et al.*, 2015). Bei den Signaltransduktionsproteinen handelt es sich um ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATR (ataxia telangiectasia and RAD3 related) und DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), welche jeweils unterschiedliche DNA-Schäden erkennen können und zur Familie der Serin/Threonin Kinasen mit bevorzugter Bindung an SQ/TQ Motiven zählen (Paull *et al.*, 2015). Die drei genannten Proteine gehören zur Familie der Phosphatidylinositol 3-Kinasenähnlichen Kinasen (PIKKs), die Komplexe mit anderen an der DNA-Schadensantwort beteiligten Proteinen bilden, anschließend an beschädigten Stellen der DNA binden sowie an der nachfolgenden DNA-Reparatur und schadensassoziierter Signaltransduktion beteiligt sind (Paull *et al.*, 2015). PIKKs teilen einige strukturelle Eigenschaften mit den Phosphatidylinositol 3-Kinasen (PI3Ks), darunter die katalytischen Loop Region, die Reste enthält, welche zur Koordinierung von ATP und zur Stabilisierung des Transitionzustandes der Phosphorylierungsreaktion bedeutsam sind (Paull *et al.*, 2015). In unmittelbarer Umgebung existieren konservierte Regionen wie die FRAP-ATM-TRRAP (FAT) (Transformations/Transkriptions Domäne-assoziierte Protein Domäne), N Terminal zur katalytischen Region gelegen sowie die FATC Region am C Terminus, die manchmal aus einer zweigeteilten Region bestehend aus der regulatorischen Domäne (PRD) sowie der FATC Domäne besteht (Paull *et al.,* 2015). Der strukturelle Aufbau von PIKKs am Beispiel ATM ist in nachfolgender Abbildung dargestellt (s. Abb. 15).

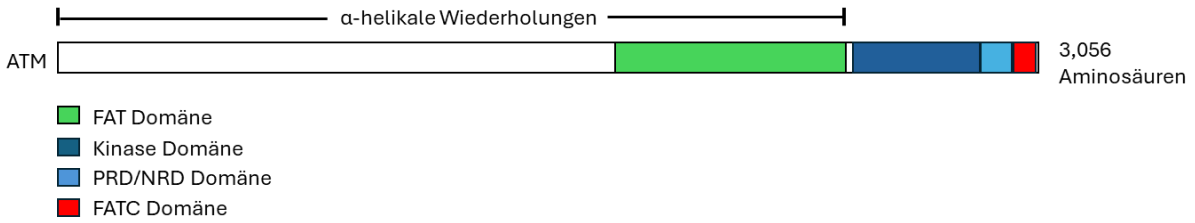

Abbildung 15: Struktureller Aufbau der Phosphatidylinositol 3-Kinasen ähnlichen Kinasen (PIKKs): ATM. Modifiziert nach Paull *et al.*, 2015.

1.6.2 Die ATM vermittelte DNA-Schadensantwort bei Doppelstrangbrüchen

ATM wird spezifisch nach Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) aktiviert und phosphoryliert, wobei der MRN-Komplex, bestehend aus den Proteinen Nbs1, Mre11 und Rad50, involviert ist (Paull *et al.*, 2015). Es handelt sich um einen hochkonservierten Komplex, der entscheidende Bedeutung für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen in allen Organismen hat (Stracker *et al.,* 2011; Williams *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang wurde für MRN defiziente Zellen eine beeinträchtigte DNA-Endprozessierung festgestellt, welche für Reparaturwege wie die homologe Rekombination (HR) sowie die Nicht Homologe End-zu-End Verknüpfung (NHEJ) notwendig ist (Paull *et al.*, 2015; Symington *et al.* 2011). MRN ist notwendig für die optimale ATM Aktivierung infolge eines Doppelstrangbruches (Uziel *et al.*, 2003). So konnte in Studien mit Ataxia-telangiectasia-like Disorder (ATLD) Zellen gezeigt werden, dass eine Mutation im Mre11 Gen, zur erheblich reduzierten Aktivierung von ATM nach DBS-Induktion führt (Taylor *et al.*, 2004; Uziel *et al.*, 2003). ATM kann durch den MRN Komplex jedoch auch in inhibierender Weise reguliert werden, was anhand von Mutationen im *RAD50* Gen demonstriert werden konnte (Paull *et al.*, 2015). Das ATM-Protein kommt im Zellkern als inaktives Homodimer vor, das infolge der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und oxidativem Stress durch Autophosphorylierung aktiviert wird und als Kinase eine große Menge verschiedener Substrate phosphoryliert (Paull *et al.*, 2015). Dies geschieht nach Autophosphorylierung an Serin 1981 (Ser1981), welches darüberhinaus bedeutsam für die Bindung an der geschädigten DNA und der Assoziation mit dem Mediatorprotein MDC1 ist (So *et al.*, 2009). Für die Autophosphorylierung von ATM spielt darüberhinaus die Acetyltransferase Tip60 eine Rolle, welche die Acetylierung von Lysin innerhalb der FATC Domäne von ATM, K3016, katalysiert (Paull *et al.*, 2015). Mutationen oder Depletionen in einem der an der Acetylierung beteiligten Proteine führt zum Ausbleiben der Phosphorylierung weiterer Zielproteine (Sun *et al.*, 2007). Die

Basenpaarlänge ist entscheidend für die Art der aktivierten PIKK (Paull *et al.* 2015). So erfolgt eine optimale Aktivierung von ATM durch längere DNA-Stränge > 1 kb (You *et al.*, 2007). You *et al.* konnte dies durch zeitabhängige Quantifizierung des phosporylierten ATM Proteins mithilfe von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge, die mit Xenopus Ei Extrakt inkubierten wurden, demonstrieren (You *et al.*, 2007). Phosphoryliertes ATM und Gesamt-ATM wurden durch Immunoblotting unter Verwendung spezifischer Antikörper markiert und mithilfe von mit Alexa Fluor 680 markierten Sekundärantikörpern durch ein Odyssey-Infrarot-Bildgebungssystem sichtbar gemacht (You *et al.*, 2007). Die ATM Aktivierung sowie die in Gang gesetzte Signaltransduktionskaskade zur Aktivierung der an der DNA-Schadensantwort beteiligten Proteine in Folge von Doppelstrangbrüchen ist in nachfolgender Abbildung schematisch dargestellt (s. Abb. 16). Phosphoryliertes ATM führt in der Folge zur Phosphorylierung von Proteinen, die an der DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest und Apoptose beteiligt sind, darunter CHK2, p53 und H2AX (vgl. Abb. 16; Smith *et al.*, 2020). Phosphorylierung von CHK2 an Threonin 68 (Thr68) führt nachfolgend zur Phosphorylierung von Cdc25A und Cdc25C Phosphatasen, was zu deren Inaktivierung/Degradation führt (s. Abb. 16; Smith *et al.*, 2020). Im Folgenden kommt es zum Zellzyklusarrest, da CDKs nicht mehr dephosphoryliert werden, was für die Zellzyklusprogression unabdingbar ist (Abb. 16; Smith *et al.*, 2020). Cdc25A Phosphatasen sind bedeutsam für die Aktivierung von CDK2, das für die Einleitung der S-Phase essentiell ist, während Cdc25C Phosphatasen zur Dephosphorylierung und damit Aktivierung des die M-Phase einleitenden CDK1 führen (s. Abb. 16; Smith *et al.*, 2020). ATM nimmt über die CHK2 Aktivierung insbesondere Einfluss auf den G1/S Kontrollpunkt innerhalb des Zellzyklus (vgl. Abb. 16; Smith *et al.*, 2020). Darüberhinaus wird der Zellzyklusarrest über die durch CHK2 katalysierte Phosphorylierung von p53 an Ser15 und Ser20 in Gang gesetzt, welches in der Folge stabilisiert wird und akkumuliert (Abb. 16; Smith *et al.*, 2020). P53 triggert die Transkription von *CDKN1A*, das für den cyclin abhängige Kinase Inhibitor p21 codiert, welches den G1 Zellzyklusarrest einleitet (vgl. Abb. 16; Smith *et al.*, 2020). Darüberhinaus führt p53 in aktiver Form zur Transkription proapoptotischer Gene wie *Puma, Noxa, BAX und Apaf*, welche den Zelltod einleiten (Smith *et al.*, 2020). P53 ist zudem an weiteren zellulären Prozessen wie DNA-Reparatur, Seneszenz und metabolischer Adaption beteiligt (Aubrey *et al.*, 2018).

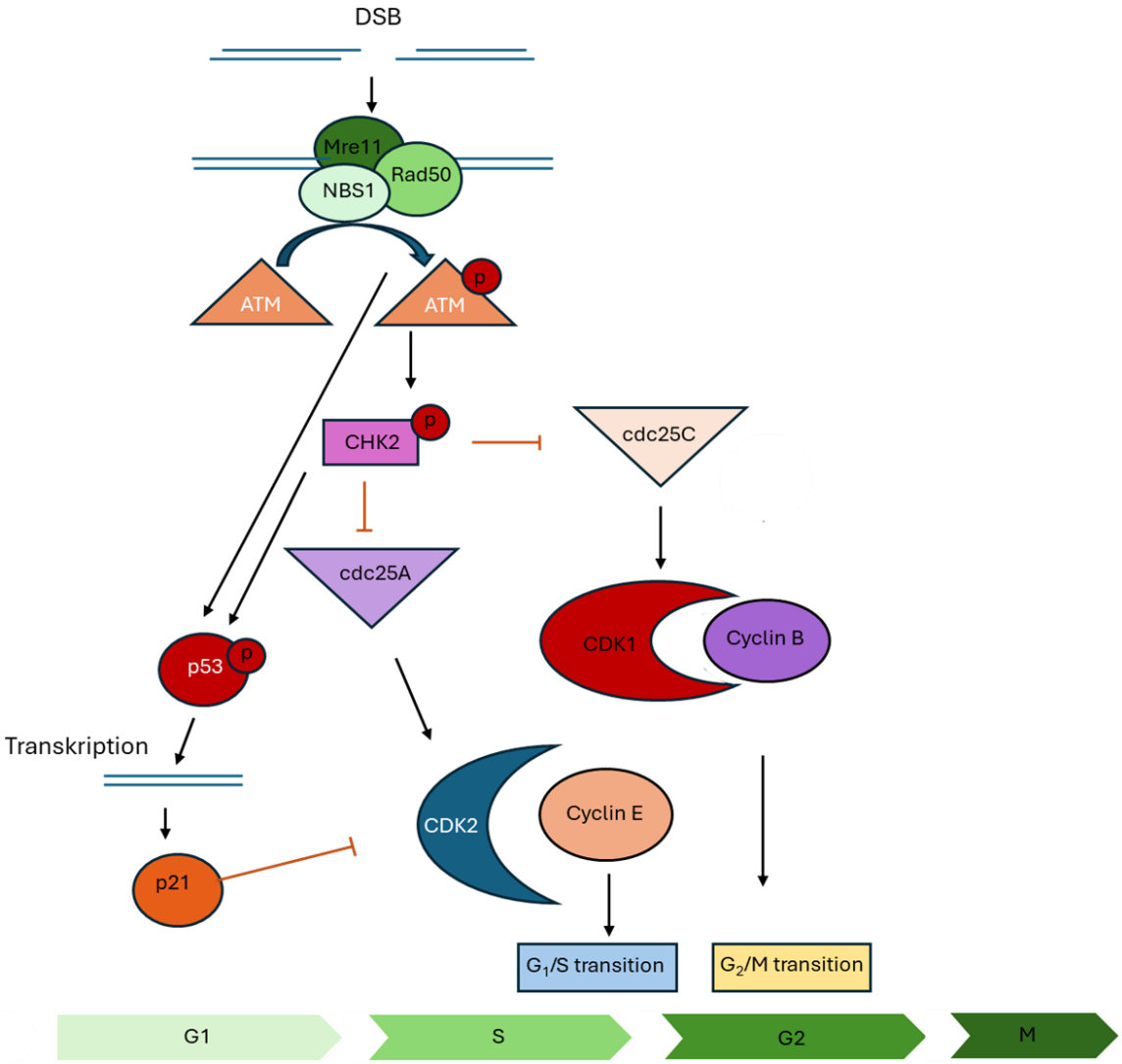

Abbildung 16: ATM Aktivierung nach Doppelstrangbrüchen. Überblick aller beteiligten Proteine der Signaltransduktionskaskade. Erläuterung zugrunde liegender Schritte s. Text. Modifiziert nach Smith *et al.*, 2020.

ATM hat eine entscheidende Bedeutung an der Reparatur von induzierten Doppelstrangbrüchen, die mit Heterochromatin assoziiert sind, was durch Konservierung von nach ionisierender Strahlung erzeugten, anhaltenden Schäden in einem Umfang von 10-15 % in ATM defizienten Zellen mithilfe des Doppelstrangbruchmarkerprotein γH2AX gezeigt werden konnte (Smith *et al.*, 2020). MDC1 wird durch γH2AX aktiviert und nach ATM vermittelter Phosphorylierung am Chromatin stabilisiert (Smith *et al.*, 2020). Dort führt es zur Relaxierung der DNA in der Nähe von Doppelstrangbrüchen und zur Translokation weiterer MRN Komplexe (Smith *et al.*, 2020). Interaktion von MDC1 und NBS1 führt zur Signalverstärkung entlang des Chromatins durch Aktivierung weiterer ATM Proteine, die an der Reparatur der DNA durch

NHEJ und HR beteiligt sind (Smith *et al.*, 2020). Die Phosphorylierung des p53 bindenden Proteins (53BP1) verhindert die Resektion des Doppelstrangbruchendes und fördert die Reparatur über den NHEJ Weg (Smith *et al.*, 2020; Panier *et al.*, 2014). Die ATM/CHK2 vermittelte Phosphorylierung des Gegenspielers, dem Breast-Cancer susceptibility gene 1 B (BRCA1) führt zur Aktivierung der HR (Smith *et al.*, 2020). Zusammengefasst ist ATM entscheidend für den Prozess des Chromatin Remodellings. (Smith *et al.*, 2020).

1.6.3 Die ATR vermittelte DNA-Schadensantwort bei DNA-Einzelsträngen und Replikationsstress

ATR bindet und erkennt selektiv einzelsträngige DNA (Paull *et al.*, 2015). Eine Aktivierung von ATR erfolgt zudem durch Stressoren, die zur Blockade oder Verlangsamung von DNA-Polymerasen und damit zu Replikationstress führen, beispielsweise durch Polymerase-Inhibitoren oder UV-Strahlung (Saldivar *et al.*, 2017). Die Prozesse der ATR vermittelten DNA Schadensantwort sind nachfolgend aufgeführt (s. Abb. 17). Die ATR vermittelte Signalkaskade wird durch Bindung des Replikationsproteins A (RPA) getriggert, welches durch Wechselwirkungen mit der einzelsträngigen DNA zur Rekrutierung weiterer, an der Signalkaskade beteiligten Proteinen führt (s. Abb. 17; Saldivar *et al.*, 2017). ATR wird am Threonin-Rest innerhalb der FAT Domäne, Thr1989, autophosphoryliert, was womöglich die Bindung an Topoisomerase-II-Bindungsprotein (TOPBP1) erleichtert (vgl. Abb. 17; Saldivar *et al.*, 2017). TOPBP1 erleichtert die Aktivierung und die Substratbindung von ATR (s. Abb. 17; Saldivar *et al.*, 2017). Ewing Tumorassoziiertes Antigen 1 (ETAA1) weist eine ATR Aktivierungsdomäne (AAD) auf, tritt in Wechselwirkung mit RPA und wird so zu blockierten Replikationsgabeln geleitet (vgl. Abb. 17; Saldivar *et al.*, 2017).

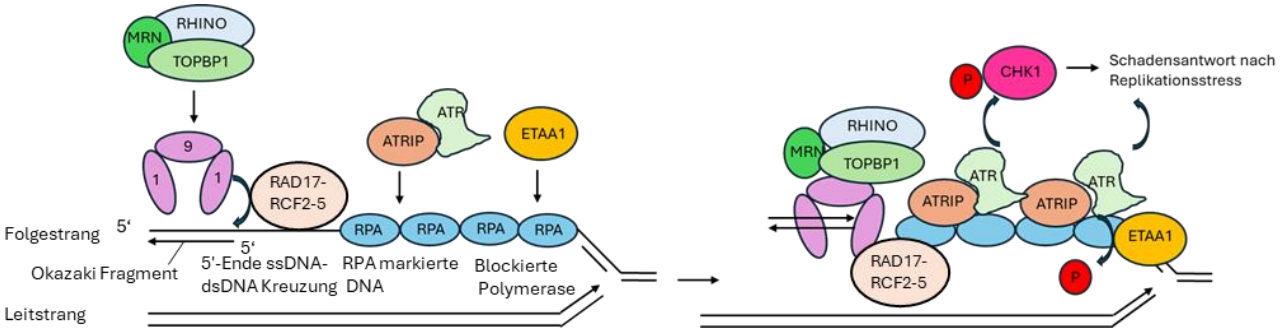

Abbildung 17: An der Aktivierung von ATR beteiligte Proteine und nachfolgende Phosphorylierung von CHK1. Erläuterung wesentlicher Schritte s. Text. Modifiziert nach Saldivar *et al.*, 2017.

Während die Rekrutierung von TOPBP1 von einer 5‘-ssDNA-Doppelstrang-DNA (dsDNA)-Verbindung abhängig ist, welche als Startpunkt für den RAD9-RAD1-HUS1- (9-1-1)

Komplex und nachfolgender Stimulierung der ATR Kinase Aktivität dient, existieren Daten die darauf hinweisen, dass die Aktivierung von ATR durch ETAA1 unabhängig vom 9-1-1 Komplex erfolgt. ETAA1 ist an der Amplifizierung des ATR signallings ohne Generierung zusätzlicher 5‘-Ende Verbindungen beteiligt (Saldivar *et al.*, 2017). Die Beladung der DNA durch den 9-1-1-Komplex erfolgt durch Untereinheiten des RAD17 Replikationsfaktor C, darunter 2-5 (RFC 2-5) (Saldivar *et al.*, 2017). Die Bindung von TOPBP1 an den 9-1-1-Komplex ist teilweise abhängig vom MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) Komplex und von RAD9-RAD1-HUS1 interagierenden Komplex (RHINO) (Saldivar *et al.*, 2017). Infolge der TOPBP1 Bindung an den 9-1-1-Komplex triggert dieses Protein durch Interaktion mit ATR-ATRIP über eine ATR Aktivierungsdomäne (AAD) die Aktivierung von ATR (Saldivar *et al.*, 2017). In der Folge wird die Kinase CHK1 nach ATR vermittelter Phosphorylierung an Serin 345 aktiviert, welche dann an Serin 296 autophosphoryliert wird und zusammen mit ATR zum Zellzyklusarrest, Unterdrückung der weiteren Signalweiterleitung, Stabilisierung, Reparatur sowie Neustart der Replikationsgabeln führt (Smith *et al*. 2020; Saldivar *et al.*, 2017). Auf diesem Weg wird die Zellteilung bei Vorliegen gestörter Replikationsgabeln durch ATR und CHK1 verhindert (Saldivar *et al.*, 2017). CHK1 führt durch Phosphorylierung der Phosphatasen CDC25A, CDC25B und CDC25C zu deren Inaktivierung durch Unterdrückung der Dephosphorylierung der CDK1 und CDK2, welche für die Zellzyklusprogression unverzichtbar sind (Saldivar *et al.*, 2017). Durch Inhibierung von CDK2 wird der Eintritt in die S-Phase und die Progression des Zellzyklus verhindert, während durch Inhibierung von CDK1 die Unterdrückung des Eintrittes in die Mitose erfolgt (Smith *et al.*, 2020). Innerhalb einer CRISPR Screenings konnte demonstriert werden, dass CDC25A das bedeutendste Zielprotein von ATR darstellt (Saldivar *et al.*, 2017). Über den ATR-CHK1-WEE1 Weg wird hauptsächlich die Aktivierung des S und G2/M Phasencheckpunkt getriggert (Smith *et al*., 2020). WEE1 ist eine Tyrosinkinase, die auf direktem Weg mit Histon H2B interagiert, um am Ende der S-Phase die Transkription von Histonen zu arretieren (Edwards *et al.*, 2022). Dabei kommt es zur Regulierung der G2-M Transition und verknüpftem Zellzyklusarrest durch Inaktivierung des CDK2/Cyclin B Komplexes, woraufhin im Folgenden die DNA-Reparatur eingeleitet werden kann (Edwards *et al.*, 2022). Durch ATR aktiviertes CHK1 führt darüberhinaus, ähnlich wie ATM via aktiviertem CHK2, zur Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 (Yi-Hung *et al.*, 2005). Darüberhinaus vermag ATR p53 auch direkt über Phosphorylierung von Ser15 zu

aktivieren (Yi-Hung *et al.*, 2005). CHK1 und CHK2 aktivieren p53 durch Phosphorylierung weiterer Aminosäurereste innerhalb des N-Terminus, darunter Thr18 und Ser37, was die Interaktion mit dem an der Acetylierung von p53 involvierten Enzym p300/CBP verstärkt und damit die DNA-Bindung von p53 und die Rekrutierung weiter Coaktivatoren nach DNA-Schädigung triggert (Yi-Hung *et al.*, 2005). Zudem konnten von Yi-Hung *et al.* weitere Reste im C-Terminus von p53 identifiziert werden, welche von den Proteinkinasen CHK1 und CHK2 phosphoryliert werden (Yi-Hung *et al.*, 2005). Nach erfolgter Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 werden in Abhängigkeit der Art der Läsion sowie des Schadensausmaßes die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Prozesse wie Apoptose, Zellzyklusarrest sowie DNA-Reparatur eingeleitet (Yi-Hung *et al.*, 2005). Für ein weiteres Zielprotein, H2AX, war die Spezifität zur Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen bislang bekannt, welche beispielsweise nach ionisierender Strahlung auftreten (Ward *et al.*, 2001). Ward und Coautoren zeigen, dass das DNA-Schadensmarkerprotein H2AX auch nach exogenen Noxen, die zu Replikationstress führen können, wie Hydroxyurea oder UV-Strahlung, phosphoryliert und damit aktiviert wird (Ward *et al.*, 2001). Dabei wurde die Beteiligung von ATR innerhalb der Reaktionskaskade demonstriert, welches zur Rekrutierung von Reparaturproteinen, darunter PCNA, BRCA1 und 53BP1 an die arretierte Replikationsgabel in der S-Phase führt (Ward *et al.*, 2001).

1.6.4 DNA-PK vermittelte DNA-Schadensantwort bei Doppelstrangbrüchen

DNA-PK weist ein Molekulargewicht von 469 kDa auf und wird durch das *PRKDC Gen* im Menschen codiert (Goodwin *et al.*, 2014). Ähnlich wie ATM wird DNA-PK spezifisch nach Doppelstrangbrüchen rekrutiert (Falck *et al.*, 2005). In diesem Zusammenhang bildet DNA-PK mit Ku70/80 das DNA-PK Holoenzym (Falck *et al.*, 2005). Dabei wird dem konservierten C-Terminus von Ku80 eine besondere Rolle zuteil, da dieser in entscheidender Weise zur effizienten Bindung der DNA-PK an die DNA beiträgt (Falck *et al.*, 2005, Gell *et al.*,1999, Singleton *et al.*, 1999). Autophosphorylierung am Threoninrest 2609 ist die Vorraussetzung für die Aktivierung der DNA-PK und ist abhängig von C-Terminus der Ku80 Untereinheit, was anhand von Ku80-defizienten Xrs-6Y Hamsterzellen, die humane DNA-Pks exprimieren, gezeigt werden konnte (Chan *et al.*, 2002; Douglas *et al.*, 2002; Rothkamm *et al.*, 2003). Sowohl in Ku80 Zellen, in welchen die Ku80 Untereinheit inaktiv war, als auch Zellen, in denen DNA-PK inaktiviert vorlagen, kam es zur Beeinträchtigung der DNA-Reparatur (Falck *et al.*, 2005). Somit ist für die effiziente

DNA-Reparatur die Aktivierung der DNA-PK durch Ku80 mit intakter C Untereinheit essentiell (Falck *et al.*, 2005). Ser2056 ist für die Phosphorylierung und der damit einhergehenden Aktivierung der DNA-PK bedeutsam (Goodwin *et al.*, 2014). Zum Zusammenbau des aktiven DNA-Reparaturkomplexes, bestehend aus DNA-PK und dem Ku Heterodimer ist lineare DNA, wobei Ku nach Bindung an freie Enden der DNA zur Rekrutierung von DNA-PK beiträgt, Voraussetzung (Falck *et al.*, 2005). Durch die Bindung des Ku70-Ku80 an die DNA PK ensteht der DNA-PK Komplex, der an der DNA-Reparatur über die NHEJ beteiligt ist (Lovejoy *et al.*, 2009). Zu den Zielproteinen des aktivierten DNA-PK Komplexes im Rahmen der NHEJ zählen Artemis, XRCC4 (X-Ray Repair Cross Complementing 4), XRCC4-like Factor (XLF) sowie die DNA Ligase IV (Panier *et al.*, 2014). Dieser Reparaturweg findet im Vergleich zur HR, die ausschließlich während der späten S und G2 Phase abläuft, während des Zellzyklus statt (Heyer *et al.*, 2010). Die an der DNA-Schadensantwort beteiligten Proteine im Rahmen der NHEJ sind nachfolgend schematisch dargestellt (s. Abb. 18). Die Bindung des Ku70-Ku80 Heterodimers an die DNA-Enden führt zur Rekrutierung der DNA abhängigen Proteinkinase katalytischen Untereinheit DNA PKs (s. Abb. 18; Panier *et al.*, 2014; Lieber *et al.*, 2010). Zu den wesentlichen Funktionen der DNA PKs zählt es, die Nähe zwischen gebrochenen DNA-Enden aufrecht zu erhalten und Endverarbeitungsfaktoren wie Tyrosyl-DNA, Phosphodiesterase 1 (TDP1), Artemis, Polynukleotid Kinase/Phosphatase (PNKP) und AP Endonuklease 1 (APE1) zu rekrutieren, die mithilfe des X-Ray Repair Cross Complementing Protein 4 Komplex (XRCC4)–XRCC4-like Factor (XLF)–DNA-Ligase 4 (LIG4) die Wiedereinfügung der DNA vorbereiten (vgl. Abb. 18; Panier *et al.*, 2014; Lieber *et al.*, 2010).

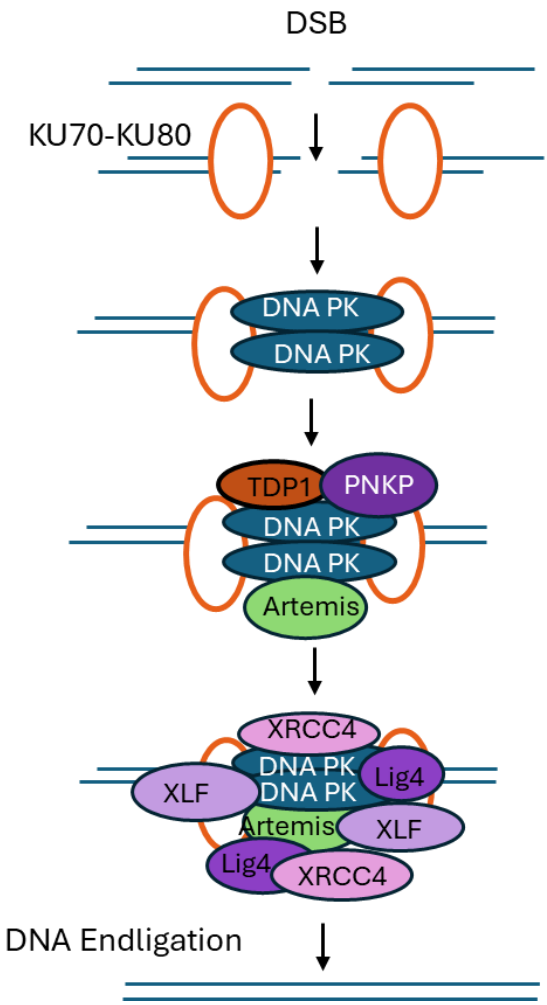

Abbildung 18: Nicht Homologe End-zu-End Verknüpfung und beteiligte Proteine (NHEJ). Erläuterungen der zugrunde liegenden Schritten s. Text. Modifiziert nach Panier *et al.*, 2014.

Zudem erfolgt die direkte oder indirekte Phosphorylierung von H2AX an Serin 139 über das DNA-PK Holoenzym DNA-PKs (direkt) oder dem Akt/GSK3b Signaling (indirekt), welches im Folgenden die Rekrutierung von Reparaturfaktoren an Stellen des Doppelstrangbruches fördert und die zur Reparatur erforderlichen Signalkaskaden koordiniert (Jing *et al.*, 2010). In diesem Zusammenhang wurde das Protein Akt als Substrat der DNA-PK identifiziert (Jing *et al.*, 2010). Nach Phosphorylierung von Akt an Ser473 durch DNA-PK kommt es zur Akt vermittelten Phosphorylierung von GSK3β an Serin 9 (Jing *et al.*, 2010). Dies führt zur Aufhebung der negativen Regulierung des γH2AX Levels (Jing *et al.*, 2010; Cross *et al.*, 1995). Neben der Aktivierung von den am NHEJ DNA Reparaturweg assoziierten Proteinen erfolgt durch DNA-PK auch die Phosphorylierung von p53 an Ser15, wodurch der Zelltod nach vorausgehender Abdissoziation des negativen Effektorproteins von p53, RPA70, eingeleitet wird (Goodwin *et al.*, 2014).

Studien deuten darüberhinaus darauf hin, dass DNA-PK zudem den programmierten Zelltod nach vorausgehenden Expositionen gegenüber apoptoseinitiierenden Faktoren über Bindung von p53 fördern, wodurch die Transkription des zum Arretieren des Zellzyklus wichtigen Proteins p21 unterdrückt wird (Goodwin *et al.*, 2014). Für eine genauere Aufklärung der komplexen DNA-PK-p53 Co-Regulierung sind jedoch weitere Studien notwendig (Goodwin *et al.*, 2014). RPA32 ist ein weiteres Substrat von DNA-PK (Ashley *et al.*, 2014). RPA32 wird an Ser23 und Ser29 durch CDKs während des Zellzyklus und nach Replikationsstress durch ATR an Ser33 sowie an Ser4/Ser8 durch DNA-PK phosphoryliert (Ashley *et al.*, 2014). Darüberhinaus sind weitere PIKKs wie DNA-PK an der Phosphorylierung von Ser12 und Thr21 von RPA32 beteiligt (Anantha *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2001; Ashley *et al.*, 2014). Ashley *et al.* konnte zeigen, dass die DNA-PK vermittelte Phosphorylierung von RPA32 an Ser4/Ser8 infolge von Replikationstress eine wichtige Rolle für die Wahrung der genomischen Stabilität durch beispielsweise nachfolgende Aktivierung von CHK1, Aufrechterhaltung des G2/M Checkpunkt Arrestes, Verhinderung eines vorzeitigen Startes beeinträchtigter Replikationsgabeln und effizienter DNA-Reparatur hat (Ashley *et al.*, 2014).

1.7 Reparatur von DNA-Alkylierungsschäden

Für die unterschiedlichen Addukte, welche durch alkylierende Agenzien induziert werden, erfolgt die Reparatur über verschiedene Wege (Fahrer *et al.*, 2023). Diese unterscheiden sich im Hinblick auf Spezifität zum Adduktsubstrat sowie hinsichtlich der Anzahl beteilgter Proteine (Fahrer *et al.*, 2023). Enzyme der AlkB Homologen (ALKBH) Demethylasen können N3-MeC, N3-MeT, N1-MeG und N1-MeA durch Revertierung der Methylgruppe direkt reparieren (Fahrer *et al.*, 2023). N1-MeA und N3-MeC können nach Exposition gegenüber NDMA entstehen (Den Engelse *et al.*, 1986; Fahrer *et al.*, 2023). Geradkettige Alkylläsionen wie beispielsweise N3-A, N3-G und N7-G werden durch die Basen-Exzisionsreparatur (BER) entfernt (Fahrer *et al.*, 2023; Den Engelse *et al.*, 1986; Kroeger-Koepke *et al.*, 1981; Pascucci *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2024). Hierzu zählen N3-MeG, N3-MeA und N7-MeG, welche nach Exposition gegenüber TMZ gebildet werden können (Fahrer *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2012). MMS und NDMA induzieren N7-MeG-, und N3-MeG-Addukte (Den Engelse *et al.*, 1986; Glaab *et al.*,1999; Fahrer *et al.*, 2023). Die MGMT entfernt Alkylgruppen von O^6 -, und O^4 Positionen der DNA Base Guanin, wobei es sich hierbei wie bei der Reparatur über die Enzymfamilie der AlkB homologen Proteine um eine

direkte Schadensreversion handelt (Fahrer *et al.*, 2023). Nicht reparierte Läsionen wie O^6-MeG werden in diesem Zusammenhang durch das Basenfehlpaarungssystem prozessiert (MMR) (Fahrer *et al.*, 2023). O^6-MeG kann nach Exposition gegenüber MMS, TMZ und NDMA auftreten (Fahrer *et al.*, 2023; Den Engelse *et al.*, 1986; Glaab *et al.*,1999) Die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) ist an der Reparatur von sperrigen Addukten beteiligt (Fahrer *et al.*, 2023). Hierzu zählt O^6-pobG, das nach Exposition gegenüber NNN auftreten kann (Li *et al.*, 2009; Fahrer *et al.*, 2023). Sowohl innerhalb der MMR als auch im Rahmen der BER können DNA-Strangbrüche entstehen (Fahrer *et al.*, 2023). Im Verlaufe der BER kommt es hierbei sowohl innerhalb des short-patch Weges als auch innerhalb des long-patch Weges zur Entstehung von Einzelstrangbruchintermediaten (Eustermann *et al.*, 2015; Langelier *et al.*, 2011). Diese entstehen wie in Abschnitt 1.7.3 beschrieben nach Inzision des Phosphodiesterrückgrates durch die AP Endonuklease (APE1) (Fahrer *et al.*, 2023). Im Vergleich zu den Einzelstrangbruchintermediaten, die im Rahmen der BER enstehen, ist die Induktion toxischer Doppelstrangbrüchen während der MMR auf einen fehlerhaften Reparaturmechanismus nach Auftreten von O^6-MeG-Addukten zurückzuführen (Fahrer *et al.*, 2023; Duckett *et al.*, 1996; Mojas *et al.*, 2007; Ochs *et al.*, 2000). Auf diesen wird in Abschnitt 1.7.2 näher eingegangen. Aufgrund der Induktion von O^6-MeG, N3-MeA, N7-MeG durch NDMA, MMS und TMZ sowie O^6-pobG durch NNN werden die involvierten Reparaturwege entsprechender Alkylierungsschäden in diesem Abschnitt näher erläutert (Fahrer *et al.*, 2023).

1.7.1 O^6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase

Ein Mechanismus der direkten Schadensreversion wird durch die O^6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) katalysiert (Fahrer *et al.*, 2023). Zum Substratspektrum der MGMT zählen O^6-MeG-, und O^4-MeT-Addukte, wobei die Reparatur von letztgenanntem Addukt vielfach langsamer abläuft (Zak *et al.*, 1994). Für diese beiden Läsionen ist die MGMT vermittelte Reparatur am bedeutendsten (Fahrer *et al.*, 2023). Darüberhinaus werden sperrige Addukte wie die durch tabakspezifische *N*-Nitrosamine wie NNN und NNK gebildeteten O^6-pobG-Addukte von der MGMT repariert (Fahrer *et al.*, 2023; Coulter *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1999). Alkyl-Addukte wie 2-Hydroxyethyl-Addukte zählen auch zum Substratspektrum der MGMT, wobei die Effizienz der Reparatur mit der Länge der Alkylkette abnimmt (Pegg *et al.*, 1990). MGMT kann zudem O^6-ClEtG reparieren, ein beispielsweise vom Nitrosamid Carmustin induziertes Addukt (Fahrer *et al.*, 2023).

Methylgruppen von Methylphosphotriestern können hingegen nicht repariert werden (Sassanfar *et al.*, 1991). In Zellen von Nagern konnte gezeigt werden, dass die Schadenserkennung der MGMT mit transkriptionaler Regulation verknüpft ist, die infolge der Exposition gegenüber alkylierenden Agenzien zunimmt (Grombacher *et al.*, 1998; Harris *et al.*, 1996; Blough *et al.*, 2007; Srivenugopal *et al.*, 2001). Die basale MGMT-Expression im Nager wird durch p53 und Sp1 reguliert (Grombacher *et al.*, 1998; Harris *et al.*, 1996; Blough *et al.*, 2007; Srivenugopal *et al.*, 2001). So konnte gezeigt werden, dass p53 an Sp1 bindet und den Transkriptionsfaktor sequestriert, was dessen Bindung an den MGMT-Promotor und damit die MGMT-Expression verhindert (Bocangel *et al.*, 2009). Auch in humanen Zellen konnte eine Sp1 vermittelte Regulierung demonstriert werden (Aasland *et al.*, 2018). Die Expression und Aktivität des Enzyms wird im Menschen durch Polymorphismen in der Promoterregion sowie in der Genregion der MGMT beeinflusst, was zu großen Unterschieden zwischen Individuuen führt (Margison *et al.*, 2003). Darüberhinaus wird die MGMT-Expression epigenetisch und transkriptional reguliert (Fahrer *et al.*, 2023). So führt eine Methylierung innerhalb der CpG Inseln im Bereich von -249 bis -103 und im Bereich von +107 bis +196 zum transkriptionalem Silencing (Costello *et al.*, 1994; Tano *et al.*, 1990; Harris *et al.*, 1991; Qian *et al.*, 1995; Qian *et al.*,1997). In Konsequenz existieren große Unterschiede der MGMT-Aktivität zwischen verschiedenen Individuuen und Organen, wobei das MGMT-Expressionslevel in der Leber am größten und im Gehirn sowie im myeloiden Gewebe und in hämatopoetischen Stammzellen am geringsten ist (Christmann *et al.*, 2011). Auf Proteinebene ist die Aktivität der MGMT in der Leber von Nagern sowie in kultivierten Zellen durch natürliche Substanzen und durch Medikamente beeinflussbar (Niture *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2003). So führt Curcumin zu einem Anstieg des MGMT-Levels, während S-Nitroso-N-Acetylpenicillamine zu einer Herunterregulierung der MGMT-Expression in humanen Gliomzellen führt (Tsai *et al.*, 2019). Der Mechanismus, welcher der DNA-Reparatur durch die MGMT zugrunde liegt soll aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verbindungen TMZ und NDMA näher erklärt werden, da diese das MGMT Substrat O^6-MeG erzeugen können (Den Engelse *et al.*,1986; Zhang *et al.*, 2012; Fahrer *et al.*, 2023). In nachfolgender Abbildung ist der von der MGMT katalysierte Reparaturmechanismus dargestellt (s. Abb. 19) . Im Verlauf der MGMT vermittelten Schadensreversion wird Guanin durch Transfer von Alkylgruppen auf die eigene Aminosäure Cystein (Cys145) im aktiven Zentrum in einer

Einschritt-Reaktion regeneriert, was zur Inaktivierung des Enzyms führt (vgl. Abb. 19; Sassanfar *et al.*, 1991; Koike *et al.*, 1990). Im Anschluss wird die MGMT ubiquitiniert und proteosomal abgebaut (s. Abb. 19, Xu-Wellifer *et al.*, 2002). Es zählt damit zu den direkten Schadenreversionsenzymen (Fahrer *et al.*, 2023). Dabei hängt die Reparaturkapazität für O^6-MeG vom zellulären MGMT-Level ab (Fahrer *et al.*, 2023; Harris *et al.*, 1991).

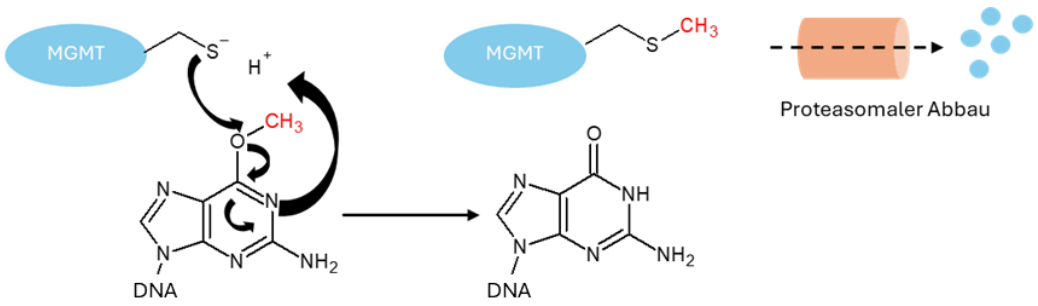

Abbildung 19: Reparatur von O^6-Methylguanin-Addukten durch die O^6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) und anschließender proteosomaler Abbau. Zugrunde liegende Schritte der Schadensreversion s. Text. Modifiziert nach Fahrer *et al.*, 2023. Dargestellt mit Chemsketch.

1.7.2 Basenfehlpaarungsreparatur

Insbesondere aufgrund der Induktion von O^6-MeG Addukten durch NDMA soll nun der Mechanismus der Basenfehlpaarungsreparatur (MMR) näher beschrieben werden (Den Engelse *et al.*, 1986; Fahrer *et al.*, 2023). Innerhalb der Basenfehlpaarungsreparatur werden Basenfehlpaarungen, chemisch modifizierte Basen sowie Insertions/Deletionsloops entfernt (Olave *et al.*, 2021). Der zugrunde liegende Mechanismus ist nachfolgend schematisch dargestellt (vgl. Abb.20). Der Mismatch Reparaturweg wird im Wesentlichen in drei Schritte unterteilt (vgl. Abb. 20; Olave *et al.*, 2021). Im ersten Schritt erfolgt die Erkennung des DNA-Schadens durch den MutSα Komplex, welcher aus MSH2 und MSH6 besteht, gefolgt von der Rekrutierung des Proliferating Cell Nuclear Antigens (PCNA) und Replikations Faktors-C (RFC) (s. Abb. 20; Olave *et al.*, 2021). Im zweiten Schritt werden fehlerhafte Basen oder Nukleotide durch den MutLα Komplex, bestehend aus MLH1 und PMS2, entfernt (Abb. 20; Olave *et al.*, 2021). Der dritte Schritt besteht in der Synthese des neuen Stranges, der finalen Reparatur und schließlich der Ligatur der DNA-Enden (vgl. Abb. 20; Olave *et al.*, 2021). Durch Mutationen hervorgerufene Defizite in der Basenfehlpaarungreparatur führt zu Hypermutabilität und Mikrosatelliteninstabilität (Olave *et al.*, 2021).

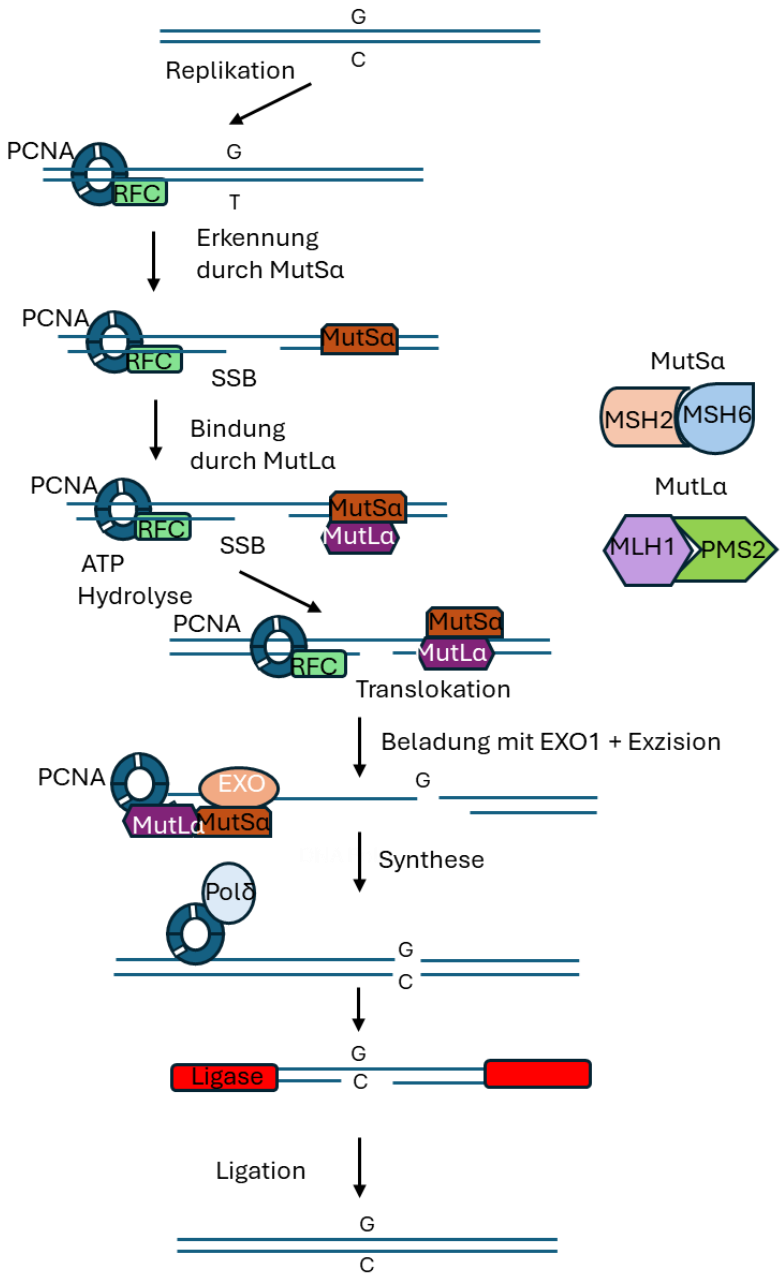

Abbildung 20: Mechanismus der Basenfehlpaarungsreparatur (MMR). Erläuterungen zugrunde liegender Schritte s.Text. Modifiziert nach Olave *et al.*, 2021.

In nachfolgender Abbildung ist der vergebliche Reparaturzyklus nach Entstehung nicht reparierter O^6-MeG-Läsionen dargestellt (Fahrer *et al.*, 2023, s. Abb. 21).Nicht durch MGMT reparierte O^6-MeG-Addukte führen im Verlauf der Replikation zu Zytotoxizität wobei diese eine Basenfehlpaarung von O^6-MeG mit Thymin (T) im Laufe der ersten Replikationsrunde sowie eine Prozessierung durch das MMR System vorraussetzt (Abb. 21; Duckett *et al.*, 1996; Kawate *et al.*,1998; Eadie *et al.* 1984; Fahrer *et al.*, 2023). Innerhalb der zweiten Replikationsrunde erfolgt aus dem generierten O^6-MeG-T in einem

der Tochterstränge eine Transition zu Adenin (A) als Basenpaarpartner von Thymin (T) (s. Abb. 21; Eadie *et al.*, 1984). Im zweiten Tochterstrang wird Thymin aus dem mutierten Basenpaar entfernt, während O^6-MeG zurückbleibt (Duckett *et al.*, 1996). Es kommt zur verstärkten Reinkorporation von Thymin als Basenpaarpartner von O^6-MeG in darauffolgenden Replikationsrunden, wobei dies zur stetig steigenden Instabilität der DNA durch den Abbau immer längerer Abschnitte der DNA und schließlich der Induktion toxischer Doppelstrangbrüche führt (vgl. Abb. 21; Duckett *et al.*, 1996; Mojas *et al.*, 2007; Ochs *et al.*, 2000). Diese können schließlich in Zelltod, chromosomalen Aberrationen, Autophagie und Seneszenz resultieren (s. Abb. 21).

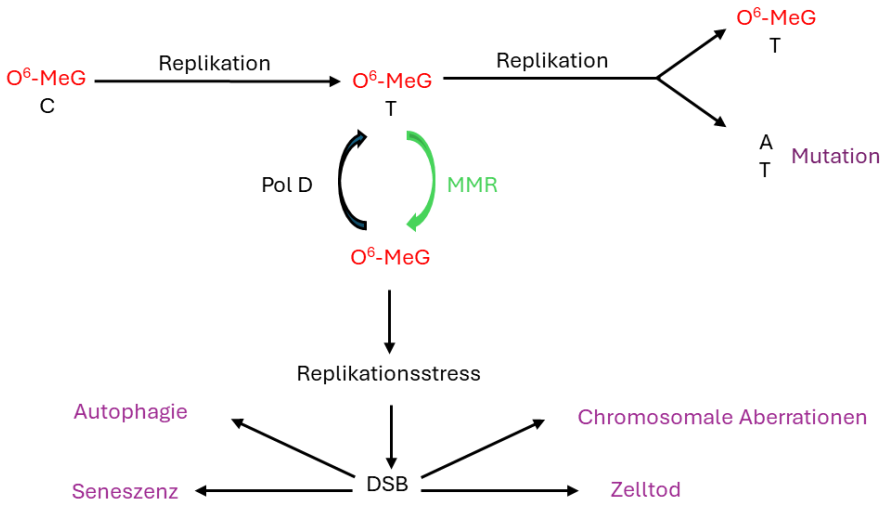

Abbildung 21: Biologische Konsequenzen nicht reparierter O^6-MeG-Addukte. Erläuterungen zugrunde liegender Schritte s. Text. Pol D: Polymerase Delta; MMR: mismatch repair; DSB: DNA-Doppelstrangbrüche. Modifiziert nach Fahrer *et al.*, 2023.

Kaina und Coautoren konnten zeigen, dass jedoch nur 0.23 % der in der Glioblastomzelllinie A172 gebildeten O^6-MeG-Addukte nach Exposition gegenüber TMZ in Doppelstrangbrüche konvertiert werden (Kaina *et al.*, 2021). Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass resultierende Doppelstrangbrüche weitere Reparatursysteme aktivieren, die HR sowie die NHEJ, welche zusätzlich zur Reduktion induzierter Schäden von O^6-MeG und verknüpften Effekten wie Zytotoxizität beitragen (Roos *et al.*, 2009). Nicht durch HR behobene Schäden nach Exposition gegenüber O^6-MeG führen darüberhinaus hauptsächlich zu Seneszenz und weniger zum Zelltod (Aasland *et al.*, 2019; Schwarzenbach *et al.*, 2021). Zusammengefasst weist O^6-MeG somit keine ausgeprägten zytotoxischen Eigenschaften auf (Fahrer *et al.*, 2023; Aasland *et al.*, 2019; Schwarzenbach *et al.*, 2021).

1.7.3 Basen-Exzisionsreparatur

Im Vergleich zur MGMT vermittelten direkten Schadensreversion erfolgt die Basen-Exzisionreparatur (BER) unter Beteiligung einer Vielzahl funktionell verschiedener Enzyme (Beard *et al.*, 2019). Zum Substratspektrum der Basenexzisionreparatur zählen die alkylierten N-Atome von Guanin, N7-MeG und N3-MeA und N1-MeG (Den Engelse *et al.*, 1986). Ferner vermag die BER gekoppelte Reparatur deaminierte und oxidierte Basen wie beispielsweise 8-Oxoguanin (8-OxoG) zu reparieren, wobei die geschädigten Basen herausgeschnitten und durch neue Basen ersetzt werden (Krokan *et al.*, 2013). Für nach S_N1 und S_N2 entstandenen Alkylierungen an der N-Position der DNA stellt die Reparatur über die BER den Hauptweg dar (Fahrer *et al.*, 2023). Im Rahmen der BER erfolgt die Detektion N-alkylierter DNA durch die Alkyladenin-DNA Methyltransferase (AAG), welche auch als 3-Methyladenin-DNA-Glykosylase (MPG) bezeichnet wird (Engelward *et al.*,1997; O'Brien *et al.*, 2004). Für N7-MeG konnte zudem eine spontanen Depurinierung demonstriert werden, aus der in der Folge eine abasische Stelle entsteht (Gates *et al.*, 2004). Der Mechanismus der Basen-Exzisionsreparatur ist in nachfolgender Abbildung schematisch dargestellt und beginnt mit der AAG vermittelten Exzision des DNA Stranges (s. Abb. 22). Es handelt sich bei der AAG um ein monofunktionelles Enzym, welches eine Glykosylase Aktivität aufweist (Krokan *et al.*, 2013; Fahrer *et al.*, 2023). Mechanistisch erfolgt eine Katalyse der hydrolytische Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen der Zuckereinheit der DNA und der alkylierten DNA-Base, wodurch die geschädigte Base entfernt wird und so eine AP-Stelle entsteht (vgl. Abb. 22; Engelward *et al.*, 1997; O'Brien *et al.*, 2004; Chakravarti *et al.*, 1991). Diese wird von der AP Endonuklease 1 (APE1) erkannt, welche die Inzision des Phosphodiester Rückgrates an der AP-Stelle katalysiert (s. Abb. 22; Engelward *et al.*, 1997; O'Brien *et al.*, 2004). Die neben einer freien 3' OH-Gruppe entstehende freie 5'-Desoxyribosephosphatgruppe (5'-dRP) wird durch die DNA Polymerase β (Pol β), welche eine Lyase-Aktivität besitzt, entfernt (Abb. 22; Demple *et al.*, 2005; Beard *et al.*, 2006). Dabei entsteht ein 5'-Phosphat-Ende (s. Abb. 22; Beard *et al.*, 2006). Falls diese in chemisch unmodifizierter Form vorliegt, erfolgt die BER nach dem sogenannten „short patch" Weg, der sich vom „long patch" Weg in der Anzahl involvierter Reparaturproteine unterscheidet (Abb. 22; Fahrer *et al.*, 2006). Im „short patch" Weg der Basen-Exzisionreparatur erfolgt die durch Pol β katalysierte Inkorporation eines Nukleotids unter Verwendung einer 3'-OH Gruppe als Primer (s. Abb. 22; Nay *et al.*, 2012).

Im Anschluss wird die Ligation der DNA durch die DNA Ligase III oder alternativ der DNA Ligase I und dem sogenannten scaffold protein XRCC1 katalysiert, welches einerseits mit Pol β interagiert, andererseits zur Stabilisierung der DNA Ligase III beiträgt (vgl. Abb. 22; Fahrer *et al.*, 2023; Cappelli *et al.*, 1997; Taylor *et al*, 1998). Im Falle eines modifizierten 5'-Phosphatrestes Endung erfolgt die Reparatur der DNA über den long-patch Weg, der in der S-Phase des Zellzyklus sowie bei geringen ATP Leveln dominiert (s. Abb. 22; Krokan *et al.*, 2013; Klungland *et al.*, 1997; Petermann *et al.*, 2003). Es erfolgt im Zuge der Strangverdrängungssynthese die Generierung einer Flap-Struktur durch Pol δ und Pol ε, welche aus 2-13 Nukleotiden besteht (Abb. 22; Mohan *et al.*, 2019). DNA Ligase schließt die Lücke, nachdem die Flap-Endonuklease 1 (FEN1) diese entfernt hat (vgl. Abb. 22; Brickner *et al.*, 2019).

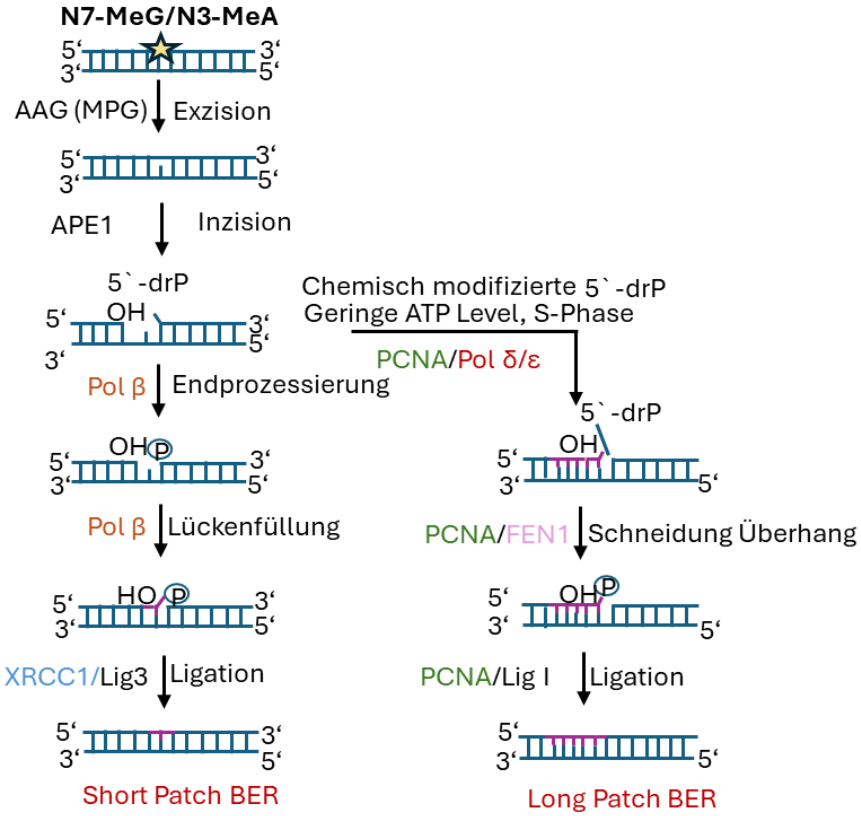

Abbildung 22: Basen-Exzisionsreparatur (BER) von DNA-Addukten wie N7-MeG und N3-MeA. Beschreibung der einzelnen Schritte s. Text. Modifiziert nach Fahrer *et al.*, 2023.

1.7.4 Nukleotid-Exzisionsreparatur

Zum Substratspektrum der an der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) involvierten Reparaturproteine zählen von beispielsweise UV-Licht hervorgerufene Intrastrang crosslinks, UV-Licht induzierte Photoläsionen (6-4), Photoprodukte (6-4 PPs) und

Cyclobuten Pyrimidin Dimere (CPDs), ebenso wie sperrige Addukte und Interstrang crosslinks der DNA (Fahrer *et al.*, 2023, Christmann *et al.*, 2003, Spivak *et al.*, 2015, Scharer, 2013). Letztere werden beispielsweise durch alkylierende Substanzen wie Cis-Platin induziert, während sperrige Addukte durch natürliche Substanzen wie Aflatoxin oder das bei unvollständiger Verbrennung von organischem Material entstehende Benzoapyren (B[a]P erzeugt werden können (Fahrer *et al.*, 2023). Der Reparaturmechanismus zur Behebung von Interstrang crosslinks ist sehr komplex und geschieht ferner unter Beteiligung der homologen Rekombination, Transläsionspolymerasen und Fanconia Anemia Komponenten (Dango *et al.*, 2011; Johannessen *et al.*, 2013). Auch für CPA, das nach metabolischer Aktivierung bekanntermaßen Intrastrang, sowie Interstrang crosslinks erzeugt, ist eine Beteiligung der NER denkbar (Shulman-Roskes *et al.*, 1998). Einen Hinweis hierauf liefern Studien, in welchen eine erhöhte Sensitivität gegenüber CPA bei ERCC1 defizienten CHO Zelllinien UV4 und UV20 ($ERCC1^-$) auftrat, während die Sensitivität in ERCC2 defizienten CHO Zellen UV5 ($ERCC2^-$) nur minimal anstieg (Hoy *et al.*, 1985). Eine weitere Studie konnte eine Beteiligung von UV41 (ERCC4) sowie UV4 und UV20 (ERCC1) an der Reparatur von durch CPA Analoga 4-Hydroperoxycyclophosphamid (4HC) und phosphorodiamidic mustard (PM) hervorgerufenen crosslinks nachweisen (Andersson *et al.*, 1996). Der zugrundeliegende Mechanismus ist in Abb. 23 schematisch dargestellt. Die an der NER beteiligten Faktoren verschiedener Komplementgruppen wie Xeroderma Pigmentosum (XP), Cockayne's Syndrom (CS) und Trichothiodystrophie sind mit erblichen Erkrankungen assoziiert (Fahrer *et al.*, 2023; Nikolova *et al.*, 2017; Muniandy *et al.*, 2010). Die NER kann in zwei verschiedene Wege unterteilt werden (vgl. Abb. 23; Fahrer *et al.*, 2023). Die globale genomische Reparatur (GGR) repariert Läsionen im Bereich nicht transkribierter DNA innerhalb des Genoms sowie des nicht transkribierten Stranges von transkribierten Regionen (Fahrer *et al.*, 2023). Die transkriptions-gekoppelte Nukleotid-Exzisionsreparatur (TCR) hingegen ist an der Reparatur von transkriptionell aktiven Genregionen durch Entfernung von Polymerase blockierenden Läsionen beteiligt (Fahrer *et al.*, 2023). Im Verlauf der GGR werden Läsionen wie Photoprodukte (6-4)PPs, die die DNA-Struktur stark beeinträchtigen, durch den XPC-HR23B Komplex erkannt und durch den RPA-XPA Komplex verifiziert (Abb. 23; Kusumoto *et al.*, 2001). Der aus DDB1-DDB2 (XPE) bestehende Komplex erkennt Läsionen wie Cyclobuten Pyrimidin Dimere (CPDs),

die die Struktur der DNA weniger stark beeinträchtigen (s. Abb. 23; Tang *et al.*, 2002). Nach Schadenserkennung katalysiert der Transkriptionsfaktor TFIIH, der aus den beiden Helikase Untereinheiten XPB sowie XPD und verschiedenen zusätzlichen Komponenten, darunter GTF2H1-H4, CDK7, CCNH und MNAT1 besteht, die Entwindung der DNA um die Läsion (vgl. Abb. 23; Evans *et al.*, 1997). Dann erfolgt die 5‘ Inzision der DNA durch den XPF-ERCC1 Komplex (Abb. 23; Fahrer *et al.*, 2023). Die im Verlauf der DNA-Replikation durch Primerverdrängung entstehende Flapstruktur wird durch PCNA und die Polymerasen δ, ε und/oder κ prozessiert, welche anschließend durch XPG-vermittelte 3‘ Inzision entfernt wird (Abb. 23; Krasikova *et al.*, 2021). Schließllich katalysieren Ligase I oder Ligase-III-XRCC1 das Schließen der Lücke (vgl. Abb. 23; Krasikova *et al.*, 2021; Giannattasio *et al.*, 2010). Im Falle eines sehr ausgeprägten Schadens erfolgt die Generierung von langen einzelsträngigen DNA-Strängen durch EXO1, die die DNA-Schadensantwort aktivieren (s. Abb. 23; Giannattasio *et al.*, 2010). In diesem Fall entfällt die XPG katalysierte 3‘ Inzision sowie der durch Ligase I oder den Ligase-III-XRCC1 Komplex katalysierte Lückenschluss (Abb. 23; Krasikova *et al.*, 2021). Bei Blockierung der RNAPII durch den DNA-Schaden erfolgt die Aktivierung der TCR (Fahrer *et al.*, 2023). Im Verlauf der TCR wird RNAPII durch die DNA-Läsion blockiert, was den Zusammenbau von CSA, CSB und den Transkriptionsfaktor TFIIH an der Läsion fördert (Abb. 23; Fahrer *et al.*, 2023). Die Entfernung von RNAPII wird durch die Translokaseaktivität von CSB katalysiert, wobei der genaue Mechanismus bisher nicht aufgeklärt werden konnte (s. Abb. 23; Svejstrup *et al.*, 2003; Fahrer *et al.*, 2023). Nach Translokation von TFIIH erfolgt die Inzision der nun zugänglichen Läsion durch XPF-ERCC1 und XPG (s. Abb. 23; Fahrer *et al.*, 2023). Der Lückenschluss erfolgt unter Beteiligung der Polymerasen δ, ε und/oder κ sowie Ligase I oder dem Ligase III-XRCC1 Komplex (Abb. 23; Fahrer *et al.*, 2023).

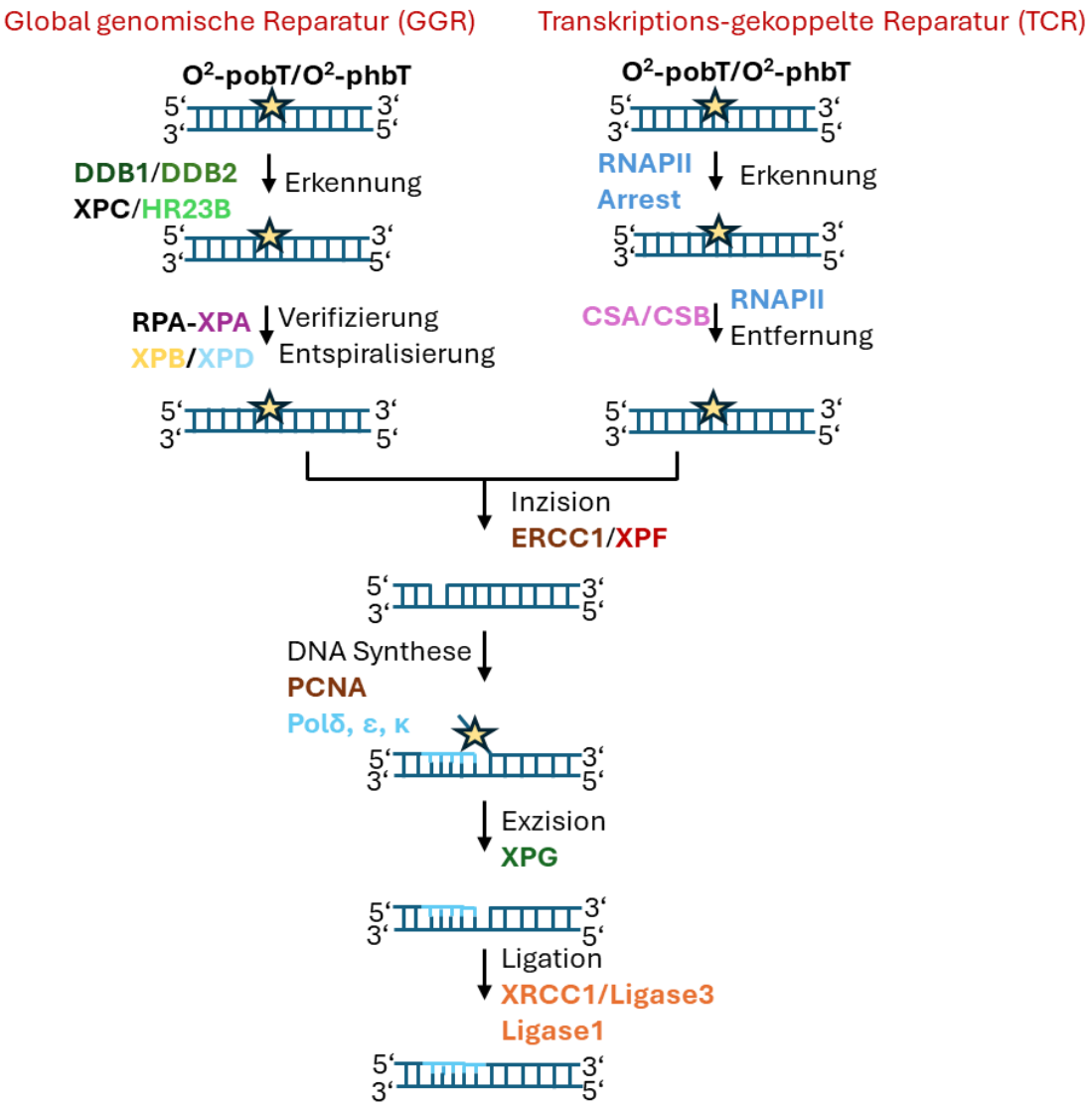

Abbildung 23: Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) von sperrigen DNA-Alkylläsionen. Globale genomische Reparatur (GGR) und die Transkriptions-gekoppelte Reparatur (TCR) sind dargestellt. Beschreibung einzelner Schritte s. Text. Modifiziert nach Fahrer *et al.*, 2023.

Eine Beteiligung der NER an der Reparatur von Pyridyloxobutyl-Addukten, die nach Exposition gegenüber NNN in Form von O^6-pobG erwiesenermaßen auftreten, konnte von Brown *et al.* demonstriert werden (Brown *et al.*, 2008). So trat bei XPA und XPC defizienten, menschlichen Lymphoidzellen erhöhte Sensitivität im Hinblick auf induzierte DNA-Läsionen nach Exposition gegenüber 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNKOAc), der aktiven Form des Nikotin-abgeleiteten Nitrosaminalkohols (NNAL) auf. Bisherige Daten deuten dennoch darauf hin, dass die NER eine untergeordnete Rolle für die Reparatur von DNA-Alkylierungsschäden spielt (Fahrer *et al.*, 2023).

1.7.5 Reparatur über die ALKBH Familie

Ein weiterer Mechanismus im Zuge direkter Schadensreversion erfolgt durch Proteine der alpha-Ketoglutarat abhängigen homologen Demethylasen (ALKBH) (Fahrer *et al.*, 2023). Zum Substratspektrum zählen hauptsächlich kleinere N-Alkyladdukte, darunter N1-MeA, N1-MeG, N3-MeT und N3-MeC (Fahrer *et al.*, 2023; Falnes *et al.*, 2002; Trewick *et al.*, 2002; Delaney *et al.*, 2004). N1-MeG und N3-MeT werden von Proteinen der ALKBH Familie mit geringerer Effizienz repariert als N1-MeA und N3-MeC (Delaney *et al.*, 2004). Ferner vermögen Proteine der ALKBH Familie exozyklische DNA-Addukte wie 1,N^6-Ethenoadenin (εA) und 3,N^4-Ethenocytosin (εC) zu reparieren (Delaney *et al.*, 2005; Mishina *et al.*, 2005; Frick *et al.*, 2007). N1-MeA und N3-MeC werden nach Exposition gegenüber NDMA induziert, weshalb der Reparaturweg an dieser Stelle näher erläutert wird (Den Engelse *et al.*, 1986). Der in diesem Zusammenhang gemessene Anteil der in der Spezies Ratte induzierten Addukte ist im Vergleich zu den von NDMA induzierten Hauptaddukten O^6-MeG, N7-MeG und N3-MeA gering ausgeprägt (Den Engelse *et al.*, 1986). So lag der Anteil an N1-MeA Addukten bei 1 % (Den Engelse *et al.*, 1986). Der Anteil von N3-MeC Addukten fiel mit 0.6 % noch geringer aus (Den Engelse *et al.*, 1986). AlkB Homologe katalysieren die oxidative Demethylierung der DNA unter Verwendung von Fe^{2+}, O_2 und α-Ketoglutarat (Falnes *et al.*, 2002; Trewick *et al.*, 2002 Aas *et al.*, 2003; Duncan *et al.*, 2002). Hierbei wird α-Ketoglutarat oxidativ decarboxyliert (Falnes *et al.*, 2002; Trewick *et al.*, 2002). Resultierenden Produkte sind die hydroxylierte DNA-Base, aus welcher nach Abspaltung von Formaldehyd die regenerierte Nukleinbase hervorgeht, sowie das nach oxidativer Decarboxylierung entstehende Succinat (Falnes *et al.*, 2004). N1-MeA und N3-MeC werden hauptsächlich in einzelsträngiger DNA repariert und stellen replikationsblockierende Addukte dar (Fahrer *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2016). Zudem konnte gezeigt werden, dass N3-MeC Läsionen mutagen sind, während dies für N1-MeA nicht nachweisbar war (Delaney *et al.*, 2004). Mechanistisch beruht die mutagene Wirkung auf der Induktion von C→T und C→A Mutationen (Delaney *et al.*, 2004). In menschlichen Zellen konnten bisher insgesamt neun AlkB Homologe (ALKBH1-ALKBH8 und FTO) identifiziert werden, wobei nur ALKBH2 und ALKBH3 die Regeneration von N1-MeA und N3-MeC als α-KG-und Fe(II)-abhängige Dioxygenasen katalysieren (Sedgwick *et al.*, 2007; Aas *et al.*, 2003; Duncan *et al.*, 2002). Das zugehörige Gen für ALKBH2 befindet sich auf Chromosom12 14q24.11 und beeinhaltet eine codierende Sequenz mit einer

Länge von 786 Basenpaaren, welches eine aus 261 bestehende Aminosäure mit einem Molekulargewicht von 33.1 kDa codiert (Fahrer *et al.*, 2023; Duncan *et al.*, 2002). Das für ALKBH3 codierende Gen befindet sich auf Chromosom 11p11.2 und beeinhaltet eine codierende Sequenz von 7861 Basenpaaren, welche für ein aus 286 bestehende Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 37.9 kDa codiert (Duncan *et al.*, 2002). Sowohl ALKBH2 als auch ALKBH3 sind an der Reparatur von Alkylierungsschäden beteiligt (Calvo *et al.*, 2012). Als das für die Entfernung von N-Alkyladdukten an doppelsträngiger DNA hauptsächlich verantwortliche Enzym ließ sich ALKBH2 identifizieren, das mit PCNA, einem im Rahmen der Doppelstrangbruchreparatur bekannten Substrat, interagiert (Aas *et al.*, 2003; Gilljam *et al.*, 2009). ALKBH3 entfernt vor allem Läsionen an einzelsträngiger DNA und tritt dabei mit RecA und RAD51C in Interaktion, welche typische Reparaturproteine der Wiederherstellung blockierter Replikationsgabeln und einzelsträngiger DNA sind (Aas *et al.*, 2003; Mohan *et al.*, 2019).

1.8 Mutagenität und Kanzerogenität von *N*-Nitrosaminen: aktueller Stand der Forschung

Verfügbare Daten hinsichtlich Mutagenität und Kanzerogenität der in dieser Arbeit untersuchten *N*-Nitrosamine sind nachfolgend aufgeführt (s. Tab. 2).

Tabelle 2: Daten zu Mutagenität und Kanzerogenität der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten N-Nitrosamine. APT = Ames Preinkubationstest, AFT = Ames Fluktuationstest, CA = Alkalischer Comet Assay. k.D. = keine/unzureichende Daten. n.k = nicht klassifiziert. Modifiziert nach Djuari & Londenberg *et al.*, 2023.

N-Nitrosamin	Abkürzung	Assays	Ames positiv	IARC Klassifizierung
N-Methyl-*N*-Nitroso-isopropylamin	NMIPA	APT, CA	k.D.	n.k.
N-Methyl-*N*-Nitroso-tert-butylamin	NMtBu	APT, AFT, CA	nein	n.k.
N-Nitrosobetahistin	NBH	APT	k.D.	n.k.
N-Nitrosodesloratadin	NND	APT, AFT, CA	k.D	n.k.
N-Nitrosodiethanolamin	NDELA	APT, AFT, CA	ja	2B
N-Nitrosodimethylamin	NDMA	APT, AFT, CA	ja	2A
N-Nitrosofolsäure	NFA	APT, AFT, CA	nein	3
N-Nitrosofluoxetin	NFluo	APT, AFT, CA	ja	n.k.
N-Nitrosomethylanilin	NMA	APT, AFT, CA	ja	n.k.
N'-Nitrosonornikotin	NNN	APT, CA	ja	1
N-Nitrosonortryptilin	NNT	APT	ja	n.k.
N-Nitrosoprolin	NPro	APT, AFT, CA	nein	3

Für Substanzen, welche in Kategorie 1 nach der International Agency for Research on Cancer (IARC) eingruppiert werden, existieren ausreichend Daten, die einen Zusammenhang zwischen Exposition und Tumorentstehung im Menschen belegen (IARC, 2023). Für Substanzen der Kategorie 2A gilt es als wahrscheinlich, dass sie krebserregend für den Menschen sind (IARC, 2023). Es existieren ausreichend Daten in Tiermodell, die die karzinogene Wirkung belegen, allerdings fehlen Daten auf Basis epidemiologischer Studien um mit hinreichender Sicherheit die humankarzinogene Wirkung zu demonstrieren (IARC, 2023). Sind die Daten im Menschen nicht ausreichend zum Beleg karzinogener Effekte und zudem weniger als ausreichend im Tiermodell, so werden Verbindungen in Gruppe 2B eingeordnet (IARC, 2023). Für diese müssen dennoch krebserzeugende Effekte in Tierstudien nachgewiesen sein (IARC, 2023). Substanzen, für die weder im Menschen noch im Tier adäquate Daten vorliegen, um eine Einstufung in Gruppe 1 oder 2 zu ermöglichen, werden in Stufe 3 eingruppiert (IARC, 2023). Darüberhinaus gibt es Verbindungen, für die aufgrund unzureichender Daten bisher keine Klassifizierung erfolgt ist (s. Tab. 2). Mit NDMA, NDELA und S-NNN sind für drei der in dieser Arbeit untersuchten *N*-Nitrosamine genügend Daten hinsichtlich Kanzerogenität in Tiermodellen zur Einstufung nach Kriterien der IARC vorhanden (vgl Tab. 2, IARC, 1978, IARC, 2012). Für NNN sind die auf epidemiologischen Daten basierenden Resultate ausreichend für die Einstufung als krebserregend für den Menschen (vgl. Tab. 2). NPro und NFA sind nicht klassifizierbar im Hinblick auf Humankanzerogenität und werden nach IARC der Gruppe 3 zugeordnet (s. Tab. 2, IARC, 1978). Nach derzeitigem Wissenstand besteht keine Korrelation zwischen Tumorentstehung und Exposition gegenüber NPro und NMtBu (EMA, 2020). Dagegen existieren für NMA in Tierstudien erhobene Daten, die karzinogene Effekte belegen (s. Abschnitt 1.8.4). Aufgrund der Menge verfügbarer Daten in der Literatur zu karzinogenen Effekten von NDMA, NDELA, NNN und NMA, welche in dieser Arbeit schwerpunktmäßig untersucht wurden, soll auf diese vier *N*-Nitrosamine in den folgenden Abschnitten näher eingegangen werden (vgl. 1.8.1-1.8.4).

1.8.1 NDMA

Mutagene und karzinogene Effekte von NDMA sind auf N3-MeG, N7-MeG und N3-MeA-Addukte zurückzuführen, die nach metabolischer Aktivierung entstehen (Kay *et al.*, 2021). In einer Studie von Thomas und Coautoren konnte innerhalb des Ames

Preinkubationstestes mit den Salmonella Typhimurium Stämmen TA100, TA1535 und dem E.coli Stamm WP2uvrA unter Verwendung von Hamster S9 Mix mutagene Effekte demonstriert werden (Thomas *et al.,* 2024). In diesem Zusammenhang war die Zugabe von S9 Mix für die Induktion mutagener Effekte essentiell, was die Bedeutung der metabolischen Aktivierung für die genotoxischen Eigenschaften von NDMA hervorhebt (Thomas *et al.*, 2024). In menschlichen Lebermikrosomen konnte gezeigt werden, dass an der metabolischen Aktivierung hauptsächlich CYP2E1 beteiligt ist (Yamazaki *et al.*, 1992). Für NDMA existieren in Tiermodellen Daten hinsichtlich des karzinogenen Potentials, die ausreichend sind für eine Kategorisierung seitens der International Agency for Research on Cancer (IARC, 2023). So konnte in einer Studie von Ishinishi *et al.* beispielsweise gezeigt werden, dass die Substanz nach 15 Wochen und intermittierender intratrachealer Instillation von wöchentlich 1.5 mg pro Tier Tumore in der Luftröhre, in der Lunge und in der Leber von syrischen Goldhamstern induziert (Ishinishi *et al.*, 1988). Die lebenslange Tumorinzidenzrate lag für die Atmungsorgane bei 6 %, während für die Leber eine Rate von 19 % feststellbar war (Ishinishi *et al.*, 1988). Darüber hinaus konnte in einer weiteren Nagerspezies, der Ratte, die Entstehung von Lebertumoren nach oraler Applikation von Dosen ab 96.3 mg/l gezeigt werden (Lijinsky *et al.*, 1984) was erneut auf die Bedeutung der Leber als primäres Zielorgan von NDMA hinweist. In einer weiteren Studie von Haas *et al.* konnte demonstriert werden, dass die Substanz hauptsächlich Tumore in der Leber syrischer Goldhamster induziert (Haas *et al.*, 1973). Daten hinsichtlich des karzinogenen Potentials im Menschen konnten bisher nicht mit ausreichender Evidenz belegt werden (IARC, 1978). Die Substanz wird daher in Gruppe 2A eingeordnet (IARC,1978). Der TD_{50}-Wert liegt bei 0.0595 mg/kg/Tag. Basierend auf dem in der Spezies Ratte generierten TD_{50}-Wert wurde für NDMA ein AI von 96 ng pro Tag festgelegt (Peto *et al.*, 1991; Lijinsky *et al.,* 1984; EMA, 2020, 369136; EMA, 2019).

1.8.2 NDELA

Die durch NDELA induzierten mutagenen und karzinogenen Effekte resultieren aus den 2-Hydroxyethyl-DNA-Addukten sowie Gyloxal-DNA-Addukten die nach CYP2E1 katalysierter metabolischer Aktivierung via α-und β-Hydroxylierung entstehen (Liu *et al.*, 2008; Loeppky, Chen *et al.*, 2002;). Studien von Knasmüller *et al.* zeigen, dass NDELA Mutagenität im E.coli Stamm K12 343/311 induziert (Knasmüller *et al.*, 1986). Hierbei wurden sowohl für die wirtsvermittelte Testmethode, in welchen eine Transfektion von

E.coli Zellen in Mäusen erfolgte, als auch im Rahmen der *in vitro* Testmethode, in welcher eine Inkubation von K12 343/311 Zellen mit NDELA in Anwesenheit von Ratten S9 Mix erfolgte, Mutationen detektiert (Knasmüller *et al.*, 1986). Für die wirtsvermittelte Methode erfolgte zur Analyse die Isolierung von Leberzellen nach dreistündiger Inkubation mit NDELA durch Auswertung der dort lokalisierten bakteriellen K12 343/311 Reporterzellen. Es existieren zudem Hinweise, dass neben CYP2E1 auch Sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) sowie Alkoholdehydrogenase (ADH) an der Biotransformation beteiligt sein können (Liu *et al.*, 2008). Im Ames Test nach Standardbedingungen und Inkubation mit 1254 Aroclor induziertem S9 Mix von Nagern zeigt NDELA aufgrund geringer Aktivitäten von CYP2E1 keine eindeutigen positiven Effekte (Liu *et al.*, 2008; Glatt *et al.*, 1981). Demgegenüber konnte in mit humanem CYP2E1 und humanem Sult1A1 transfiszierten V79 Zellen (V79-h-CYP2E1-hSULT1A1 Zellen) Mutagenität von NDELA gezeigt werden, wobei diese unabhängig von SULT1A1 Aktivität war und ausschließlich auf Proteinaktivität von CYP2E1 zurückgeführt werden konnte (Liu *et al.*, 2008). NDELA induzierte Lebertumore in Sprague Dawley Ratten nach 5-maliger peroraler Applikation von 1.5 – 400 mg/ kg pro Woche, darunter duktalen, mesenchymalen und hepatozellulären Ursprungs (Preussmann *et al.*, 1982). Darüberhinaus wurden Tumoren der Nasenhöhle induziert, wobei die Häufigkeit geringer ausgeprägt war. In F344 Ratten traten nach 5-maliger wöchentlicher peroraler Applikation von 340 mg/kg Körpergewicht (KG) Lebertumore auf (Lijinsky *et al.*, 1980). Die Tumorinzidenz für das hepatozelluläre Karzinom lag hierbei für alle Dosisgruppen bei 100 % (Lijinsky *et al.*, 1980). Nach Gabe der höchsten Dosis von 3.125 g/kg entwickelten 18 von 20 Tieren zudem Metastasen (Lijinsky *et al.*, 1980). Darüberhinaus entwickelten die Tiere in allen Dosisgruppen Cholangiosarkome, wobei die Inzidenz im Vergleich zur Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms schwächer ausgeprägt war (Lijinsky *et al.*, 1980). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass NDELA Lebertumore in weiblichen F344 Ratten induziert (Hecht *et al.*, 1989). Die Tumorinzidenz nach Applikation von 5.6 mmol/Ratte für 50 Wochen lag nach Studienabschluss bei 70 % (Hecht *et al.*, 1989). In der gleichen Studie konnte demonstriert werden, dass NDELA auch in AJ Mäusen Lebertumore induziert, wobei die Inzidenz für Lungentumore nach Applikation von 53-55 µmol/Maus über 10 Wochen mitweniger als zwei Tumoren pro Tier gering ausgeprägt war (Hecht *et al.*, 1989). Als weitere Zielorgane von NDELA sind Luftröhre und Kehlkopf zu nennen (Hoffmann *et al.*,

1982). Tumore in diesen Organen traten nach Applikation von 500 mg/kg in syrischen Goldhamstern nach subkutaner Injektion auf (Hoffmann *et al.*, 1982). Daten zur Humankanzerogenität sind nach derzeitigem Stand unzureichend (IARC, 2023). Basierend auf den zugrunde liegenden Daten in Nagermodellen führte die Bewertung von NDELA durch die IARC zur Einstufung in Gruppe 2B (Roper *et al.*, 2025; EFSA *et al.*, 2023; IARC, 2000). Substanzen dieser Kategorie sind möglicherweise krebserzeugend im Menschen (IARC, 2023). Der in der Spezies Ratte erhobene TD_{50}-Wert für NDELA liegt bei 1.9 mg/kgTag (EMA, 2020). Basierend auf *in vivo* TGR Daten und Datenmodellierung mittels CADRE wurde für NDELA ein AI von 1.9 µg pro Tag abgeleitet (Roper *et al.*, 2025).

1.8.3 NNN

In vivo Studien in lacI transfiszierten Mäusen demonstrierten Mutagenität von NNN, wobei der Anteil von A:T Mutationen im Verhältnis zur Gesamtheit der induzierten Mutationen mit 30 % am größten war (Guttenplan *et al.*, 2019). Im Ames Test mit dem Salmonella typhimurium Stamm TA100 und in Anwesenheit von S9 Mix konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme mutagener Effekte von NNN festgestellt werden (Padma *et al.*,1989). In einer Studie von Hecht *et al.*, in welcher karzinogene Effekte auf Leber, Lunge und Nasenhöhle in F344 Ratten untersucht wurden, induzierte NNN Tumore in der Nasenhöhle nach subkutaner Applikation von insgesamt 600 mg über 20 Wochen (Hecht *et al.*, 1980). Die Tumorinzidenz lag am Ende der Studie bei 92 % in männlichen Tieren und bei 75 % in weiblichen Tieren (Hecht *et al.*, 1980). Die Inzidenz von Lebertumoren lag bei 1 von 12 Tieren (Hecht *et al.*, 1980). In der Lunge konnten keine Tumoren festgestellt werden (Hecht *et al.*, 1980). Dies deutetet auf organotrophe Effekte von NNN hin. Hofmann und Coautoren konnten in einer Studie mit wesenlich geringerer Konzentration NNN demonstrieren, dass ausschließlich gutartige Tumoren in syrischen Goldhamstern nach 19-maliger subkutaner Injektion von insgesamt 1.31 mg/kg auftraten (Hoffmann *et al.*, 1981). Balbo und Coautoren verglichen sowohl die Wirkung von racemischem NNN als auch den Effekt unterschiedlicher Stereoisomere von NNN, S-NNN und R-NNN, auf Mundhöhle und Speiseröhre in F-344 Ratten (Balbo *et al.*, 2013). In dieser erhielten die Tiere 17-20 Monate lang 14 ppm S-NNN, R-NNN oder racemisches NNN über das Trinkwasser (Balbo *et al.*, 2013). In beiden Organen konnten zudem häufiger Tumore in Tieren festgestellt werden, die mit S-NNN behandelt wurden (Balbo *et al.*, 2013). So lag die Anzahl aufgetretener Tumore im Ösophagus fast 41-fach höher in

Tieren, denen das S-Enantiomer verabreicht wurde (Balbo *et al.*, 2013). In der Mundhöhle war die Zahl der induzierten Tumore 15-fach höher als in Tieren, die gegenüber dem R-Enantiomer exponiert waren (Balbo *et al.*, 2013). Diese Daten deuten darauf hin, dass das S-Enantiomer ein größeres karzinogenes Potential aufweist (Balbo *et al.*, 2013). Nach chronischer Exposition zwischen ein und zehn Wochen von F344 Ratten von 10 ppm R-NNN sowie S-NNN im Trinkwasser ließen sich je nach Gewebe unterschiedlich hohe Adduktlevel messen (Lao *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2010). So wurden nach Behandlung mit S-NNN maximale Adduktlevel in der Speiseröhre, in der Leber sowie in der Mundschleimhaut detektiert, während R-NNN zu maximalen Adduktleveln in der Lunge und im olfaktorischen sowie im respiratorischen Gewebe induzierte (Lao *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010). Dies deutet darauf hin, dass das primäre Zielorgan von der Art des Stereoisomers beeinflusst wird. Der TD_{50}-Wert für NNN basiert auf Versuchen in der Spezies Hamster und liegt bei 0.096 mg/kg (EMA, 2020). Basierend auf SAR/read across und der Verwendung des TD_{50}-Wertes von NNK als POD wurde für NNN ein AI von 100 ng/Tag festgelegt (EMA, 2023). In epidemiologischen Studien wurden kanzerogene Effekte auf den Menschen untersucht, wobei die Datenlage für eine Einstufung als Humankanzerogen, verbunden mit der Einstufung gemäß IARC in Gruppe 1, ausreichend ist (IARC, 2012). Im Rahmen einer prospektiven Kohortenstudie in Shanghai konnte gezeigt werden, dass der Anteil an freiem NNN an der Gesamtkonzentration NNN, bestehend aus freiem NNN und dem NNN-Glucoronid in Patienten mit Speiseröhrenkrebs höher ist als in Rauchern ohne Speiseröhrenkrebs (Yuan *et al.*, 2011). Demgegenüber war in Rauchern ohne Speiseröhrenkrebs der Anteil des nach Detoxifizierung aus NNN entstehenden NNN-Glucoronides an der Gesamtkonzentration NNN höher als in Rauchern mit Speiseröhrenkrebs, was eine positive Korrelation zwischen NNN und der Entwicklung von Speiseröhrenkrebs demonstriert (Yuan *et al.*, 2011). Ferner wurder der Zusammenhang zwischen Krebsentstehung und der in rauchfreien Tabakprodukten vorkommenden Nitrosamine NNN und NNK von der World Health Organization (WHO) und der IARC festgestellt (WHO, IARC, 2004). Hecht und Coautoren konnten diesen Zusammenhang ebenfalls belegen (Hecht *et al.*, 1998). In einer Meta-Analyse von Daten, in welchem der globale Konsum Berücksichtigung fand, konnte der Zusammenhang zwischen der Verwendung rauchfreier Tabakprodukte und der Entwicklung von Mundhöhlenkrebs festgestellt werden (Asthana *et al.*, 2018). In

Indien stellen Tumore der Mundhöhle die dritthäufigste Krebsform dar, mit im Jahr 2020 135929 neu aufgetretenden Fällen und einer altersstandardisierten Inzidenzrate von 14.8 bei Männern im Vergleich zu 4.6 bei Frauen. Männer sind in Indien somit häufiger betroffen als Frauen, was letztlich mit der mehr als zweifach höheren, prozentualen Exposition begründbar ist (NCI, CDC, 2014). Karzinogene und mutagene Effekte können auf Pyridylbutyl-, und Pyridylhydroxybutyl- DNA Addukte wie O^6-pobG zurückgeführt werden (Urban *et al.*, 2012; Hecht *et al.*, 1999; Hecht, Hecht *et al.*, 1986; Carlson *et al.*, 2018; Stepanov *et al.*, 2009). Darüberhinaus existieren Studien, in denen eine Korrelation zwischen Tumorentstehung und Persistenz bestimmter Addukte wie O^2-pyridyloxobutylthymidin (O^2-pobT) nachgewiesen werden konnte (Preussmann *et al.*, 1989; Li *et al.*, 2022; Peterson *et al.*, 1993). Nicht reparierte O^6-pobG Addukte sowie weitere durch Pyridyloxobutylierung der DNA entstehende Alkylierungsschäden können zu mutagenen und kanzerogenen Effekten führen, wobei das Vorkommen von O^6-pobG nach Exposition gegenüber NNK erstmals in A/J Mäusen demonstriert wurde (Thomson *et al.*, 2003).

1.8.4 NMA

Die Entstehung von Methyldiazoniumionen nach metabolischer Aktivierung von NMA konnte bisher nicht demonstriert werden (Michejda *et al.*, 1981). Mutagene und karzinogene Effekte sind vermutlich auf das nach metabolischer Aktivierung entstehende elektrophile Benzendiazoniumion (BDI) zurückzuführen (Koepke *et al.*, 1990; Stiborová *et al.*,1995; Stiborová *et al.*,1999). In diesem Zusammenhang konnte der genaue Wirkmechanismus aufgrund des fehlenden Nachweises eine *in vivo* Alkylierung durch Phenylierung oder Methylierung bisher nicht hinreichend aufgeklärt werden (Michejda *et al.*, 1981). Für BDI konnten mutagene Effekte im Ames Test nachgewiesen werden (Gold, 1982). Auch im Ames Preinkubationstest, in welchem der hisG428 Salmonella typhimurium Stamm TA100 und S9 Mix verwendet wurden, induzierte NMA in konzentrationsassoziierter Weise Mutagenität (Zielenska *et al.*, 1988). Hierbei verursachte NMA größtenteils AT → CG Mutationen (Zielenska *et al.*, 1988). In einer Studie von Schmähl *et al.* konnte gezeigt werden, dass NMA in Sprague-Dawley Ratten nach sukutaner oder oraler Applikation Tumore in der Speiseröhre induziert (Schmähl *et al.*, 1976). Die Tumorinzidenz lag nach 190 +/- 24 Tagen und wöchentlicher subkutaner Applikation von 10 mg/kg bei 84 % sowie nach 200 +/-33 Tagen nach täglicher

Verabreichung von 1.5 mg/kg über das Trinkwasser bei 87 % (Schmähl *et al.*, 1976). Dabei war die Tumorhäufigkeit zwischen den Geschlechtern ähnlich stark ausgeprägt (Schmähl *et al.*, 1976). Diese Daten korrellieren mit Studien von Druckrey *et al.*, der ebenfalls demonstrieren konnte, dass kanzerogene Effekte in der Speiseröhre von BD Ratten nach länger andauernder Exposition gegenüber NMA auftreten (Druckrey *et al.*, 1967). Es handelt sich bei BD Ratten um gezüchtete Rattenstämme mit unterschiedlichen Genotypen, darunter CpAH, cPah, CpAh, CPaH, CPAh, Cpah, CPAH und cpah, die sich jeweils in der Fellfarbe voneinander unterscheiden (Druckrey *et al.*, 1967). Die Rattenstämme wurden seit 1937 durch Bruder Schwester-Inzucht entwickelt und weisen teilweise mehr als 100 Zuchtgenerationen auf, wobei für die experimentellen Studien jeweils Tiere aus unterschiedlichen Stämmen zur Vermeidung einseitiger Ergebnisse verwendet wurden (Druckrey *et al.*, 1967). In der Studie von Druckrey *et al.* erhielten die Ratten lebenslang 10 mg/kg NMA täglich in der Diät (Druckrey *et al.*, 1967). Kanzerogenität von NMA in Nagern konnte darüberhinaus in Studien von Goodall *et al.* gezeigt werden (Goodall *et al.*, 1970). Hierbei wurde Albino Ratten an fünf Tagen pro Woche über das Trinkwasser 2 mg NMA über eine Dauer von 52 Wochen verabreicht (Goodall *et al.*, 1970). Die Tiere entwickelten daraufhin Tumore im oberen Verdauungstrakt, insbesondere in der Speiseröhre, wobei auch Tumore im Rachen und in der Zunge auftraten (Goodall *et al.*, 1970). Der TD_{50}-Wert für NMA liegt bei 0.106 mg/kg und basiert auf Daten, die in der Spezies Ratte erhoben wurden (Schmähl *et al.*, 1976; EMA, 2020). Für NMA wurde, ausgehend vom Lhasa TD_{50}-Wert, ein AI von 106 ng/Tag abgeleitet (Bercu *et al.*, 2023). Zur Bewertung der Humankanzerogenität von NMA ist die Datenlage bisher unzureichend (MAK, 2002; Sitarek *et al.*, 2016).

1.9 Risikobewertung von DNA-reaktiven *N*-Nitrosaminen in Arzneimitteln nach ICH M7

1.9.1 Karzinogene *N*-Nitrosamine

Die Risikobewertung von in Arzneimitteln auftretenden *N*-Nitrosaminen, für welche karzinogene Effekte durch Untersuchungen in Tierstudien belegt sind, erfolgt nach Kriterien, welche durch das International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH M7) festgelegt sind (ICH M7, 2023). Die Guideline regelt die Risikobewertung jeglicher Arzneimittelverunreinigungen,

welche mutagene Eigenschaften besitzen. In diesem Zusammenhang erfolgt die Ableitung substanzspezifischer akzeptabler Aufnahmemengen (AI) unter Zuhilfenahme bekannter Karzinogenitätsdaten, wobei eine lineare Extrapolation einer Effektkonzentration zur Dosis, welche der substanzspezifischen Aufnahmemenge entspricht, durchgeführt wird (ICH M7, 2023). Alternative Verfahren oder publizierte Grenzwerte, welche von regulatorischen Behörden als allgemein akzeptiert gelten, können ebenfalls angewendet werden (ICH M7, 2023). Unter der Vorraussetzung, dass eine bisher unbekannte Verbindung strukturell größe Ähnlichkeit zu einem bekannten und gut untersuchten Karzinogen aufweist, können zudem substanzspezifische Vorhersagen zum Krebsrisiko gemacht werden (ICH M7, 2023). Auf dieser strukturellen Ähnlichkeit basiert zudem die Ableitung provisorischer AIs (ICH M7, 2023). Die regulatorischen Limits basieren derzeit auf den AIs der potenten Nagerkarzinogenen NDMA und NDEA (ICH M7, 2023; Cross *et al*., 2021, vgl. Abschnitt 1.9.2). Die Guideline regelt darüberhinaus auch die Bewertung von Verunreinigungen, deren mutagene Effekte erst nach Überschreiten eines Grenzwertes auftreten sowie Anwendungen, für die ein zeitlich begrenztes Überschreiten des Grenzwertes, der dem Risiko bei lebenslanger Exposition entspricht, rechtfertigt (ICH M7, 2023).

1.9.2 *N*-Nitrosamine mit unbekanntem mutagenem und karzinogenem Potential

Aufgrund der Klassifizierung von *N*-Nitrosaminen als cohort of concern (CoC) Verbindungen bestehen strikte Regelungen, um die Exposition gegenüber diesen Substanzen zu minimieren (ICH M7, EMA, 2023; Kroes *et al.*, 2004; Cross *et al*., 2021). Diese Verbindungen sind als hochwirksame mutagene Kanzerogene definiert (ICH M7, 2023, EMA 2023). Die Risikobewertung für neu auftretende Verbindungen sowie für solche *N*-Nitrosamine, für welche keine robusten Daten in der Literatur hinsichtlich mutagener oder kanzerogener Effekte existieren, ist in der ICH M7 definiert und beginnt mit der Unterscheidung zwischen mutagenen und nicht mutagenen Substanzen (ICH M7, 2023). Für diese Verbindungen ist die Ableitung einer klassenspezifischen akzeptablen Aufnahmemenge (AI) als Teil einer vergleichenden Untersuchung mit strukturell ähnlichen *N*-Nitrosaminen, für welche Kanzerogenitätsdaten verfügbar sind, durch quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung (QSAR) möglich (ICH M7, 2023; Cross *et al.*, 2021). Von den Gesundheitsbehörden, darunter EMA, FDA und EFSA, wurden in diesem

Zusammenhang provisorische akzeptable Aufnahmemengen (AIs) festgelegt, die auf den im Nager erhobenen TD_{50}-Daten sowie auf den im Nager ermittelten TD_{50}-Werten strukturnaher Analoga basieren (ICH M7, 2023; Cross *et al.*, 2021). Hierbei wird der AI als die tägliche Aufnahmemenge definiert, die auf 100000 Individuuen nach 70-jähriger Exposition zu einem zusätzlichen Fall führt (Kruhlak *et al.*, 2024). Derzeit basieren diese gesetzlichen Grenzwerte auf den AIs der beiden hochpotenten Nagerkarzinogene *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA) und NDMA (ICH M7, 2023; Cross *et al.*, 2021). Vor der *in vitro* Testung mithilfe des Ames Testes nach den Vorgaben der Organization for Economic Co-operation and Development Testguideline 471 (OECD TG 471) erfolgt in diesem Zusammenhang die Vorhersage der Mutagenität *in silico* nach den Vorgaben der OECD (ICH M7, 2023; Cross *et al.*, 2021). Sobald die mathematische Vorhersage im Rahmen zweier unterschiedlicher anzuwendender Methoden, einerseits kriterienbasiert, andererseits statistikbasiert, positiv ausfällt, erfolgt die Überprüfung des Testergebnisses mittels Ames Test oder die Durchführung einer auf read across basierenden linearen Extrapolation (ICH M7, 2023; Cross *et al.*, 2021). Die Ermittlung von AIs erfolgt hierbei ab einer Startdosis von strukturell ähnlichen Substanzen, welche 50 % Tumoren induzieren hin zu einer Dosis, bei welcher das assoziierte Krebrisiko bei $1:10^5$ Fällen liegt (ICH M7, 2023). Diese Konzentration stellt die Schwellenwertdosis, den sogenannten Threshold of Toxicological Concern (TTC) dar (ICH M7, 2023). Mit dem TTC geht die Ableitung eines AIs einher, bei welchem mit einem zu vernachlässigen Risiko hinsichtlich Karzinogenität und anderen toxischen Effekten zu rechnen ist. Die entsprechende Formel ist in Abbildung 24 aufgeführt (Bercu *et al.*, 2023):

$$AI = TD_{50}/50000 \times 50\ kg$$

Abbildung 24: Formel zur Berechnung akzeptabler Aufnahmemengen. AI = Acceptable Intake. TD_{50} = Tumor Dose mit 50 % Inzidenz. Bercu *et al.*, 2023.

Der ICH M7 Guideline entsprechend ist hierbei der sensitivste TD_{50}, der aus der robustesten Sudie ermittelt wurde, zu berücksichtigen (Bercu *et al.*, 2023). Der so ermittelte AI Wert beschreibt ein Krebrisiko von < 1 bezogen auf 100000 Fälle unter der Annahme einer lebenslangen Exposition einer Person, die 50 kg wiegt. Aufgrund des konservativen Ansatzes der Extrapolation eines numerischen Wertes und die Übersetzung in die TTC Konzentration, welche AIs definiert, entspricht diese Menge nicht dem tatsächlichen Risiko unter realen Bedingungen (ICH M7, 2023). Gleichzeitig muss

beachtet werden, dass die Überschreitung dieses Wertes nicht zwingend zur Steigerung des Krebsrisikos führt und dass die hypothetisch kalkulierte Akzeptanzgrenze mit einem geringeren zusätzlichen Krebsrisiko als $1:10^5$ einhergeht (ICH M7, 2023). Das Risiko, welches nach Exposition gegenüber des TTCs resultiert, bleibt darüberhinaus bei mutagenen Substanzen, die in Tierstudien nicht karzinogen sind, unberührt (ICH M7, 2023). Um die auf read across basierende Vorhersage zu widerlegen ist ein eindeutig negatives Ames Testergebnis notwendig. Dieser muss wie in der aktualisierten Version der OECD Guideline von 2020 beschrieben durchgeführt werden (OECD, 2020). Ausnahmen stellen Verbindungen dar, die eine ähnliche Struktur wie das Produkt oder Prozessintermediate haben, in welchem sie vorkommen und für die negative Ames Test Ergebnisse existieren (ICH M7, 2023). Ist das Testergebnis nach QSAR Analyse negativ, erfolgt die Einhaltung von Grenzwerten, die für nicht mutagene Substanzen verbindlich sind (ICH M7, 2023). Falls die QSAR Analyse positiv, der Ames Test jedoch negativ ausfällt, ist ebenfalls die Einhaltung von Grenzwerten, welche für nicht mutagene Substanzen verbindlich sind, erforderlich (ICH M7, 2023). Das Ergebnis der QSAR Analyse kann im Rahmen der finalen Entscheidungsfindung weiterhin durch Experten geprüft und begründet werden (ICH M7, 2023). Die EMA empfiehlt für neu auftretende *N*-Nitrosamine, für die die Ableitung substanzspezifischer AIs aufgrund des Fehlens von TD_{50}-Werten aus Tierstudien nicht realisierbar ist, neben dem bereits erwähnten Ames Test die Durchführung des *in vivo* Transgenic Rodent Mutation Assay (EMA, 2025, EMA/409815/2020 Rev. 23). Bei Negativtestung erfolgt die Regulierung gemäß der Vorgaben, welche sich auf nicht mutagene Verunreinigungen beziehen und in Q3A(R2) sowie Q3B(R2) beschrieben sind (EMA, 2025, EMA/409815/2020 Rev. 23; ICH Topic Q3A (R2), 2006; ICH Topic Q3B (R2), 2006). Bei Negativtestung im Enhanced Ames Test, welcher in nachfolgendem Abschnitt näher beschrieben wird, liegt der einzuhaltende AI-Wert bei 1.5 µg/Tag (EMA, 2025, EMA/409815/2020 Rev. 23). Nach Positivtestung erfolgt bei Vorhandensein einer strukturell ähnlichen Verbindung eine auf read across basierende Extrapolation zur Ermittlung des AI-Wertes (EMA, 2025 EMA/409815/2020 Rev. 23). Auch nach Positivtestung im *in vivo* Transgenic Rodent Mutation Assay erfolgt die Ableitung des AIs mittels read across Analyse einer strukturverwandten Verbindung, für welche TD_{50}-Werte existieren (EMA, 2025, EMA/409815/2020 Rev. 23). Bei Fehlen eines geeigneten, strukturnahen Surrogates ist für die Ableitung von AI-Werten der CPCA

Ansatz anzuwenden, der nachfolgend erläutert wird (EMA, 2025, EMA/409815/2020 Rev. 23).

Carcinogenic Potency Categorization Approach

Die Vorraussage genotoxischer und kanzerogener Potenz von NDSRIs auf Basis von read-across unter Zuhilfenahme strukturnaher Analoga ist limitiert (Kruhlak *et al.*, 2024). Eine Limitation besteht im Fehlen robust getesteter, strukturverwandter Verbindungen mit bekannten Kanzerogenitätsdaten, die die strukturellen Eigenschaften der NDSRIs aufweisen (Kruhlak *et al.*, 2024). Eine weitere Limitation besteht in der Ableitung konservativer AIs, welche aus der read-across Analyse bei Fehlen eines geeigneten Surrogates resultieren und die praktische Umsetzung im Rahmen der Kontrolle von Verunreinigungen in Arzneimitteln erschweren (Kruhlak *et al.*, 2024). Um die Sicherheitsbewertung der NDSRIs im Hinblick auf Prädiktivität der Vorhersage kanzerogener Effekte zu verbessern, erfolgten weltweit verstärkte Anstrengungen seitens der zuständigen Behörden (Tuesuwan *et al.*, 2021). Eine Methode, die von EMA und der FDA entwickelt wurde, ist der Carcinogenic Potency Categorization Approach (CPCA) (Kruhlak *et al.*, 2024). Dieser basiert auf Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR), auf Daten von *N*-Nitrosaminen, für die ein TD_{50}-Wert durch robuste Testung in Tierstudien ermittelt wurde, auf von Rao und Coautoren definierten, relativen Wirkstärkeklassifikationen sowie auf AI-Werten die nach Ableitung eines strukturnahen Analogon erhalten wurden (Cross *et al.*, 2021; Kruhlak *et al.*, 2024; EMA, 2023; Rao *et al.*, 1979). Die in Tierstudien ermittelten TD_{50}-Werte sind in der Carcinogenic Potency Database (CPDB) sowie in der Lhasa Carcinogenicity Database (LCDB) dokumentiert (CPDB, 2005; LCDB, 2016). Im Rahmen des CPCA Ansatzes werden sowohl Anzahl und Verteilung verfügbarer H-Atome in unmittelbarer Umgebung zur Nitrosogruppe als auch deaktivierende strukturelle Merkmale berücksichtigt (Kruhlak *et al.,* 2024; Cross *et al.*, 2021). Letztere können beispielsweise zu einer verringerten α-Hydroxylierung oder zu einer erhöhten renalen Ausscheidung führen (EMA, 2023). Der CPCA Ansatz gilt für *N*-Nitrosamine, die ein Kohlenstoffatom auf beiden Seiten der Nitrosogruppe aufweisen, das nicht in Form einer Doppelbindung mit einem Heteroatom verknüpft ist (EMA, 2023). Verbindungen, in welchen die Nitrosogruppe mit einem Stickstoffatom, der innerhalb eines Heteroaromatischen Ringes gebunden ist, verknüpft ist, sind von der Bewertung des

karzinogenen Potentials nach CPCA ausgeschlossen (EMA, 2023). Für Verbindungen, die zwei Nitrosogruppen aufweisen, gilt der AI, der für die Gruppe mit dem höchsten karzinogenen Potential festgelegt wurde (EMA, 2023). Das Flussdiagramm zur Bewertung der karzinogenen Potenzgruppe ist in Abbildung 25 dargestellt: In diesem Zusammenhang erfolgt eine Zuordnung von Verbindungen in insgesamt fünf verschiedene Klassen, die je nach Grad der karzinogenen Potenz durch unterschiedliche AIs definiert sind (vgl. Abb. 25; FDA, 2023). Für in Gruppe eins kategorisierte Substanzen gilt ein AI von 26.5 ng, welcher auf dem im Nager ermittelten TD_{50}-Wert von NDEA basiert (Abb. 25; FDA, 2023). Die EMA legt für Substanzen dieser Kategorie einen Wert von 18 ng fest, welcher dem klassenspezifischen TTC Wert für Nitrosamin Verunreinigungen entspricht (s. Abb. 25; EMA, 2004). Für Substanzen der Gruppe zwei ist ein AI von 100 ng empfohlen, welcher auf den für NDMA und NNK ermittelten AIs von 96 ng (NDMA) und 100 ng (NNK) basiert (Abb. 25; EMA, 2023). Substanzen der Gruppe drei weisen geringere karzinogene Effekte auf, beispielsweise aufgrund des Vorhandenseins von Detoxifierungsreaktionen begünstigenden chemischen Gruppen (EMA, 2023). Für diese wird ein AI von 400 ng empfohlen (s. Abb. 25; EMA, 2023). Für Substanzen der Gruppe vier und fünf gilt ein AI von 1500 ng/Tag, welcher durch den Treshhold of Toxicological Concern (TTC) der ICH M7 Guideline definiert ist (Abb. 25; EMA, 2023). Bei diesem Konzept wird eine Akzeptanzgrenze für jede unbekannte Verbindung evaluiert, die mit einem vernachlässigbaren Risiko für Karzinogenität und weiteren toxischen Effekten verknüpft ist (EMA, 2023). Für Substanzen der Gruppe vier ist die Wahrscheinlichkeit einer metabolischen Aktivierung durch α-Hydroxylierung aufgrund struktureller Eigenschaften zwar unwahrscheinlich, jedoch möglich im Vergleich zu Substanzen der Gruppe fünf (EMA, 2023).

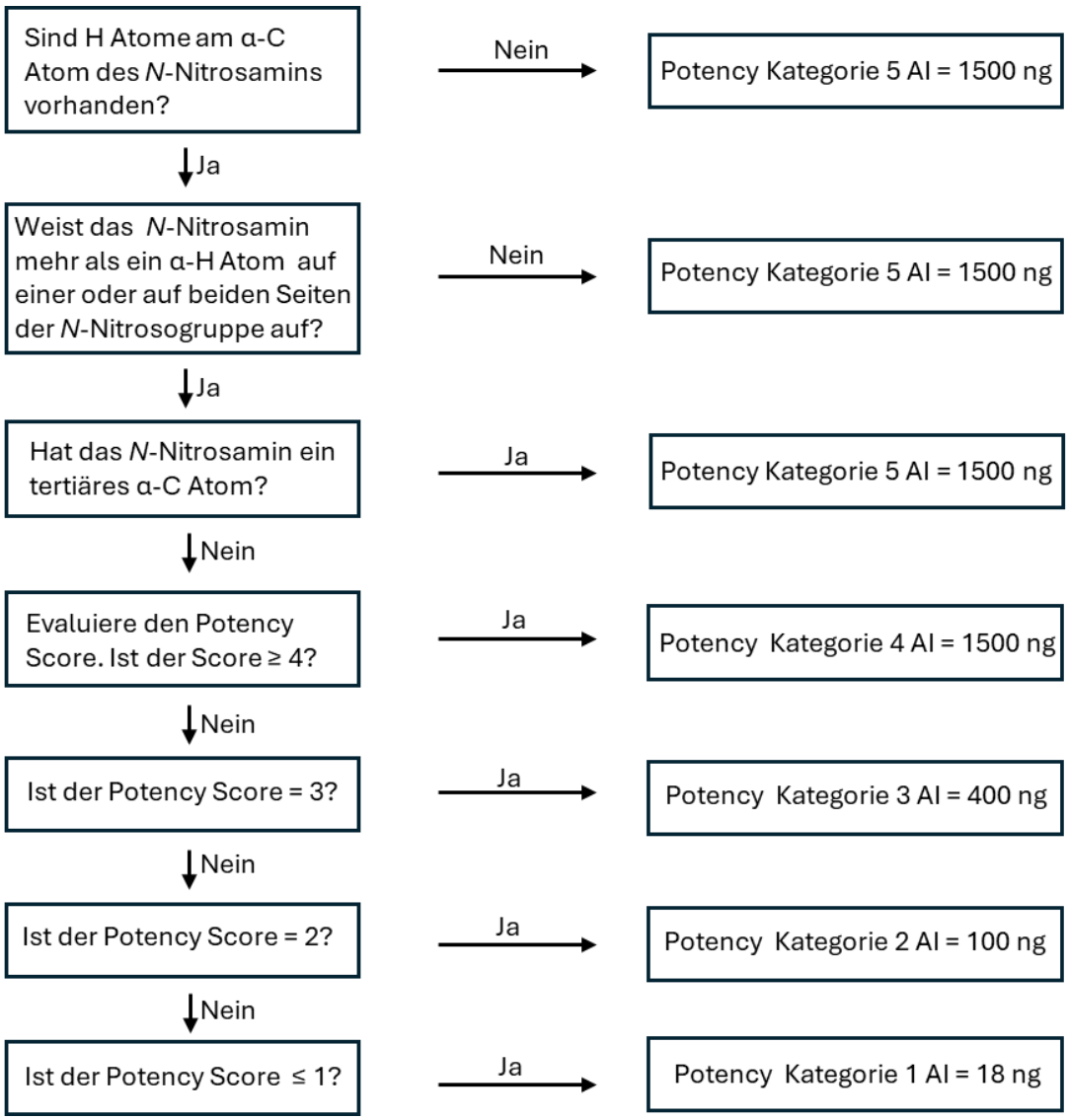

Abbildung 25: Flussdiagramm zur Vorhersage der Potency Kategorie eines N-Nitrosamins. AI = Acceptable Intake. Modifiziert nach EMA/451665/2023.

Für *N*-Nitrosamine, die nicht der Kategorie 5 angehörig sind, erfolgt die Bestimmung des Potency Scores, der die Kategorisierung in die übrigen Gruppen eins bis vier begründet, nach folgender Formel:

Potency Score = α-Hydrogen Score + Deactivating Feature Score + Activating Feature Score

Abbildung 26: Formel zur Berechnung des Potency Scores nach dem CPCA Ansatz. Modifiziert nach EMA/451665/2023.

Für den α-Hydrogen Score sind hierbei die Zahl der α-H Atome bedeutsam, für welche Werte von 0.2 bis 2.3 auftreten können (EMA, 2023). Der damit einhergehende Score umfasst numerische Werte von 1-3 (EMA, 2023). Viele freie H-Atome am α-C Atom

resultieren in einem geringen α-Hydrogen Score und in der Folge in einem geringeren Potency Score (EMA, 2023). Der Deactivating Score wird durch Addition verschiedener struktureller Eigenschaften erhalten, die die Wahrscheinlichkeit einer metabolischen Aktivierung senken oder Deaktivierungsreaktionen begünstigen (EMA, 2023). Ein Beispiel hierfür ist eine elektronenentziehende, chemische Gruppe am α-C Atom (EMA, 2023). Die Art des deaktivierenden Strukturmerkmals bestimmt das Ausmaß des deaktivierenden Effektes und wird im sogenannten Deaktivierungsscore ausgedrückt (EMA, 2023). Die Potency Kategorie wird bei Abwesenheit einer aktivierenden chemischen Gruppe folglich nach Addition der einzelnen Scores zwischen +1 und +3 zum α-Hydrogen Score erhalten (EMA, 2023). Schließlich müssen chemische Gruppen beachtet werden, die aufgrund der Förderung des α-C Aktivierungsweges zu einer erhöhten karzinogenen Potenz und nach dem CPCA Ansatz durch einen Aktivierungsscore von -1 folglich zu einer niedrigeren Kategorie führen (EMA, 2023). Ein Beispiel hierfür sind Methylgruppen, die am β-C Atom gebunden sind oder mit dem α-C Atom verknüpfte Arylgruppen (EMA, 2023). Ein positiver Ames Test nach einer positiv ausgefallenen QSAR Analyse macht das Ergreifen weiterer Maßnahmen notwendig (ICH M7, 2023). Bei nicht Gewährleistung festgelegter Grenzwerte ist die Testung mithilfe eines geeigneten *in vivo* Genotoxizitätstestes nach den innerhalb der ICH Guidelines beschriebenen Vorgaben notwendig, wobei je nach substanzspezifischem Mechanismus geeignete experimentelle Bedingungen gewählt werden müssen (ICH M7, 2023).

Enhanced Ames Test

Da das experimentellen Setting wie beispielsweise Inkubationszeit, Art des verwendeten S9 Mix und Lösungsmittel die Sensitivität des Ames Testes für *N*-Nitrosamine wie NDMA stark beeinflussen, existiert derzeit ein Optimierungsbedarf bestehender Testvarianten (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Im Jahr 2024 wurde von der EMA die Kriterien zur Durchführung des Enhanced Ames Testes (EAT) festgelegt, mit welchen die Testsensitivität des Standard Ames Testes zur Detektion mutagener Eigenschaften von *N*-Nitrosaminen wie NDMA und NDSRIs verbessert werden soll (EMA, 2024). Falls ein Standard Ames Test in einem positiven Ergebnis resultiert, ist eine weitere Testung mithilfe der EAT Methode nicht notwendig (EMA, 2024). Die Validierung des modifizierten Ames Protokoll erfolgte durch freie Forschungsgruppen und durch das nationale Zentrum

für toxikologische Forschung der FDA (NCTR), wobei eine Auswahl an strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen sowie NDSRIs Verwendung fanden (FDA, 2024; Li *et al.*, 2023). Hierbei erfolgt die Testung unter Verwendung der Bakterienstämme, die auch im Standard Ames Test nach OECD TG 471 festgelegt sind, allerdings mit konkreteren Angaben der jeweils zu verwendenden Stämme (EMA, 2024). In der Standardmethode kann TA1537 beispielsweise durch TA97 oder TA97a ersetzt werden (OECD, 2020). Der E.coli Stamm WP2 uvrA ist in der Standardmethode nach OECD TG 471 ersetzbar durch WPV uvrA (pKM101) oder S. typhimurium 102 (OECD, 2020). Im EAT Protokoll hingegen ist die Verwendung von TA1537 sowie WP2 uvrA (pKM101) empfohlen (EMA, 2020). Unterschiede bestehen auch in der Wahl des zu verwendeten Assaytypes (EMA, 2024). Im EAT Protokoll wird die Preinkubationsmethode empfohlen, während sich die in OECD TG 471 beschriebenen Kriterien sowohl auf die Preinkubationsmethode, als auch auf die Platteninkorporationsmethode beziehen (EMA 2020; OECD 2020). Auch im Hinblick auf das externe Metabolisierungssystem existieren Unterschiede. Während im EAT Protokoll eine Konzentration von 30 % dieses Systems, bestehend aus S9 Mix aus zwei definierten Nagerspezies, Hamster und Ratte, Teil der Vorschrift ist, kann der prozentuale Anteil des S9 Mix in der Testung nach Standardverfahren zwischen 5 % und 30 % liegen (EMA, 2024; OECD, 2020). Zudem gibt es nach Standardverfahren keine konkrete Angaben zur Art und Anzahl verschiedener S9 Mix, die zur Testung verwendet werden können (OECD, 2020). Für die Inkubationszeit innerhalb der Preinkubationsmethode ist nach OECD TG 471 ein Zeitraum von 20 Minuten oder länger definiert, während diese im EAT Protokoll auf 30 Minuten determiniert ist (OECD 2020; EMA 2024). Die Testung nach EAT Protokoll erfolgt wie im Standardverfahren sowohl mit als auch ohne metabolische Aktivierung (EMA, 2024). Hierbei muss vor Gewinnung des S9 Mix aus dem verwendeten Nagermodell eine Behandlung mit Enzyminduktoren wie Phenobarbital und β-Naphthoflavon erfolgen (EMA 2024; OECD 2020). Auch im Hinblick auf Konzentration eines angewendeten organischen Lösungsmittels existieren nach EAT Protokoll genauere Vorgaben (EMA, 2024). Hierbei wird einerseits die Verwendung des kleinsten, notwendigen Volumens gefordert, andererseits muss demonstriert werden, dass die gewählte Konzentration zu keiner Beeinträchtigung der metabolischen Aktivierung des zu testenden *N*-Nitrosamins führt (EMA, 2024). Die Auswahl der Positivkontrolle des zu testenden *N*-Nitrosamins muss nach EAT unter Angabe der an der metabolischen Aktivierung vermutlich beteiligten CYP

Isoformen begründet werden (EMA, 2024). In jedem Fall sind *N*-Nitrosamine, die nach metabolischer Aktivierung bekanntermaßen mutagen sind, als Positivkontrollen zu verwenden (EMA, 2024). In diesem Zusammenhang sind nach dem modifizierten Ames Test Protokoll NDMA, 1-Cyclopentyl-4-nitrosopiperazin und ein NDSRI zu verwenden (EMA, 2024). Schließlich existieren spezielle Vorgaben in Bezug auf Dokumentation des Testprotokolls, die im Abschnitt EAT Requirements aufzuführen sind und welche sich auf die genannten Kriterien, beispielsweise verwendete Bakterienstämme und Art des S9 Mix beziehen (EMA, 2024). Die Einhaltung sonstiger in der OECD TG 471 festgelegten Kriterien, beispielsweise die Anwendung Bakterienstamm spezifischer Positivkontrollen bleibt von speziellen EAT Vorgaben unberührt (EMA 2024; OECD 2020). Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Nitrosamine, darunter die NDSRIs NND, NFluo, NBH, NNT und NFA sowie für NMIPA und NMA gibt es AI-Werte. Der für NMA abgeleitete AI-Wert, welcher auf dem harmonischen Gold TD_{50}-Wert basiert, liegt bei 34.3 ng (vgl. Abschnitt 1.8.4; Bercu *et al*. 2023), Für NND ließ sich ein AI von 400 ng ermitteln (EMA, 2025, EMA/409815/2020 Rev. 23). Für NFA konnte, basierend auf dem CPCA Ansatz, ein AI von 1500 ng abgeleitet werden (EMA, 2025, EMA/409815/2020 Rev. 23). Für NFluo wird ein AI von 100 ng empfohlen (EMA, 2025, EMA/409815/2020 Rev. 23). Dieser resultiert auf read across basierend auf einer *in vivo* Positivtestung im Mutagenitätsassay, wobei der TD_{50}-Wert von NNK als Point of Departure (POD) zur Ableitung des AIs verwendet wurde (EMA, 2025, EMA/409815/2020 Rev. 23). NBH und NNT induzieren *in vivo* starke mutagene Effekte, was jeweils zur Ableitung eines AIs von 18 ng führt (EMA, 2025, EMA/409815/2020 Rev. 23). FürNMIPA konnte, basierend auf dem CPCA Ansatz, ein AI von 400 ng/Tag abgeleitet werden (EMA, 2023).

1.9.3 Nicht karzinogene *N*-Nitrosamine

Für Ames Test negative Verbindungen sowie für mutagene Substanzen, für die in geeigneten Tiermodellen negative Testergebnisse hinsichtlich des karzinogenen Potentials existieren, sind die in der Testguideline ICH M7 beschriebenen Regelungen nicht relevant (ICH M7, 2023). In dieser Arbeit wurden mit NPro und NMtBu zwei Substanzen untersucht, die Ames Test negativ sind und für welche Daten zum Widerlegen einer krebserzeugenden Wirkung existieren (Cascella *et al.*, 2018, Göller *et al.*, 2024). Bei NPro ist eine Oxidation am α-C Atom aufgrund des Fehlens freier α-H Atome nicht möglich (Cross *et al.*, 2021). Für NPro konnten Studien von Nixon *et al.*

karzinogene Effekte widerlegen (Nixon *et al.*, 1976). Bisher besteht keine Evidenz für eine tumorinduzierende Wirkung von NPro im Menschen, weshalb dieses Nitrosamin durch die IARC der Gruppe 3 zugeordnet ist (EMA, 1978; Göller *et al*, 2024). Im Fall von NMtBu verhindert die tert-butylgruppe die Oxidation am α-C Atom, was ebenfalls auf das Fehlen freier α-H-Atome zurückzuführen ist (Cross *et al.*, 2021). Die Oxidation auf der gegenüberliegenden Seite des tert-butylrestes kann zur Entstehung des tert-butyldiazoniumions führen (Cross *et al.*, 2021). Die DNA-Reaktivität dieses tert-butyldiazoniumions konnte durch verschiedene Studien widerlegt werden, ebenso die Induktion karzinogener Effekte (Magee *et al.*, 1964; Gold *et al.*, 1981). NMtBu ist bisher nicht durch die IARC klassifiziert. Basierend auf dem CPCA Ansatz konnte für NMtBu ein AI von 1500 ng/Tag festgelegt werden (EMA, 2023).

1.10 Risikobewertung von *N*-Nitrosaminen in Lebensmitteln

Im Jahr 2023 nahm das Panel on Contaminants in the Food Chain (Contam Panel) der European Food Safety Authority (EFSA) Stellung zur Risikobewertung von *N*-Nitrosaminen in Lebensmitteln (EFSA, 2023). Diese können im in Form von Kontaminanten in prozessierten Lebensmittelprodukten auftreten (EFSA, 2023). Abbildung 27 zeigt die Bildung in Lebensmitteln basierend auf einer Reaktion von aminobasierten Substanzen (R2NH) und nitrosierenden Agenzien (NOX), wobei *N*-Nitrosamine (R_2NNO) und eine Abgangsgruppe (HX) resultieren:

$$R_2NH + NOX \rightarrow R_2NNO + HX$$

Abbildung 27: Bildungsweg von N-Nitrosaminen in Lebensmitteln. Modifiziert nach EFSA, 2023.

Bei den in Lebensmitteln vorkommenden nitrosierenden Agenzien handelt es sich oftmals um Nitritsalze oder Stickstoffoxide (EFSA, 2023). Wegen mutagener und kanzerogener Eigenschaften von *N*-Nitrosaminen besteht die Frage der Dringlichkeit zur Anwendung von geeigneten Sicherheitsmanagementmaßnahmen (EFSA, 2012). Bereits im Jahr 2005 existierte mit der wissenschaftlichen Bewertung von Substanzen in Lebensmitteln, die mutagen und kanzerogen sind, eine Empfehlung zur Anwendung des Margin of Exposure (MoA) Konzeptes, welches sich jedoch nicht auf Verunreinigungen bezog (EFSA, 2005). Die Anwendbarkeit dieses Ansatzes für Verunreinigungen wurde vom wissenschaftlichen Komitee der EFSA im Jahr 2012 begründet (EFSA, 2012). In diesem Zusammenhang argumentierte das Komitee, dass durch die stetig verbesserte

Sensitivität angewendeter Detektionsmethoden ein Anstieg aufgetretener Verunreinigungen von mutagenen sowie kanzerogenen Verbindungen wie *N*-Nitrosaminen in verschiedenen Lebensmittelprodukten feststellbar ist (EFSA, 2012). Diese Entwicklung erfordert seitens regulatorischer Behörden eine Anpassung im Hinblick validierter Methoden zur Risikobewertung (EFSA, 2012). Nachdem das wissenschaftliche Komitee die Zulässigkeit und Validität dieses Ansatzes geprüft hatte, trat der MoE Ansatz für Verunreinigungen schließlich im Jahr 2012 in Kraft (EFSA, 2012). Die entsprechende Formel zur Ableitung des MoE ist in Abbildung 28 dargestellt:

$$\text{MoE} = \frac{BMDL10}{Exposition}$$

Abbildung 28: Formel zur Berechnung des Margin of Exposure (MoE). $BMDL_{10}$ = Benchmark Dose Lower Confidence Limit 10 %. Modifiziert nach EFSA, 2005.

Hierbei wird ein Margin of Exposure von 10000 oder höher, beschrieben durch das Verhältnis der Benchmark Dose Lower Confidence Limit ($BMDL_{10}$) aus in Tierexperimenten erhaltenen Daten unter Berücksichtigung verschiedener Unsicherheitsfaktoren und der menschlichen Exposition als geringer Grad zur Besorgnis festgelegt (vgl. Abb. 28; EFSA, 2012). Die untere Grenze des Konfidenzintervalles wird durch Extrapolation aus Dosis-Wirkungskurven erhalten und ist mit dem Auftreten eines Effektes, der Benchmark Response (BMR) verknüpft (EFSA 2022). In diesem Zusammenhang muss beachtet werden, dass der MoE kein quantifizierbares Risiko darstellt (EFSA, 2012). Sowohl die Ableitung des MoE, die Höhe des MoE, die verwendeten Unsicherheitsfaktoren und die harmonisierten Einstufungskriterien im Hinblick auf hohe Bedenken, geringe Bedenken und unwahrscheinliches Risiko für negative Effekte auf die Gesundheit sind zu protokollieren (EFSA, 2012). Zudem schließen auch Fälle, in welchen ein MoE > 10000 feststellbar ist, das Ergreifen von Risikomanagementmaßnahmen nicht aus (EFSA, 2012). Daten zur Exposition wurden durch die interne Datenbank der EFSA sowie durch Literaturdaten erhalten, wobei mit a) alkoholischen Getränken, b) Kaffee, Kakao, Tee und Teextrakt, c) Fisch, Meeresfrüchte, Amphibien, Reptilien und Wirbellose, d) Fleisch-und Fleischprodukte sowie e) Gewürze, Saucen und Würzmittel insgesamt fünf verschiedene Lebensmittel Kategorien berücksichtigt wurden (EFSA, 2023). Hierbei wurden unprozessierte, gekochte Fleisch-, und Fischprodukte in Szenario 2 berücksichtigt, in Szenario 1 hingegen von der Risikobewertung ausgeschlossen (EFSA, 2023). LC-MS Methoden eignen sich aufgrund

der Detektierbarkeit von flüchtigen und nicht flüchtigen *N*-Nitrosaminen in Lebensmitteln sowie hoher Sensitivität und Selektivität sehr gut (EFSA, 2023). Insgesamt flossen aus der Datenbank 2817 Ergebnisse für Lebensmittelproben, die zwischen 2003 und 2021 analysiert wurden, in die Bewertung ein (EFSA, 2023). Die Literaturdaten, die zwischen 1990 und 2021 analysiert wurden, lieferten zusätzlich 3976 analytische Ergebnisse aus EU-Ländern sowie 27 Ergebnisse aus nicht-EU Ländern (EFSA, 2023). Aufgrund der verfügbaren Daten zur Exposition konnten für die Sicherheitsbewertung nur zehn der 32 Verbindungen, darunter NDMA, NDEA, *N*-Nitrosomethylethylamin (NMEA), *N*-Nitrosodipropylamin (NDPA), *N*-Nitrosodibutylamin (NDBA), NMA, *N*-Nitrososarcosin (NSAR), *N*-Nitrosomorpholin (NMOR), *N*-Nitrosopiperidin (NPIP) und *N*-Nitrosopyrrolidin (NPYR) berücksichtigt werden (EFSA, 2023). Für diese ist bekannt, dass hauptsächlich CYP2E1 und CYP2A6 an der metabolischen Aktivierung beteiligt sind, während CYP2B1 und CYP1A1 nur teilweise involviert sind (EFSA, 2023). Zur Bestimmung der Potency Faktoren der zehn *N*-Nitrosamine erfolgte sowohl die Berücksichtigung von TD_{50}-Werten als auch die Ableitung von $BMDL_{10}$-Werten (EFSA, 2023). Wegen limitierter *in vivo* Daten für NSAR erfolgte zur Risikobewertung eine Vorhersage der TD_{50}-Werte auf read across Basis (EFSA, 2023). Die Ableitung der $BMDL_{10}$ war für NDMA ($BMDL_{10}$: 0.035 mg/kg; TD_{50}: 0.0959 mg/kg), NDEA ($BMDL_{10}$: 0.01 mg/kg; TD_{50}: 0.0265 mg/kg), NMOR ($BMDL_{10}$: 0.014 mg/kg; TD_{50}: 0.109 mg/kg), NPIP ($BMDL_{10}$: 0.026 mg/kg; TD_{50}: 1.11 mg(/kg und NPYR ($BMDL_{10}$: 0.127 mg/kg, TD_{50}: 0.799 mg/kg möglich (EFSA, 2023). Die TD_{50} war zudem für NMEA (0.05 mg/kg), NDPA (0.186 mg/kg), NDBA (0.169 mg/kg), und NMA (0.142 mg/kg) aus tierexperimentellen Studien verfügbar und bot ein zweites Kriterium zur Ableitung von Potency Faktoren (EFSA, 2023; Gold *et al.*, 1991). Unabhängig von der Wahl des POD in Form der $BMDL_{10}$-, oder des TD_{50}-Wertes konnte die stärkste mutagene und kanzerogene Potenz für NDEA, NMEA, NDMA und NMOR festgestellt werden (EFSA, 2023). In einem konservativen Ansatz erfolgte die Festlegung der gleichen karzinogenen Potenz für alle zehn untersuchten Verbindungen. Hierbei wurde das Verhältnis des niedrigsten $BMDL_{10}$-Wertes (0.010 mg/kg) für die Gruppe der *N*-Nitrosamine mit dem höchsten Grad der Besorgnis, (NDEA, NMEA, NDMA und NMOR) zum niedrigsten $BMDL_{10}$-Wert (0.062 mg/kg) der verbleibenden *N*-Nitrosamine (NDPA, NMA, NDBA, NPYR, NPIP, NSAR) verwendet (EFSA, 2023). Damit wurde ein Potency Faktor von 0.2 für beide Subgruppen ermittelt (EFSA, 2023). Innerhalb der untersuchten Lebensmittelgruppen stellten Fleisch und

Fleischprodukte für beiden betrachtet Szenarien die Hauptlebensmittelkategorie dar, die zur Exposition gegenüber *N*-Nitrosaminen beiträgt (EFSA, 2023). Da Kinder besonders empfindlich gegenüber potenziell gesundheitsschädlichen Stoffen sind erfolgt die Ableitung akzeptabler täglicher Aufnahmemengen über die Lebensspanne hinweg (ADIs) unter Berücksichtigung der Exposition dieser Bevölkerungsgruppe (BFR, 2016). Im Folgenden soll näher auf die Exposition von jungen Menschen eingegangen werden. Für Szenario 1 lag die obere Grenze der Exposition unter Annahme des P95 zwischen 0 und 54.8 ng/kg für Kleinkinder. In Szenario 2 wurde für Kleinkinder eine Exposition von 34.7 ng/kg und für Jugendliche eine Exposition von 208.8 ng/kg für die obere Grenze des P95 ermittelt (EFSA, 2023). Der daraus abgeleitete MoE beider Szenarien variierte zwischen 48 und 3337 unter Berücksichtigung des Perzentil 95 (P95) (EFSA, 2023). In diesem Zusammenhang ließ sich ein MoE von 183-3337 für Szenario 1 und ein MoE von 48 - 322 für Szenario 2 ermitteln (EFSA, 2023). Abschließend resultiert mit 98 % - 100 %-iger Wahrscheinlichkeit, dass für alle Altergruppen unter Annahme der P95 Exposition der MoE gegenüber *N*-Nitrosaminen kleiner als 10000 ist (EFSA, 2023). Dennoch muss bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden, dass zwei wesentliche Unsicherheitsfaktoren in a) nicht zugänglichen und damit nicht auswertbaren Daten sowie b) im Fehlen von Daten wichtiger Lebensmittelgruppen bestehen (EFSA, 2023). Dazu zählen beispielsweise Getreide und Getreidebasierende Produkte, sowie die Gruppe bestehend aus Hülsenfrüchten, Nüsse, Ölsaaten, Gewürze und weitere Lebensmittelgruppen (EFSA, 2023). Ausgehend von diesen Unsicherheiten muss angenommen werden, dass abgeleitete P95 Expositionswerte um den Faktor drei geringer sowie um den Faktor acht höher sein können (EFSA, 2023). Da mit einem MoE Wert <10000 ein Grund zur Besorgnis besteht, sind Risikomanagementmaßnahmen zu treffen, mit denen das Risiko, welches von *N*-Nitrosaminen in Lebensmitteln ausgeht, näher charakterisiert werden kann. Zusammengefasst zählen hier sowohl konkretere Angaben zur Exposition, was einerseits durch Standardisierung analytischer Methoden, andererseits durch Ausweitung untersuchter und in die Risikobewertung einfließender Lebensmittel, wie weitere prozessierte Produktgruppen sowie Lebensmittel, die durch alternative Verfahren zubereitet wurden, erzielt werden kann (EFSA, 2023). Weiterhin schlägt das CONTAM Panel der EFSA eine nähere Untersuchung genotoxischer und karzinogener Eigenschaften der in Lebensmitteln vorkommenden *N*-Nitrosamine vor

(EFSA, 2023). Es sollen schwerpunktmäßig Daten zum Absorptions-, Metabolisierungs-, Distributions-, und Eliminationsprozess (ADME) erhoben und untersucht werden. Andererseits soll die Art der metabolischen Aktivierung sowie die mutagene Potenz von *N*-Nitrosaminen mit bisher unbekannten genotoxischen und karzinogenen Wirkmechanismen wie NMOR, NPIP und NPYR einschließlich gebildeter DNA-Addukte evaluiert werden (EFSA, 2023). Darüberhinaus sollen epidemiologischen Studien zur Herstellung einer Korrelation zwischen Exposition gegenüber *N*-Nitrosaminen und Krebsenstehung im Menschen unter Verwendung eines molekularen Ansatzes und unter Berücksichtigung möglicher Confounder wie berufliche Exposition oder Medikamente implementiert werden (EFSA, 2023). Hierbei wäre die Anwendung von -omiks Techniken möglich, mit denen ein Monitoring der Protein-, RNA-, und DNA-Veränderungen infolge der Exposition gegenüber *N*-Nitrosaminen realisiert werden kann (EFSA, 2023).

1.11 Leberzellmodelle zur Untersuchung von *N*-Nitrosaminen

1.11.1 Primäre Rattenhepatozyten

Bei primären Rattenhepatozyten (PRH) handelt es sich um Leberparenchymzellen, deren metabolische Kompetenz und Morphologie *in vivo* Bedingungen ähneln (Schulte-Hubbert *et al.*, 2020). Aufgrund der raschen Abnahme der Enzymaktivität, leberspezifischer Eigenschaften sowie der Viabilität eignen sie sich insbesondere für Kurzzeitanalysen (Schulte-Hubbert *et al.*, 2020; Agius *et al.*, 1985). Um ein Anwachsen primärer Hepatozyten zu ermöglichen, sind Kollagen beschichtete Zellkulturplatten geeignet (Schulte-Hubbert *et al.*, 2020; Soldatow *et al.*, 2013; Agius *et al.*, 1985). Die primären Zellen können nach *in situ* Perfusion isoliert und kultiviert werden, wobei sich oxidativer Stress sowie die Schädigung von Zellmembranen und membranständigen Rezeptoren meist nicht vermeiden lassen (Soldatow *et al.*, 2013). Durch den Verlust von Zell-Zell Verbindungen geht ein Verlust von Zellpolarität, Zelldifferenzierung und Zellintegrität einher (Soldatow *et al.*, 2013). Neben dem Fremdstoffmetabolismus sind Leberzellen an einer Vielzahl unterschiedlicher Aufgaben beteiligt (Trefts *et al.*, 2017). Hierzu zählt der Makronährstoffwechsel mit welchem der Auf-, und Abbau von Fetten, Kohlenhydraten und Proteinen zur Energiegewinnung und Energiespeicherung assoziiert ist (Trefts *et al.*, 2017). In diesem Zusammenhang bewerkstelligt die Leber die Speicherung von Glukose in Form von Glykogen, die Bereitstellung von Glukose bei Energiemangel, den Abbau von

Lipiden durch Oxidation sowie die Verpackung von Lipiden zum Transport und zur Speicherung im Fettgewebe (Trefts *et al.*, 2017). Auch der Cholesterinstoffwechsel, wozu beispielsweise die Produktion von Gallensäuren zur Fettverdauung zählt, findet in der Leber statt (Trefts *et al.*, 2017). Neben der Blutvolumenregulation ist die Leber zudem an der Immunabwehr beteiligt, ebenso erfolgt die endokrine Kontrolle von Wachstumshormonen sowie die Produktion von Proteinen zur Blutgerinnung (Trefts *et al.*, 2017). Zur Untersuchung hepatotoxischer Eigenschaften verschiedener Chemikalien gelten primäre Humanhepatozyten (PHH) aufgrund der hohen Proteinaktivität der an der Biokatalyse von Fremdstoffen beteiligten Enzyme als Goldstandard (Fraczek *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2025). Wegen großer Ähnlichkeiten im Fremdstoffwechsel zwischen Mensch und der Spezies Ratte werden PRH für toxikologische Untersuchungen ebenfalls häufig empfohlen (Fraczek *et al.*, 2013). Neben Phase I Enzymen konnte auch Proteinaktivität wichtiger Phase-II Enzyme, darunter Glutathion-S-Transferase (GST) und UDP-Glucoronosyltransferase (UGT) in PRH nachgewiesen werden (Zurlo *et al.*, 1996; Schulte-Hubbert *et al.*, 2020) Sulfotransferase (SULT)-Aktivität konnte ebenfalls in PRH nachgewiesen werden (Smith *et al.*, 2012). Aufgrund der Tatsache, dass für die Analyse strangbruchinduzierender Eigenschaften nach OECD TG 489 die Spezies Ratte vorgesehen ist, sind PRH zur Durchführung des alkalischen Comet Assays geeignet (OECD, 2016). Primäre Hepatozyten besitzen darüberhinaus viele Influx-, und Efflux-Transporter, welche die Aufnahme und Ausscheidung von Fremdstoffen und deren Metaboliten ermöglichen (Gupta *et al.*, 2021). Trotz der beschriebenen Ähnlichkeiten existieren Unterschiede zwischen Mensch und Nager im Hinblick auf Proteinaktivität, Isoformkomposition und Expressionslevel verschiedener CYP Enzyme. Insbesondere die am Metabolismus von *N*-Nitrosaminen beteiligten CYP Enzyme, darunter CYP2E1, CYP3A4 und CYP2A6 sind hierbei von Relevanz (Cross *et al.*, 2021). Das CYP3A4 entspricht den CYP3A1 und CYP3A2 Analoga der Ratte, welche in der Leber exprimiert werden (Martignoni *et al.*, 2006). Hier konnten anhand prototypischer Substrate wie Nifedipin Unterschiede bezüglich der Substratspezifität und der katalytischen Aktivität zwischen Mensch und Ratte gezeigt werden (Carr *et al.*, 2006). Die Nager Orthologe des menschlichen CYP2A6 sind CYP2A1, CYP2A2 und CYP2A3, wobei letztere Isoform in extrahepatischen Geweben vorkommt (Martignoni *et al.*, 2006). Zwischen CYP2A6 und CYP2A1/2A2 konnte 60 % Sequenzhomologie nachgewiesen werden (Martignoni *et al.*,

2006). Unterschiede im Substratspektrum zeigen sich beispielsweise am endogenen CYP2A1/2 Substrat Testosteron, das im Menschen im Vergleich zum Nagernicht durch CYP2A6 verstoffwechselt wird (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die Sequenzhomologie zwischen CYP2E1 der Ratte und des Menschen sowie des zugehörigen Substratspektrums liegt demgegenüber bei 80 % (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Substraten, die durch diese Isoform hauptsächlich biokatalysiert werden, ist aus diesem Grund mit höherer Zuverlässigkeit verbunden im Vergleich zu Ergebnissen von CYP3A4 und CYP2A6 Substraten (Martignoni *et al.*, 2006). Mithilfe verschiedenen CYP Enzym Assays kann die Aktivität der am Phase-I Metabolismus von *N*-Nitrosaminen beteiligten CYP Enzyme bestimmt werden (Schulte-Hubbert *et al.*, 2020). Der BROD Assay eignet sich hierbei durch Messung einer erhöhten Benzoxyresorufin-O-dealkylase Aktivität zur Bestimmung von CYP1A2, CYP2B1 sowie von CYP3A1 und CYP3A2 (Schulte-Hubbert *et al.*, 2020). Auch mit dem Pentoxyresorufin-O-dealkylase (PROD) Assay lässt sich die enzymatische Aktivität von CYP2B sowie von CYP1A1/1A2 bestimmen (Schulte-Hubbert *et al.*, 2020). Darüberhinaus kann der EROD Assay, der spezifisch zur Messung der Enzymaktivität von CYP1A1/A2 und CYP2B1/2B2 dient, durchgeführt werden (Meimberg *et al.*, 1997). Hierbei werden Substrate verwendet, die zu einer CYP1A vermittelten erhöhten Aktivität der Ethoxyresorufin-O-dealkylase (EROD) führen (Meimberg *et al.*, 1997). Die CYP Enzymaktivität primärer Zellen in Kultur nimmt nach kurzer Zeit stark ab (Schulte-Hubbert *et al.*, 2020). So lag die Abnahme nach 72 h bei 90 % für die PROD Aktivität und bei 100 % für die BROD Aktivität, während die Abnahme der EROD Aktivität nach 48 h 80 % betrug (Schulte-Hubbert *et al.*, 2020). Neben der Aktivität der am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Enzyme spielt für die Frage, ob das jeweilige Zellmodell zur Untersuchung genotoxischer Eigenschaften geeignet ist, die Expression und Aktivität von an der DNA-Schadensantwort beteiligten Proteinen und Reparaturenzymen eine Rolle. So konnte in Studien von Carlsson und Coautoren gezeigt werden, dass das Ausmaß der durch NDMA induzierten Alkylierungsschäden von der MGMT-Aktivität abhängig ist (Carlsson *et al.*, 2025). Der p53 Status ist in diesem Zusammenhang auch relevant, wie in Studien von Grombacher *et al.* gezeigt werden konnte (Grombacher *et al.*, 1998). So nahmen Expression und Aktivität von MGMT und p53 in Maus, Ratten und Humanzellen infolge induzierter DNA-Strangbrüche zu, welche nach Exposition gegenüber UV-Strahlung, IR-Strahlung, alkylierenden Agenzien sowie

Restriktionsendonukleasen entstehen können (Grombacher *et al.*,1998). Die MGMT-Expression nimmt auch in der Ratten Hepatomzelllinie H4IIE infolge der Exposition gegenüber genotoxischen Agenzien zu (Grombacher *et al.*, 1998). In Maus Fibroblastenzellen, die den Wildytyp von p53 exprimieren, darunter BK2 und BK4 sowie fib2, erfolgte die Induktion der MGMT-Expression nachdem DNA-Doppelstrangbrüche durch Strahlung verursacht wurden (Grombacher *et al.*, 1998). Für aus knock-out Mäusen stammende BK1 und fib1 Zellen, die p53 defizient sind, konnte weder erhöhte Expression der MGMT, noch gesteigerte Aktivität nachgewiesen werden (Grombacher *et al.*, 1998). Damit konnte dieser Effekt nur in Zellen gezeigt werden, die über Wildtyp p53 verfügen, womit sich demonstrieren lässt, dass die Induzierbarkeit der MGMT vom p53 Status abhängig ist (Grombacher *et al.*, 1998). Im Hinblick auf molekulare Mechanismen für die p53 assoziierte Regulation der MGMT vermutet man eine Interaktion von p53 mit basalen Transkriptionsfaktoren, die die MGMT regulieren, darunter Sp1 (Grombacher *et al*, 1998). Sp1 wurde bereits in vielen Promotorregionen von Housekeeping Genen detektiert, womit angenommen werden kann, dass dieser Transkriptionsfaktor an der Regulation der basalen Promoteraktivität beteiligt ist (Grombacher *et al.*, 1998). Darüberhinaus konnte eine Beteiligung an der Geninduktion durch Sp1 nachgewiesen werden (Yuroshko *et al*., 1997). Weiterhin ist bekannt, dass Sp1 p53 bindet und dass in der Promotorregion der MGMT einige Sp1 Bindungsstellen lokalisiert sind (Borellini *et al.*, 1993, Harris *et al.*, 1992). Ein alternativer Mechanismus der p53 vermittelten MGMT-Expressionssteigerung konnte von Blough und Koautoren in aus C57bl/6 Mäusen stammenden Astrozytenzellen gezeigt werden (Blough *et al.*, 2007). Im Allgemeinen erfolgt die p53 vermittelte Regulation von Genen, die eine p53 consensus site enthalten, über Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie (Blough *et al.*, 2007). In murinen Astrozytenzellen konnte gezeigt werden, dass die interaktion von p53 mit einer consensus site in der murinen Promotorregion der MGMT, GADD45, ausreichend zur p53 assozziierten Induktion der MGMT-Expression ist, wobei auch in dieser Studie nur Effekte in murinen Zellen messbar waren, die Wildtyp p53 exprimieren, während p53 defiziente Zellen unveränderte Aktivität und Expression der MGMT zeigten (Blough *et al.*, 2007). Weitere Studien zur Erklärung der p53 vermittelten MGMT-Regulation über zelluläre Signaltransduktionskaskaden sind erforderlich (Grombacher *et al.*, 1998; Blough *et al.*, 2007). In PRH konnte die Aktivität und Expression von p53 nachgewiesen werden (Van

Gijssl *et al.*, 1997). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die MGMT in PRH exprimiert wird, und dass die Expression durch verschiedene Xenobiotika wie *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) sowie durch Röntgenstrahlung induzierbar ist (Grombacher *et al.*, 1994). Damit kann angenommen werden, dass sich dieses Zellmodell insbesondere zur Untersuchung von TMZ sowie von *N*-Nitrosaminen wie NDMA oder NNN eignet, welche DNA-Addukte wie O^6-MeG oder O^6-pobG induzieren, da diese bekanntermaßen durch die MGMT repariert werden (Fahrer *et al.*, 2023). Aufgrund des Vorhandenseins der MGMT und des Tumorsuppressors p53 besteht weiterhin Grund zur Annahme, dass eine p53 vermittelte Induktion der MGMT-Expression nicht nur in den von Grombacher verwendeten p53 profizienten Mausfibroblastenzelllinien stattfinden kann, sondern auch in PRH nach Exposition gegenüber alkylierenden Agenzien wie *N*-Nitrosaminen (Grombacher *et al.*, 1998). Neben der direkten Schadensreversion durch die MGMT konnte die Aktivität weiterer DNA-Reparaturwege in PRH demonstriert werden (Abalea *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 2025). In diesem Zusammenhang trat eine gesteigerte Aktivität von an der BER beteiligten Proteinen nach Induktion von durch Eisen induzierten, oxidativen Schäden in PRH im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf (Abalea *et al.*, 1998). In einer weiteren Studie ließ sich BER indirekt durch die Messung von N7-MeGAdduktleveln in PRH demonstrieren, die mit den NDSRIs NNT und NBH behandelt wurden (Vogel *et al.*, 2025). Hierbei ließ sich ein zeitabhängiger Rückgang der DNA Adduktlevel ermitteln (Vogel *et al.*, 2025). Ferner war in PRH TCR durch Abnahme von durch Cyclobutan Pyrimidin Dimeren, welche durch UV-Strahlung induziert wurden, feststellbar (Guo *et al.*, 1998). Damit verfügen PRH über die Vorraussetzung um Substrate der NER, welche durch sperrige *N*-Nitrosamine wie NNN oder NNK induziert werden, zu reparieren (Urban *et al.*, 2012; Fahrer *et al.*, 2023; Guo *et al.*, 1998).

1.11.2 HepG2

Es handelt sich bei HepG2, um eine epithelzellartige, immortalisierte Leberzelllinie, die nach mehrmonatiger Kultivierung etabliert wurde (Aden *et al.* 1979; López-Terrada *et al.*, 2009; Steinbrecht *et al.*, 2019). Die Zellen wurden aus Biopsien des epithelialen Hepatoblastoms eines 15-jährigen Jungen kaukasischer Abstammung aus Argentinien isoliert (Aden *et al.*, 1979; López-Terrada *et al.*, 2009; Steinbrecht *et al.*, 2019). Das einfache Handling, geringe Kosten, simpel durchführbare Kultivierung sowie die allgegenwärtige Verfügbarkeit sind einige der Vorteile von HepG2 Zellen, die die

Anwendung in leicht reproduzierbaren Standardprotokollen ermöglichen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Es handelt sich um eine sehr gut charakterisierte Zelllinie, die häufig zur Untersuchung der Biotransformation von Fremdstoffen einschließlich der Detektion von Promutagen verwendet wird (Wilkening *et al.*, 2003; Brandon *et al.*, 2003). Auch zur Untersuchung von Transportern ist diese durch Fremdstoffe induzierbare Zelllinie geeignet (Brandon *et al.*, 2006). HepG2 Zellen ähneln Leberparenchymzellen hinsichtlich der Morphologie und wachsen adhärent (Schulte-Hubbert *et al.*, 2020). HepG2 Zellen, die eine Chromosomenanzahl zwischen 48 und 54 aufweisen, wachsen im Vergleich zu anderen Krebszelllinien relativ langsam in Kultur, was anhand der Verdopplungszeit von 20 h - 28 h verdeutlicht wird (Wilkening *et al.*, 2003; Knasmüller *et al.*, 1998). HepG2 Zellen weisen leberspezifische Eigenschaften auf, wozu mitunter die Expression von Plasmaproteinen zu nennen ist (Aden *et al.*, 1979). Aufgrund der Expression von Phase-I und Phase-II-Enzymen eignen sich die Zellen für Metabolismusstudien sowie zur Testung indirekter Mutagene (Knasmüller *et al.*, 1998). Darüberhinaus eignen sich HepG2 Zellen zur Detektion direkter Mutagene wie Mitomycin C (MMC) und MMS (Natarajan *et al.*, 1991). Sowohl im Hinblick auf Aktivität als auch auf das Expressionslevel der am Stoffwechsel von Fremdstoffen beteiligten Enzyme ist diese Zelllinie nicht mit primären Hepatozyten vergleichbar. In einer Studie von Bader *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Expression von *CYP1A2*, *CYP2C9*, *CYP3A4* und *CYP2E1* relativ gering ist, während für die Expression von *CYP1A1*, *CYP2B6*, *CYP2D6* und *CYP3A7* sowie für *UGT1A6* und *NQO1* vergleichbare Level wie für primäre Hepatozyten mittels qRT-PCR messbar waren (Wilkening *et al.*, 2003). Zu den Enzymen mit der stabilsten Expressionsrate zählen *CYP2D6*, *EPHX1* und *GSTM1*, während die Expression der anderen Enzyme Passage-, und zeitabhängigen Schwankungen unterliegen (Wilkening *et al.*, 2003). Weitere Daten belegen die Expression von UDP-Glucoronyltransferasen (UGTs), Sulfotransferasen (SULTs) und Glutathion-S-Transferasen (GSTs) in HepG2 Zellen (Steinbrecht *et al.*, 2019; Kanebratt *et al.*, 2008; Doostdar *et al.*,1988; Duthie *et al.*, 1988; Nakamura *et al.*, 2008). Für GST konnte eine mit primären Hepatozyten vergleichbare Proteinaktivität gezeigt werden (Steinbrecht *et al.*, 2019; Nakamura *et al.*, 2008). Ferner existieren in der Literatur Hinweise darauf, dass die CYP Expression in HepG2 Zellen geringer ist als in primären Hepatozyten (Westerink *et al.*, 2007). Die Expression der Phase-II Enzyme SULT1A1 und SULT1A2 in HepG2 Zellen ist auch durch

Studien von Brandon *et al.* bekannt (Brandon *et al.*, 2006 ; Brandon *et al.*, 2003). Während die Expression von SULT1A1 und SULT1A2 in HepG2 Zellen ähnlich hoch ist wie in primären Hepatozyten, ist die Expression von CYP Enzymen geringer, was oftmals zu einer Unterschätzung der Toxizität verschiedener Fremdstoffe führt (Westerink *et al.*, 2007). Sowohl die Aktivität als auch die Menge von CYP Enzymen sind durch Mediumzusätze beeinflussbar (Doostdar *et al.*, 1988). Zudem können CYP Induktoren zur Erhöhung der enzymatischen Aktivität verwendet werden (Brandon *et al.*, 2003). Bekannte Beispiele sind Induktoren von CYP2A6 wie Pyrazol, sowie Ethanol zur Induktion von CYP2E1 (Brandon *et al.*, 2003). Phenobarbital findet zur gesteigerten Expression von CYP2C9 Anwendung (Brandon *et al.*, 2003). Auch Seo und Coautoren konnten zeigen, dass die metabolische Aktivität in HepG2 Zellen geringer ist als in der Hepatom Zelllinie HepaRG, welche sich unter anderem durch mit primären Hepatozyten vergleichbarer Proteinaktivität von Phase-I und Phase-II Enzymen auszeichnet (Seo *et al.*, 2019). Für ausreichend metabolische Kompetenz, welche zur Untersuchung toxikologischer Eigenschaften von *N*-Nitrosaminen zwingend erforderlich ist, ist die Supplementierung von HepG2 Zellen mit einem exogenen Metabolisierungssystem wie S9 Mix sinnvoll (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Otto *et al.*, 2008). Eine Alternative stellen gentechnisch modifizierte Zelllinien dar, mit welchen die Metabolisierung einschließlich genotoxischer Eigenschaften bestimmter Fremdstoffe näher untersucht werden kann (Herzog *et al.*, 2016 ; Steinbrecht *et al.*, 2019; Steinbrecht *et al.*, 2020; Carlsson *et al.*, 2025). In diesem Zusammenhang lassen sich durch lentivirale Transfektion HepG2 Zellen mit stabiler Expression bekannter CYP Enzyme wie CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4 und CYP2E1 herstellen, wovon CYP3A4, CYP1A2 und CYP2E1 auch im Rahmen dieser Arbeit Verwendung fanden (Herzog *et al.*, 2016; Steinbrecht *et al.*, 2019; Steinbrecht *et al.*, 2020; Carlsson *et al.*, 2025). Zu diesem Zweck erfolgt die Synthese eines Lentivirus Expressionsvektors, der die menschliche cytomegalovirus Promotorregion zur Kontrolle des offenen Leserasters vom jeweiligen menschlichen CYP Enzym enthält, sowie die Synthese der cDNA des entsprechenden CYP Enzyms (Herzog *et al.*, 2016; Steinbrecht *et al.*, 2019; Steinbrecht *et al.*, 2020; Carlsson *et al.*, 2025). Die stabile Transfektion kann schließlich durch verschiedene Methoden wie qRT-PCR oder durch Immunfluoreszenz und Western Blot unter Verwendung eines geeigneten Antikörpers überprüft werden (Herzog *et al.*, 2016; Steinbrecht *et al.*, 2020; Carlsson *et al.*, 2025). In diesen genetisch

veränderten Zelllinien konnte auch Aktivität des Phase-II-Fremdstoffmetabolisierungsenzym Sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) demonstriert werden (Carlsson *et al.*, 2022). Im Hinblick auf Reparatur von Alkylierungsschäden spielen wie bereits beschrieben Expressionslevel und Aktivität von p53 und MGMT eine Rolle (Grombacher *et al.*, 1998). P53 Aktivität und Expression wurde in Studien von Aden und Coautoren demonstriert (Aden *et al.*, 1979). Auch in Studien von Carlsson *et al.* wurde p53 Aktivität in HepG2 Zellen nach Exposition gegenüber dem genotoxischen Agenz Methyleugenol überprüft und bestätigt (Carlsson *et al.*, 2022). Weiterhin wurde die MGMT-Aktivität nach der Induktion von Alkylierungsschäden in HepG2 und in HepG2-CYP2E1 Zellen untersucht (Carlsson *et al.*, 2025). Hierbei ließ sich ein zeitabhängiger Anstieg der MGMT-Konzentration mittels Western Blot ermitteln, sowie eine starke Reduktion nach Inhibierung unter Verwendung von O^6-BG (Carlsson *et al.*, 2025). Für eine wie in Studien von Grombacher *et al.* mit Maus Fibroblastenzellen demonstrierte Assoziation der gesteigerten, p53 abhängigen MGMT-Expression nach Exposition gegenüber Doppelstrangbruchinduzierender IR-Strahlung besitzen beide Zelllinien folglich entsprechende Vorraussetzungen (Grombacher *et al.*, 1998). Damit wäre eine p53 vermittelte MGMT-Expressionsinduktion nach Exposition gegenüber alkylierenden Agenzien, welche ebenfalls zu DNA-Doppelstrangbrüchen führen können, denkbar (Grombacher *et al.*, 1998). Aufgrund der MGMT vermittelten Schadensreversion von O^6-MeG und O^6-pobG DNA-Addukten, welche durch alkylierende Agenzien wie NDMA und TMZ entstehen können, besitzen diese Zelllinien damit geeignete Vorraussetzungen zur Reparatur (Fahrer *et al.*, 2023). In Studien von Steinbrecht und Coautoren trat in HepG2, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP3A4 Zellen eine konzentrationsabhängige Zunahme des DNA-Doppelstrangbruchmarkers γH2AX nach Behandlung mit CPA auf, welches die DNA quervernetzen kann (Steinbrecht *et al.*, 2019). Der Anstieg von γH2AX resultiert aus Aktivierung durch an der HR und NHEJ involvierter Proteine infolge der durch CPA nach DNA-Quervernetzung hervorgerufenen DNA-Doppelstrangbrüche (Steinbrecht *et al.*, 2019). TCR-NER Aktivität konnte in Studien von Wu und Coautoren nach Behandlung von HepG2 Zellen mit dem Mykotoxin Aflatoxin demonstriert werden (Wu *et al.*, 2024). Dies zeigt, dass HepG2 Zellenüber geeignete Vorraussetzungen zur Reparatur von sperrigen Addukten, die beispielsweise durch tabakspezifische *N*-Nitrosamine wie NNN und NNK gebildet werden, verfügen (Fahrer *et al.*, 2023). Darüberhinaus konnte die Aktivität der

BER in HepG2 Zellen durch Pang und Coautoren nachgewiesen werden (Pang *et al.*, 2012). In diesem Zusammenhang wurden durch 30 mM Glucose ROS induziert, was einen signifikanten Anstieg der mRNA Expressionslevel der BER Proteine ogg1, polβ, lig3 zur Folge hatte (Pang *et al.*, 2012).

2. Zielsetzung

Die Exposition gegenüber *N*-Nitrosaminen erfolgt durch das Vorkommen in Lebensmitteln, Trinkwasser, Tabakrauch und Kosmetikprodukten (Fahrer *et al.*, 2023). Auch Arzneimittel können mit *N*-Nitrosaminen kontaminiert sein (Fahrer *et al.*, 2023; Tuesuwan *et al.*, 2021). Darüberhinaus werden diese Substanzen endogen gebildet (Fahrer *et al.*, 2013). Nach CYP450-vermittelter metabolischer Aktivierung können reaktive Carbeniumionen entstehen, die in der Folge DNA Alkylierungsschäden induzieren und die DNA-Schadensantwort auslösen (Cross *et al.*, 2021; Beard *et al.*, 2021; Carlsson *et al.*, 2025). Die Zelle reagiert auf diese genotoxischen und kanzerogenen Verbindungen in Abhängigkeit der Art des gebildeten Adduktes mit verschiedenen DNA Reparaturwegen unter Beteiligung einer Vielzahl von Enzymen und Proteinen (Fahrer *et al.*, 2023). Der Fokus dieser Arbeit liegt in der Untersuchung von zehn *N*-Nitrosaminen mit unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften. So sollen einerseits Verbindungen untersucht werden, zu denen bisher wenig im Hinblick auf genotoxische und mutagene Eigenschaften bekannt ist. Hierzu sind neben NMIPA die NDSRIs NFluo, NFA und NND zu nennen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Vogel *et al.*, 2025). Andererseits befasst sich diese Arbeit mit einer näheren Charakterisierung der *N*-Nitrosamine NDMA, NDELA, S-NNN sowie NMA, Sie zählen zu den Verbindungen, für die Daten zum Vorkommen und toxikologischen Eigenschaften wie Mutagenität und Karzinogenität in der Literatur verfügbar sind (Thomas *et al.,* 2024; Lijinsky *et al.*, 1984; Haas *et al.*, 1973; Knasmüller *et al.*, 1986; Liu *et al.*, 2008; Preussmann *et al.*, 1982; Hecht *et al.*, 1989; Guttenplan *et al.*, 2019; Padma *et al.*, 1989; Hecht *et al.*, 1980; Hoffmann *et al.*, 1981; Balbo *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2011; Hecht *et al.*, 1998; IARC, 1978; Asthana *et al.*, 2018; Magee & Barnes, 1956; Gold & Salmasi,1982; Zielenska *et al.*, 1988; Druckrey *et al.*, 1967; Schmähl *et al.*, 1976). Ebenso sind für die beiden Verbindungen NPro und NMtBu Daten verfügbar, die daraufhin hindeuten, dass diese Substanzen weder mutagene noch kanzerogene Effekte induzieren (Garcia *et al.*, 1973; Kuroki *et al.*, 1977, Gold *et al.*, 1981 Nixon *et al.*, 1976). Hauptziel dieser Arbeit besteht in der Etablierung einer *in vitro* Variante des alkalischen Comet Assays in verschiedenen Leberzellmodellen als alternative Methode zum Ames Test im Rahmen der Risikobewertung von *N*-Nitrosaminen. Aufgrund des abweichenden Enpunktes führt dies idealerweise zur Erhöhung der Sensitivität der im regulatorischen Kontext derzeitig angewendeten Test-strategie. Da zytotoxische und genotoxische Effekte

von *N*-Nitrosaminen die CYP450-Enzym-vermittelte metabolische Aktivierung vorraussetzen, soll in einem ersten Schritt die Testung der metabolischen Kompetenz mittels etablierter, humaner CYP450-Substrate durchgeführt werden. Zudem ist vorgesehen, die Zytotoxizität mittels Zellviabilitätest zu messen. In diesem Zusammenhang soll durch Ermittlung der EC_{50}-Werte geprüft werden, ob und bei welchen Konzentrationen die Testsubstanzen zur Abnahme der Zellviabilität um mindestens 50 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen führen. Genotoxische Effekte sollen durch Messung des DNA-strangbruchinduzierenden Potentials mittels Comet Assay evaluiert werden. Zur Positivtestung ist das Erfüllen des biologisch relevanten Effektes, der in diesem Zusammenhang einer mindestens 2-fachen Steigerung der medianbasierten Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle entspricht, notwendiges Kriterium. Für die Ermittlung der Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit des alkalischen Comet Assays in PRH zur Detektion genotoxischer Effekte sollen die erhaltenen Genotoxizitätsdaten einem Benchmark Dose (BMD) Modelling unterzogen werden. Die Untersuchung der zeitabhängigen DNA-Reparatur nach Behandlung mit NDMA sowie nach Behandlung mit den NDSRIs N-Fluo, NBH und NNT soll mittels alkalischem Comet Assay erfolgen. Durch Verwendung des MGMT-Inhibitors O^6-Benzylguanin (O^6-BG) wird die Beteiligung der MGMT an der Schadensreversion induzierter DNA-Strangbrüche ermittelt. Am Beispiel von NDMA soll in diesem Zusammenhang auch die zeitabhängige Bildung von O^6-MeG und N7-MeG und der Einfluss der MGMT an den DNA-Adduktleveln in PRH untersucht werden. NDMA, NDELA und S-NNN werden im Wildtyp sowie in genetisch modifizierten HepG2 Zelllinien HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 untersucht. Auch für diese ist im ersten Schritt die Evaluierung der metabolischen Kompetenz mithilfe humaner CYP-Substrate geplant. Die Messung zytotoxischer Eigenschaften wird mittels Zellviabilitätstest erfolgen. Zur Untersuchung der DNA-Schadensantwort werden die Proteinkonzentrationen von p53 und γH2AX nach Behandlung mittels Western Blot semiquantitativ bestimmt. Für die Ermittlung des strangbruchinduzierenden Potentials ist der alkalische Comet Assay vorgesehen. Aufgrund der bedeutenden Rolle von CYP2E1 an der metabolischen Aktivierung von NDMA, NDELA und NMA sollten weitere Untersuchungen in HepG2 und HepG2-CYP2E1 Zellen in einem vergleichenden Ansatz erfolgen. Für NDELA ist die Bestimmung zytotoxischer Eigenschaften nach Verwendung sehr hoher Konzentrationen geplant.

Mithilfe des alkalischen Comet Assays sind strangbruchinduzierende Eigenschaften von NDMA, NDELA und NMA sowie der Einfluss der MGMT an der Reparatur induzierter DNA-Strangbruchschäden zu evaluieren. Im nächsten Schritt soll eine modifizierte Comet Assay Variante angewendet werden, um DNA quervernetzende Eigenschaften von NMA und NDELA in HepG2-CYP2E1 Zellen zu ermitteln. Schließlich sollen genotoxische Eigenschaften von NDMA in den beiden Zelllinien mithilfe eines weiteren Genotoxizitätstestes untersucht werden, wofür der Mikrokern Test nach OECD TG 487 zur Betrachtung des Endpunktes chromosomaler Schäden in Form von Klastogenität vorgesehen ist.

3. Material und Methoden

3.1 Allgemeine Laborgeräte

Tabelle 3: Allgemeine Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank	CellXpert170i	Eppendorf AG, 22331 Hamburg
Brutschrank	HERAcell240i	Thermofisher Scientific GmbH 58239 Schwerte
Durchlichtmikroskop	DMi1 mit integrierter LEICA MC170 HD Kamera	Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, 3557 Wetzlar
Immunfluoreszenzmikroskop	Axioobserver LCI ausgestattet mit einer Colibri LED und Axiocam 305 mono	Carl Zeiss Jena GmbH, 07745 Jena
Mikroplattenlesegerät	Tecan Spark	Tecan Austria GmbH 5082 Grödig
Sterilbank	MSC Advantage 1.8	Thermo Electron LED GmbH 63505 Langenselbold
Sterilbank	UVF-6.12S	BDK Luft-, und Reinraumtechnik, 72820 Sonnenbühl Genkingen
Sterilbank		STEAG Laminarflow-Prozesstechnik GmbH Industriepark Sandwiesen 7417 Pfullingen
Tiefkühlschrank	TSX60086V	Thermofisher Scientific GmbH, 58239 Schwerte
Wasserbad	GFL 1083	Lauda Scientific GmbH, 97922 Lauda-Königshofen
Wasserbad	Thermostat T MA 6	Lauda Scientific GmbH, 97922 Lauda-Königshofen
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Heraeus, 63450 Hanau
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, 63450 Hanau

3.2 Testsubstanzen

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Substanzen in DMSO gelöst. Löslichkeit und pH-Wert Eigenschaften beeinflussten hierbei die höchste Konzentration. Die Stammlösungen für jede vorgesehene Endkonzentration wurde so gewählt, dass nach 1:200 Verdünnung im Medium jeweils eine Endkonzentration von DMSO im Medium erzielt wurde. Für die Negativkontrolle erfolgte bei Koinkubationen eine Anpassung des

prozentualen Anteils DMSO, um lösungsmittelbedingte Effekte auszuschließen. Die nachfolgende Tabelle zeigt die verwendeten Testsubstanzen und deren Herkunft.

Tabelle 4: Verwendete Testsubstanzen

Testsubstanz	Abkürzung	Lösungsmittel	Herkunft
Blasticidin	Blast	ddH_20	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
Cyclophosphamid	CPA	DMSO	ThermoScientific, 58239 Schwerte
Cytochalasin B	CytoB	DMSO	Hycultec GmbH, 94501, Beutelsbach
Etoposid	Eto	DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 82024 Taufkirchen
Fluoxetin	Fluo	DMSO	Enamine ltd 02660 Kiew
Methylmethansulfonat	MMS	DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 82024 Taufkirchen
Mitomycin C	MMC	ddH_2O	Sigma Aldrich, 63118 St. Louis
N-Methyl-*N*-Nitroso-isopropylamin	NMIPA	DMSO	Enamine ltd 02660 Kiew
N-Methyl-*N*-Nitroso-tert-butylamin	NMtBu	DMSO	Enamine ltd 02660 Kiew
N-Nitrosobetahistin	NBH	DMSO	Enamine ltd 02660 Kiew
N-Nitrosodesloratadin	NND	DMSO	Enamine ltd 02660 Kiew
N-Nitrosodiethanolamin	NDELA	DMSO	Enamine ltd 02660 Kiew
N-Nitrosodimethylamin	NDMA	DMSO	Enamine ltd 02660 Kiew
N-Nitrosofolsäure	NFA	DMEM LG	Enamine ltd 02660 Kiew
N-Nitrosofluoxetin	NFluo	DMSO	Enamine ltd 02660 Kiew
N-Nitrosomethylanilin	NMA	DMSO	Enamine ltd 02660 Kiew
N'-Nitrosonornikotin	NNN	DMSO	Alfa Chemistry, 11741 NY
N-Nitrosonortryptilin	NNT	DMSO	Enamine ltd 02660 Kiew
N-Nitrosoprolin	NPro	DMSO	Enamine ltd 02660 Kiew
O^6-Benzylguanin	O^6-BG	ddH_2O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 82024 Taufkirchen

Saponin 0.1 %	Sap 0.1 %	ddH_20	SERVA Electrophoresis GmbH, 69115 Heidelberg
(*S*-)*N*'-Nitrosonornikotin	S-NNN	DMSO	Alfa Chemistry, 11741 NY
Temozolomid	TMZ	DMSO	Prof. Dr. Bernd Kaina, Institut für Toxikologie, 55131 Mainz
Tert-Butylhydroperoxid 10 %	TBOOH 10 %	ddH2O	Altmann Analytik GmbH & Co.KG 81379 München
Wasserstoffperoxid 30 %	H_2O_2 30 %	PBS	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe

3.3 Primäre Rattenhepatozyten

3.3.1 *In-situ* Perfusion

Zur Isolierung von PRH wurden männliche Wistar Ratten von Janvier Labs S.A.S verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Tiere, die zur Perfusion eingesetzt wurden, ein durchschnittliches Alter von 6 Wochen mit einem damit einhergehenden Gewicht von etwa 200 g aufwiesen. Die Haltung der Tiere erfolgte für ein bis drei Wochen im Tierhaus der Rheinland-Pfälzischen Technischen Universität Kaiserslautern-Landau (RPTU) unter standardisierten Bedingungen und wurde von den Tierpflegern des Tierhauses durchgeführt. Frau Melanie Abel-Beckmann führte die Perfusionen gemäß eines modifizierten Protokolls nach Carlsson und Fahrer, 2023 durch (Carlsson, Fahrer, 2023). Nach Isolierung der Leber durch Frau Abel-Beckmann erfolgte die Vereinzelung der Hepatozyten und alle sich anschließenden Tätigkeiten für die Aufarbeitung der Zellen. Das Tier wurde mit 400 µL/100 g Körpergewicht Pentobarbital mittels intraperitonealer Applikation betäubt. Nach Ausbleiben jeglicher Reaktion mittels Prüfung des Bauchdecken-Schwanz Reflexes wurde das Abdomen des Tieres mit 70 % Ethanol desinfiziert und geöffnet. Zur Vermeidung einer Blutgerinnung wurde in die untere Hohlvene (*vena cava inferior*) das Antikoagulanz Heparin injiziert. Nach Legung entsprechender Ligaturen erfolgte das Einstechen mittels Braunüle in die Pfortader (*vena porta hepatica*). Nach Durchtrennung der Hohlvene wurde die Flussrate erhöht. Das im Puffer enthaltene EGTA führte zur Lösung der Desmosomen der Hepatozyten durch den Entzug von Ca^{2+}. Der Verdau des Bindegewebes wurde durch Collagenase, welche für

den darauffolgenden Perfusionsschritt verwendet wurde, erzielt. Nach dem Herauspräperieren der Leber wurde die Leberkapsel mittels Pinzette in einem Nylonnetz geöffnet. Anschließend wurden die Hepatozyten durch Verwendung von Waschpuffer herausgeschwemmt und durch mehrmaliges Zentrifugieren filtriert. Für eine möglichst hohe Ausbeute reiner Hepatoyzten wurde beim letzten Zentrifugationsschritt zusätzlich Percoll verwendet.

Tabelle 5 : Reagenzien für die in situ Perfusion

Reagenz	Zusammensetzung	Menge [g/ml]	Herkunft
Kollagenlösung 0.05 mg/mL	Collagen I Rat Tail 3 mg/mL	0.167 mL	Thermo Fisher Scientific, 64289 Darmstadt
	Essigsäure 0.1 M	9.983 mL	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
Pentobarbitallösung	ddH_2O	5 mL	
	EtOH	1 mL	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
	Natrium Pentobarbital	0.5 g	Chemische Fabrik Berg GmbH 06749 Bitterfeld-Wolfen
	Propylenglycol	4 mL	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
Percolllösung	Percoll	27.8 mL	Cytiva Sweden AB 75184 Uppsala
	Perfusionspuffer 10x	4.2 mL	
Perfusionsmedium I	2-(4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazinyl-)ethansulfonsäure (HEPES) 1 M	5 mL	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
	Ethylenglykol-bis (amino-ethyl-ether)-*N,N,N‘,N‘*-tetraessigsäure (EGTA) 0.1 M	0.5 mL	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
	Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	500 mL	Sigma-Aldrich GmbH, 89555 Steinheim
Perfusionsmedium II	DMEM LG	500 mL	Thermo Fisher Scientific, 64289 Darmstadt
	HEPES 1 M	5 mL	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
Perfusionspuffer 10x pH 7.4	ddH_2O	1000 mL	
	$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	1.63 g	Sigma-Aldrich GmbH, 89555 Steinheim
	NaCl	81.82 g	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe

	$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$	2.85 g	Merck KGaA, 64271 Darmstadt
	KCl	3.73 g	TH. GEYER GmbH & Co. KG, 71272 Renningen
	KH_2PO_4	0.544 g	AnalytiChem GmbH, 47167 Duisburg
Waschpuffer	Bovines Serum-albumin (BSA) 30%	3.5 mL	Pan-Biotech GmbH 94501 Aidenbach
	DMEM HG	500 mL	Thermo Fisher Scientific, 64289
	Fetales Kälberserum (FKS)	50 mL	Thermo Fisher Scientific, 64289 Darmstadt
	Hepes 1 M	5.2 mL	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
	Pen/Strep (100x)	5.2 mL	Thermo Fisher Scientific, 64289 Darmstadt

Tabelle 6: Materialien für die in situ Perfusion

Material	Hersteller
Braunüle Vasocan 14G	B. Braun SE 34212 Melsungen, Hessen
Braunüle Vasocan 18G	B. Braun SE 34212 Melsungen, Hessen
Einmal Injektionskanülen Sterican 26G 0.45 x 12 mm	B. Braun SE 34212 Melsungen, Hessen
Einmal Injektionsspritzen Omnifix-F 1 mL	B. Braun SE 34212 Melsungen, Hessen
Gewebeband	RPTU Kaiserslautern-Landau
Luftblasenfalle	RPTU Kaiserslautern- Landau
Präparierbesteck	RPTU Kaiserslautern-Landau
Präpariertisch	RPTU Kaiserslautern-Landau

Schlauchpumpe	Ismatec SA, 8152 Zürich
Seidentuch	RPTU Kaiserslautern-Landau
Silikonschläuche	RPTU Kaiserslautern- Landau
Thermostat	Lauda Dr. R.Wobser GmbH & Co KG 97922 Lauda-königshofen

3.3.2 Zellaussaat und Behandlung

Nach Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mittels Trypanblaufärbung und der Neubauer Zählkammer erfolgte das Ausplattieren einer für das jeweilige Experiment benötigten konkreten Zellzahl. Es wurde darauf geachtet, dass die Vitalität für den jeweiligen Assay bei mindestens 95 % lag. Die in 20 mL enthaltene Zellzahl wurde unter Berücksichtigung des Neubauer Zählkammerfaktors errechnet. Anschließend wurde eine definierte Menge der Zellsuspension verwendet und mit dem Kultivierungsmedium, bestehend aus 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 1 % einer Antbiotikamischung bestehend aus 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin (PenStrep) supplementiertem Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) (1g/l Glucose), verdünnt. Die Zellen wurden auf mit Kollagen beschichteten 24 well Platten ausplattiert, wobei die Kollagenbeschichtung das Anwachsen der primären Zellen erleichterte. Nach 3 h Anwachszeit erfolgte die Behandlung der Zellen mit den jeweiligen vorbereiteten Substanzlösungen. In nachfolgender Tabelle sind die für das jeweilige Experiment benötigten Zellzahlen sowie weitere Parameter aufgeführt.

Tabelle 7: Zellkulturschalenformate, Zellzahlen, Volumina Kultivierungsmedium und Inkubationszeiten für Versuche in PRH

Zellkulturschalenformat	Zellzahl	Volumen Kultivierungsmedium [µL]	Inkubationszeit [h]
24 well	200000	200	2
24 well	200000	200	4
24 well	200000	200	24
10.0 cm	7000000	10000	24

3.3.3 Einfrieren und Auftauen

Überschüssige Zellen, die für den jeweiligen Assay am Tag der Perfusion keine Verwendung fanden, wurden bei -80 °C eingefroren. Wurden die Zellen nicht innerhalb weniger Wochen verwendet, wurden diese zu langfristigen Lagerzwecken in den N_2-Tank überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (1400 rpm, 4°C), um Reste des Waschpuffers zu entfernen. Anschließend erfolgte die Aufnahme in Steemcellbanker Einfriermedium von Amsbio, das speziell für den Prozess der Kryokonservierung geeignet war. Hierzu wurden 1 mL zum Einfrieren einer Zahl im Bereich von 4.0 x 10^6 – 10.0 x 10^6 Zellen verwendet. Alternativ wurden Zellen in Inkubationsmedium, welchem 30 % FKS und 10 % DMSO zugefügt wurde, eingefroren. Das Einfrieren erfolgte in dafür vorgesehenen Kryovials. Zum Auftauen wurden die Zellen zunächst 45 - 60 Sekunden im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Nach Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer wurden die Zellen in Inkubationsmedium überführt und zum Entfernen des Einfriermediums zentrifugiert (1400 rpm, RT). Dann erfolgte die Entfernung des Überstandes und die Aufnahme in 1-5 mL Inkubationsmedium, je nach Zelldichte. Das zu entnehmende Volumen der verdünnten Zellsuspension richtete sich nach der für den jeweiligen Versuch benötigten Zellzahl.

3.4 Zellkultur

Die Kultivierung der HepG2 Wildtyp Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO_2 in DMEM HG Medium (4,5 g/l Glucose), das mit 10 % FKS und 1 % Pen/Strepsupplementiert wurde. HepG2-CYP1A2 Zellen wurden ebenfalls in DMEM HG Medium (4,5 g/l Glucose), das mit 10 % FKS und 1 % PenStrep supplementiert wurde, kultiviert. Zusätzlich wurde das Selektionsantibiotikum Zeocin in einer Konzentration von 500 µg/mL verwendet. Dieses wurde aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften nur nach Beginn der Kultivierung sowie dananch in einem Abstand von etwa 10 Wochen verwendet. HepG2-CYP3A4 Zellen wurden in DMEM HG Medium (4,5 g/l Glucose), das mit 10 % FKS und 1 % PenStrep supplementiert wurde unter Zusatz des Selektionsantibiotikums Blasticidin in einer Konzentration von 3 µg/mL kultiviert. Für die Kultivierung der HepG2-CYP2E1 Zellen wurde DMEM GlutaMAX Medium (4,5 g/l Glucose), das mit 10 % FKS und 1 % PenStrep supplementiert wurde, verwendet. Zusätzlich beinhaltete das Kultivierungsmedium das Selektionsantibiotikum Blasticidin in einer Konzentration von 3 µg/mL. Um die Anwendung von Zellen, die in ihrer biologischen Funktionen beeinträchtigt sind,

auszuschließen, erfolgte nach 20 - 24 Passagen das Verwerfen und Neuauftauen der entsprechenden Zelllinie. Zum Einfrieren der Zellen wurde das entsprechende Kultivierungsmedium ohne Zusatz von Antibiotika verwendet, welches zum Zweck der Kryokonservierung mit 10 % DMSO und 30 % FKS supplementiert wurde. Eine langfristige Lagerung kryoknservierte Zellen erfolgte erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -80 °C. Zum Ausschluss einer Kontamination mit Mycoplasmen wurden in regelmäßigen Abständen PCR Tests von Frau Melanie Abel-Beckmann durchgeführt. Zum Passagieren wurden phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Kultivierungsmedium und Trypsin auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt. Nachdem der Zellrasen mit PBS gewaschen wurde, erfolgte eine Inkubation mit Trypsin für 5 - 7 Minuten bei 37 °C im Brutschrank. Anschließend wurde die Reaktion mit Medium gestoppt und die Zellen durch ausreichendes Resuspendieren mithilfe einer 10 mL Glaspipette vereinzelt. Dann erfolgte die Überführung eines Drittels der Zellsuspension und eine Verdünnung von diesem mit Kultivierungsmedium auf 10 mL. Herkunft sowie die für die Kultivierung von HepG2 Zelllinien verwendeten Medien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 8: Reagenzien für die Kultivierung der HepG2 Zellen

Zelllinie	Mediumzusammensetzung	Herkunft
HepG2	DMEM HG, 10 % FKS, 1 % P/S	Leibnitz-Institut DSMZ, Braunschweig
HepG2-CYP1A2	DMEM HG, 10 % FKS, 1 % P/S, 500 µg/mL Zeocin	AG Jan-Heiner Küpper, BTU
HepG2-CYP3A4	DMEM HG, 10 % FKS, 1 % P/S, 3 µg/mL Blasticidin	AG Jan-Heiner Küpper, BTU
HepG2-CYP2E1	DMEM GlutaMAX, 10 % FKS, 1 % P/S, 3 µg/mL Blasticidin	AG Jan-Heiner Küpper, BTU

Für die Durchführung verschiedener Experimente erfolgte nach Erreichen von 70 – 80 % Konfluenz das Absaugen des Mediums, das Waschen der Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung und die Ablösung der Zellen mittels Trypsin. Zum Ausplattieren einer exakten Zellzahl wurden die Zellen unter dem Mikroskop mittels Neubauer Zählkammer

ausgezählt. Nach Zentrifugation wurde der Neubauer Zählkammerfaktor und der Verdünnungsfaktor für die Entnahme eines definierten Volumens der auf 1 mL konzen-zentrierten Zellsuspension berücksichtigt, der jeweils mit dem für den jeweiligen Versuch relevanten Volumen Kultivierungsmedium vereinigt wurde. In der nachfolgenden Tabelle sind die für die jeweiligen Versuche eingesetzen Zellzahlen sowie weitere relevante Parameter aufgeführt.

Tabelle 9: Zellkulturschalenformate, Zellzahlen, Volumina Kultivierungsmedium und Inkubationszeiten für Versuche in HepG2 Zellen

Zellkulturschalenformat	Zellzahl	Volumen Kultivierungsmedium [µL]	Inkubationszeit [h]
96 well	45000	200	24
96 well	15000	200	72, 96
3.5 cm	500000	2000	2 , 2.5
3.5 cm	500000	2000	2.5
3.5 cm	500000	2000	26
3.5 cm	200000	2000	96
10.0 cm	7000000	10000	24

3.5 Untersuchungen der metabolischen Kompetenz mittels LC-MS

Um zu bewerten, ob die verwendeten Leberzellmodelle, darunter PRH und die HepG2 Zelllinien HepG2-WT, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 für die Untersuchung des genotoxischen Potentials der *N*-Nitrosamine anwendbar sind, wurden die Zellen mit etablierten Substraten humaner CYPs inkubiert (Hammer *et al.*, 2021). Als Kontrollen diente mit Substanzen versetztes Inkubationsmedium sowie unbehandelte Zellen. Diese dienten dem Auschluss endogen vorkommender Substrate und Metabolite und der Erfassungaller nicht durch zelluläre Reaktion mit den zugesetzen CYP-Substraten resultierender Metabolite. Für den Vergleich zwischen der metabolischen Kompetenz unterschiedlicher CYP Isoformen und zwischen frischen und aufgetauten Zellen der Spezies Ratte wurde das Stoffwechselverhältnis ermittelt, welches aus dem

Quotient der mittleren Peakfläche des Metaboliten und der mittleren Peakfläche des Metaboliten + des Substrates berechnet wurde (s. Abb. 29). Zur Sicherstellung einer quantitativen Umsetzung wurden für die Inkubationen hohe Konzentrationen der Substrate verwendet. Dabei wurde der Zellüberstand berücksichtigt, da ein Großteil der nach enzymatischer Katalyse entstandenen Metaboliten aus den Zellen transportiert wird. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Substrate und der Metabolite des Überstandes mittels LC-MS. Die berechneten Stoffwechselverhältnisse einzelne CYP Enzyme sind aufgrund unterschiedlicher intrinsischer Eigenschaften wie Michaelis-Menten-Konstante (K_m) und katalytische Aktivität (K_{cat}) nicht miteinander vergleichbar. Die Messung diente lediglich dem Nachweis des Vorhandenseins von Stoffwechselaktivität für die Gewährleistung ausreichender Bioaktivierung der verwendeten *N*-Nitrosamine.

$$\text{Stoffwechselverhältnis [\%]} = \frac{\mu\, Peakflächenintensität\ Metabolit}{\mu\, Peakflächenintensität\ Metabolit + \mu\, Peakflächenintensität\ Substrat} * 100$$

Abbildung 29: Formel zur Berechnung des Stoffwechslverhältnisses in %. Modifiziert nach Djuari & Londenberg *et al.*, 2023.

Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand jeweils in Eppendorfgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Transport nach Bonn bei -80 °C gelagert. Nach Auftauen des Überstandes und Zugabe interner Standards erfolgte die Messung der Proben mittels LC-MS, wobei Substrate und Metabolite auf semiquantitative Weise im Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) von Dr. Matthias Vogel bestimmt wurden. Vor jeder Behandlung wurden die Substratlösungen frisch angesetzt. Hierfür erfolgte je nach Konzentration der Stammlösung eine 1:2 oder 1:20 Verdünnung mit ddH_2O. Nach Zugabe eines definierten Volumens der angesetzten Substratlösungen wurden die jeweiligen Endkonzentrationen erreicht, die für die verschiedenen CYP Substrate unterschiedlich waren und zwischen 50 µM und 500 µM lagen. Nach der vorgesehenen Anwachszeit wurde das Mediums abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Dann wurden die vorbereiteten Substratlösungen pipettiert. Nach 4 h erfolgten Ernte und Aufarbeitung wie beschrieben. Die Zusammensetzung der verwendendeten Substratlösungen zur Testung der relativen CYP Enzymaktivitäten in PRH sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt (s. Tab. 10).

Tabelle 10: Zusammensetzung der Substratlösungen zur Testung der metabolischen Kompetenz in PRH

Enzym	Substrat	Stammlösung [mg/mL]	Endkonzentration [µM]
CYP3A4	Midazolam	2	50
CYP2E1	Chlorzoxazon	1	50
CYP2D6	Dextromethorphan	10	500
CYP2C9	Tolbutamid	10	500
CYP1A2	Phenacetin	1	50
CYP2C19	Mephenytoin	1	50
CYP2B6	Bupropion	1	100
CYP2A6	Nikotin	1	100

Zur Testung der relativen Proteinaktivitäten von CYP1A2, CYP2D6 und CYP2E1 in HepG2 Zellen wurden die Substratlösungen der entsprechenden CYP Enzyme verwendet. Die zugehörige Zusammensetzung ist in nachfolgender Tabelle dargestellt (s. Tab. 11):

Tabelle 11: Zusammensetzung der Substratlösungen zur Testung der metabolischen Kompetenz in den HepG2 Zelllinien HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1

Enzym	Substrat	Stammlösung [mg/mL]	Endkonzentration [µM]
CYP1A2	Phenacetin	1	50
CYP2E1	Chlorzoxazon	1	50
CYP2D6	Dextromethorphan	10	500

3.6 Resazurin-Reduktions-Assay

Mithilfe des Resazurin-Reduktions-Assays sind zytotoxische Effekte und Zellproliferation von Zelllinien und primären Zellen messbar (Longhin *et al.*, 2022). Das hierbei eingesetzte, membrangängige Resazurin Reagenz ist nicht toxisch, weshalb die Zellen für weitere Assays einsetzbar sind (O'Brien *et al.*, 2000). Die zugrunde liegende Reaktion ist in Abbildung 30 dargestellt. Das Testprinzip dieser Methode beruht auf der Umsetzung der nicht fluoreszierenden, blauen Ausgangsverbindung Resazurin [1], die ein Anregungsmaxima bei 545/15 nm aufweist, zur pinkfarbenen, fluoreszierenden Resorufin Verbindung mit dem Emissionsmaximum von 580/10 nm unter Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) Verbrauch [2]. Hierbei entsteht die oxidierte Form des Coenzyms NAD^+ (vgl. Abb. 30). Die Aktivität reduzierender Enzyme ist Vorraussetzung für die katalysierte Reaktion, ebenso das Vorhandensein verschiedener Cofaktoren wie Flavinadenindinukleotid (FADH), Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), NADH und Flavinmononukleotid (FMNH) (vgl. Abb. 30; Khatua *et al.*, 2022).

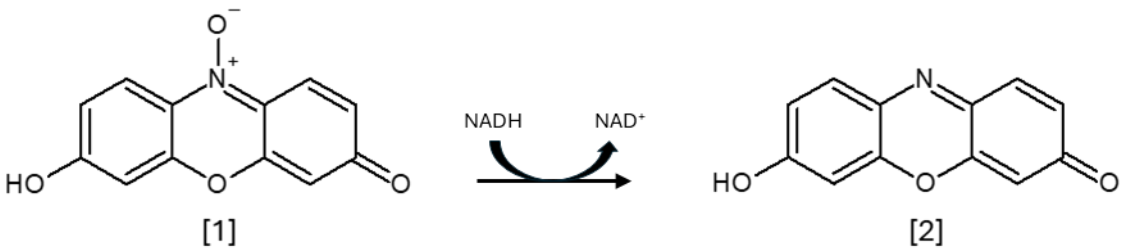

Abbildung 30: Reduktion von Resazurin zu Resorufin unter Verbrauch von NADH. *Modifiziert nach O'Brien et al., 2000. Dargestellt mit ChemSketch.*

Die Durchführung erfolgte wie in der Literatur beschrieben (Carlsson *et al.*, 2022). Zur Bestimmung zytotoxischer Effekte wurden Zellen nach der vorgesehenen Inkubationszeit mit PBS gewaschen und mit Resazurinarbeitslösung und zusatzfreiem DMEM (1:10) für 90 Minuten unter Kultivierungsbedingungen (HepG2 Zelllinien: 37 °C, 21 % O_2, 5 % CO_2,PRH: 37 °C, 7 % O_2, 5 % CO_2) inkubiert. Dann erfolgte die Messung der Fluoreszenz (Ex 544 nm/Em 590 nm). In Tabelle 12 ist die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen aufgeführt.

Tabelle 12: Reagenzien und Geräte für den Zellviabilitätstest

Reagenz	Zusammensetzung	Menge [g, mL]	Herkunft
NaCl/Pi-Puffer 158.8 mM	ddH_2O	ad 1000 mL	
	KH_2PO_4 1.1 mM	0.144 g	AnalytiChem GmbH, 47167 Duisburg
	NaCl 154 mM	9 g	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
	$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ 3.7 mM	0.595 g	Merck KGaA, 64271 Darmstadt
Resazurin Arbeitslösung 0.044 mM	Resazurin-NaCl-Pi-Lösung	1 mL	
	DMEM serumfrei	9 mL	
Resazurin-NaCl-Pi-Lösung 0.44 mM	Resazurin-Stammlösung	0.1 mL	
	NaCl/Pi-Puffer	ad 100 mL	

Resazurin-Stammlösung 440 mM	Dimethylformamid	0.1 mL	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185
	Resazurin	0.011 g	Sigma-Aldrich GmbH 89555 Steinheim

3.7 Western Blot

Effekte auf p53 und γH2AX wurde mittels Western Blot untersucht, um eine mögliche Aktivierung der DNA-Schadensantwort nachzuweisen. Phosphorylierung von H2AX an Ser139 durch Replikationsstress, der entweder durch Einzel-, meist aber durch Doppelstrangbrüche induziert wird, führt zur Entstehung von γH2AX (Katsube *et al.*, 2014; Scully *et al.*, 2013). γH2AX ist ein bekannter Doppelstrangbruchmarker und wird zur Detektion von beispielsweise durch Fremdstoffe hervorgerufene genotoxischen Schäden genutzt (Kuo *et al.*, 2008; Khoury *et al.*, 2013). Das Tumorsuppressorprotein p53 wird innerhalb der DNA-Schadensantwort aktiviert und ist an der DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest und Apoptose beteiligt (Smith *et al.*, 2020). Es handelt sich um eine protein-biochemische Methode, in welcher der Nachweis eines bestimmten Proteins über eine Antikörper vermittelte Reaktion und anschließender Sichtbarmachung durch beispielsweise Chemilumineszenz semi-quantitativ erfolgt (Gavini *et al.*, 2023). Die Proteinmenge ist hierbei proportional zur Lichtemission. Die zu untersuchenden Proteine werden im ersten Schritt auf ein Housekeeping Protein und im zweiten Schritt auf die Negativkontrolle normalisiert (Gavini *et al.*, 2023; Bhakta *et al.*, 2017). Eine Vorraussetzung für Housekeeping Proteine ist das ubiquitinäre Vorkommen in konstanten Mengen in der Zelle, sodass eine Normalisierung anderer Proteine, welche sowohl biologischen Schwankungen als auch durch Chemikalien induzierten Schwankungen ausgesetzt sind, ermöglicht wird (Gavini *et al.*, 2023, Almohaimeed *et al.*, 2021). Eine Meerrettichperoxidase (eng. = horseraddish peroxidase, HRP), die zugeführtes H_2O_2 reduziert, kann zur Detektion mithilfe einer auf Chemilumineszenz basierenden Reaktion verwendet werden (Gavini *et al.*, 2023). Im zweiten Schritt wird das Substrat Luminol durch H_2O_2 zu 3-Aminophtalat oxidiert (Allen, 2022; White *et al.*, 1970). Beim Übergang des angeregten Zustandes in den energieärmeren Zustand dieses Moleküles wird ein Photon bei λ =424 nm emittiert (White et al., 1970).

3.7.1 Zellernte

Für die Zellernte mit sich anschließender Analyse via Western Blot wurden blaue Lysate der Zellen generiert. Dies erfolgte wie bereits veröffentlicht (Fahrer *et al.* 2014). Nach der vorgesehenen Inkubationszeit wurde hierfür das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Entfernung des PBS wurden die Zellen mit 150 µL heißem 1 x Laemmli-Puffer, der auf 95 °C erhitzt wurde, geerntet. Die Zellen wurden mithilfe einer gelben Pipettenspitze in ein Eppendorfgefäß überführt, für 5 Minuten bei 95 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert, kurz zentrifugiert und bis zur Analyse bei -20 °C zwischengelagert.

3.7.2 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach molekularer Masse (Gavini *et al.*, 2023). Dies wird durch die Verwendung des anionischen Tensids Sodiumdodecylsulfat (SDS) erreicht, dass die Eigenladungen der Proteine maskiert und damit zu einem linearen Verhältnis von molekularer Masse und negativer Gesamtladung führt (Gavini *et al.*, 2023). Die im Vergleich zu anderen gelelektrophoretischen Methoden oftmals hohe Qualität der Trennung wird durch Verwendung eines diskontinuierlichen Gelsystems erzielt, das einserseits durch unterschiedliche Porengröße, andererseits durch einen pH-Wert Gradienten charakterisiert ist (Gavini et *al.*, 2023; Smith *et al.*, 1994). Mit ansteigendem Acrylamidgehalt nimmt der Vernetzungsgrad zu, wodurch kleine Poren erzeugt werden (Gavini *et al.*, 2023). Dementsprechend eignen sich zur Trennung kleiner Proteine Gele mit hohem Acrylamidgehalt (Gavini *et al.*, 2023; Hjerten *et al.*, 1963). Zu Beginn werden die Proteine bei neutralem pH-Wert von 6.8 im Sammelgel mit vergleichsweise großen Poren aufkonzentriert (Gavini *et al.*, 2023). Nach Anlegen einer Spannung, die nach kurzer Zeit zum Übertritt der Proteine in das Trenngel führt, erhalten die Proteine ihrer molekularen Masse entsprechend eine negative Ladung (Gavini *et al.*; Green *et al.*, 2020). Dies wird durch den Anstieg des pH-Wertes, der im Trenngel bei 8.8 liegt, erzielt (Gavini *et al.*, 2023; Green *et al.*, 2020). Das im Puffer enthaltene Glycin liegt bei saurem pH-Wert als Zwitterion vor (Maizel *et al.*, 2000). Nach Anlegen einer Spannung wandert das Glycinion rasch in das Sammelgel, wo es durch den sauren pH-Wert in die zwitterionische Form überführt wird (Gavini *et al.*, 2023). Dies beeinträchtigt die elektrophoretische Mobilität im Gel sehr stark (Maizel *et al.*, 2000). Das

im Puffer enthaltene Chloridion hingegen wandert rasch zur Anode (Gavini *et al.,* 2023). Das gleichzeitige Erreichen des Sammelgels aller Proteine wird durch den durch Glycinionen und Chloridionen erzeugten Gradienten sichergestellt (Kurien *et al.*, 2019). Sobald zwitterionische Glycidionen das Trenngel erreichen, erhalten diese eine negative Ladung und wandern als Glycinationen mit hoher elektrophoretischer Mobilität nahe hinter den Proteinen (Gavini *et al.*, 2023). Durch die gleichmäßige Spannung wandern die Proteine langsamer, wodurch die Selektivität der Trennung erhöht wird (Gavini *et al.*, 2023; Green *et al*., 2020). Das Trenngel ist durch kleine Poren charakterisiert, was kleine Moleküle durch den Siebeffekt schneller zur Anode wandern lässt (Gavini *et al.*, 2023). Zur Analyse von γH2AX und p53 wurde ein 5 % Sammelgel und ein 15 % Trenngel verwendet. Nachdem die zusammengebaute Apparatur zum Gießen der Elektrophoresegele mit ddH_2O auf Dichtigkeit geprüft wurde, erfolgte im ersten Schritt das Gießen des Trenngeles zwischen zwei Glasplatten, die mit 1.5 mm Spacer versehen waren. Dieses wurde im Anschluss mit Isopropanol 100 % überschichtet, welches zur Gelglättung und zur Verhinderung von Luftoxidation eingesetzt wurde. Nach Aushärtung des Geles wurde das Isopropanol verworfen und das Sammelgel gegossen, in welches am Ende der Gelkamm zur Erzeugung der Probentaschen gesteckt wurde. Nach Aushärtung von diesem wurden die Gele entweder direkt zur Beladung verwendet oder über Nacht bei 4 °C in mit ddH_2O befeuchteten Tüchern gelagert, um eine Austrocknung vorzubeugen. Für die Mengen eingesetzter Chemikalien sind s. Tabelle 13aufgeführt.

Tabelle 13: Zusammensetzung Sammelgel und Trenngel für die SDS-PAGE

Chemikalie	Sammelgel 5 % [mL]	Trenngel 15 % [mL]
APS (100 mg/mL)	0.06 mL	0.09 mL
ddH_2O	3.81 mL	6.39 mL
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 37, 5:1)	0.75 mL	6.75 mL
SDS (10 %)	0.12 mL	0.18 mL
TEMED	0.006 mL	0.009 mL
TRIS 0.625 M, pH 6.8	1.2 mL	-
TRIS 1 M, pH 8.8	-	4.5 mL

Die generierten Lysate wurden für 5 Minuten auf 95 °C im Thermoschüttler vorgeheizt. In dieser Zeit wurden die Gele in die Elektrophoresekammern eingespannt und in die Wet Blot Kammer gestellt. Um ein Auslaufen verwendeter Puffer während der gelelektrophoretischen Trennung zu verhindern wurden die Kammern mithilfe von 1 x SDS Puffern auf Dichtigkeit geprüft. Anschließend erfolgte eine kurze Zentrifugation, bevor je 35 - 40 µL der Proben in die vorgesehenen Geltaschen pipettiert wurden. In die vorletzte Tasche wurden 5 µL des Proteinmarkers pipettiert, welcher Auschluss über die Position molekularer Massen der im Gel erhaltenen Proteine erlaubte. Die letzte Tasche wurde mit 35 - 40 µL 1 x Laemmli Puffer beladen, um durch gleichmäßige Ladungsverteilung eine möglichst gerade Lauffront zu generieren. Die Trennung zweier Gele erfolgte bei 50 mA-75 mA bis das Trenngel erreicht wurde. Dann wurde die Spannung auf 100 mA erhöht und die SDS-PAGE unter Beobachtung solange durchgeführt, bis die Lauffront die Proteinbande das Ende der Glasplatte erreicht hat oder alternativ die Bande des Markers bei 10 kDa sichtbar wurde.

3.7.3 Western Blot und Immundetektion

Nach gelelektrophoretischer Trennung wurde das Gel aus der Apparatur entnommen und auf einer Nitrocellulosemembran platziert, welche innerhalb einer Sandwichapparatur, bestehend aus zwei Filterpapieren und zwei Schwämmen pro eingesetztes Gel, in Richtung der Anode orientiert war. Zur Sicherstellung der Proteinbindung an die Membran wurde diese zuvor mit 1 x Blot Puffer äquilibriert. Das darin enthaltene Methanol verbessert den Übergang der Proteine aus dem Gel. Nach Befüllung der Wet Blot Kammer mit 1 x Blotting Puffer erfolgte der Proteintransfer bei 400 mA für 2 h, wobei Kühlung durch die Verwendung von Kühlakkus und Eis sichergestellt wurde (Fahrer *et al.*, 2013). Eine Überprüfung des Proteintransfers erfolgte mit dem sauren Farbstoff Ponceau-S, welcher reversibel an positiv geladene Aminosäuren der Proteine bindet und diese damit sichtbar macht. Der Farbstoff ist leicht auswaschbar und wurde vor der weiteren Inkubation mit Blockierlösung bestehend aus 5 % Milchprotein in TBS-T, mithilfe von ddH_2O entfernt. Die Membran wurde in Abhängigkeit der molekularen Massen der zu analysierenden Proteine in drei Teile geschnitten, wobei der Proteinmarker, welcher aus Proteinen mit Molekülmassen im Bereich von 0 - 180 kDa aufgebaut ist, zur Orientierung verwendet wurde. Durch das Blockierungsreagenz wird die Sensitivität der Bindung des Primärantikörpers an die zu analysierenden Proteine erhöht, indem freie Bindungsstellen

besetzt werden. Nach 1 h Inkubation auf dem Rollinikubator bei Raumtemperatur wurde die Membran 3 x 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und bei 4 °C über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert. Die ständige Zirkulation des Puffers wurde dabei mithilfe eines Überkopfschüttlers erzielt. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut dreimal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und mittels HRP konjugiertem Sekundärantikörper auf dem Rollinkubator bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte die Vorbereitung des ECL Reagenz, welches sich je zur Hälfte aus Western Lightning Enhanced Luminol Reagent Plus oder ECL Puffer A und Western Lightning Oxidizing Reagent Plus oder ECL Puffer B im Verhältnis 1:1 zusammensetzte. Bei geringeren Signalstärken wurde das kommerziell hergestellte ECL Reagenz von Perkin Elmer verwendet, während sich die selbst angesetzten Pufferlösungen für Proteine mit hoher zu erwartender Signalstärke eigneten. Je nach Größe des Membranabschnittes wurden 150 – 200 µL des jeweiligen Reagenz auf die Membran pipettiert. Dann erfolgte die Detektion mit dem Chemilumineszenzimager Azure C300.

Tabelle 14: Geräte und Materialien für den Western Blot

Material	Herkunft	Bezeichnung
Chemilumineszenz-Imager	Azure Biosystems inc. 94568 Kalifornien	c300
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, 80939 München	Mini-PROTEAN Tetra Cell
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare Sciences 80807 München	
Spannungsquelle	Bio-Rad Laboratories GmbH, 80939 München	PowerPac Basic
Wet Blot System	Bio-Rad Laboratories GmbH, 80939 München	Mini Trans-Blot Cell
Whatmann 3MM Filterpapier	GE Healthcare Sciences 80807 München	

Tabelle 15: Reagenzien für den Western Blot

Reagenz	Zusammensetzung	Menge [g,mL]	Herkunft
1 x TBS-T	ddH_2O	ad 2000 mL	
	TBS-T 10 x pH 8	200 mL	
	Tween 20	1 mL	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
10 x TBS-T	ddH_2O	5000 mL	
	NaCl	60.5 g	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
	TRIS	438.5 g	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
Ammoniumperoxo-disulfatlösung	Ammoniumperoxidisulfat	0.1 g	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
Blockierlösung	Magermilchpulver	5 g	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
	1 x TBS-T	100 mL	
ECL Puffer A	ddH_2O	4.4 mL	
	Luminol 0.25 M	0.05 mL	Sigma-Aldrich, 89555 Steinheim
	p-Cumarsäure 0.09 M	0.022 mL	Sigma-Aldrich, 89555 Steinheim
	TRIS-HCl 1 M pH 9	0.5 mL	Carl Roth GmbH & Co. Kg 76185 Karlsruhe
ECL Puffer B	ddH_20	4.5 mL	
	TRIS-HCL 1 M pH 9	0.5 mL	

ECL Reagenz	Western Lightning Enhanced Luminol Reagent Plus, ECL Puffer A	1 mL	Perkin Elmer, Waltham
	Western Lightning Oxidizing Reagent Plus, ECL Puffer B	1 mL	Perkin Elmer, Waltham
Essigsäure 100 %			Carl Roth GmbH & Co. Kg 76185 Karlsruhe
Lauf-/Blotting-Puffer 1 x	1 x TBS-T	100 mL	
	ddH_2O	ad 2000 mL	
	Methanol	400 mL	Merck KGaA, 64293 Darmstadt
	Lauf-/Blotting-Puffer 10 x	200 mL	
Lauf-/Blotting-Puffer 10 x	ddH_2O	ad 5000 mL	
	L-Glycin 1.54 M	720 g	Carl Roth GmbH & Co. Kg 76185 Karlsruhe
	TRIS 200 mM	165 g	Carl Roth GmbH & Co. Kg 76185 Karlsruhe
Laemmli-Puffer 5x	β-Mercaptoethanol 4 %	4 g	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
	Bromphenolblau 0.08 %	0.08 g	AppliChem GmbH 64291 Darmstadt
	ddH_2O	100 mL	
	Glycerin 40 %	40 g	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
	SDS 8 %	8 g	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
	TRIS-HCl 200 mM pH 8		Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
Methanol			Merck 64293 Darmstadt

Natriumdodecylsulfat			Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder			Thermo Fisher Scientific, 64289 Darmstadt
Ponceau-S-Lösung	Essigsäure 5 %	100 mL	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
	Ponceau-S 0.1 %	0.1 mL	Sigma-Aldrich GmbH, 89555 Steinheim
Rotiphenol			Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Acrylamid	4 mL	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
	Bisacrylamid 37	1 mL	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
Salzsäure 37 %			Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
Tetramethylethylendiamid			Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)			Carl Roth GmbH & Co. Kg 76185 Karlsruhe
Wasserstoffperoxid			Carl Roth GmbH & Co. KG 76185, Karlsruhe

Tabelle 16: Verwendete Antikörper für den Western Blot

Antikörper	Bezeichnung	Art	Zusammensetzung	Herkunft
Anti-p53 (DO1) monoclonal mouse	sc-126	Primär	TBS-T, 0.1 %	Santa Cruz Biotechnology, 69115 Heidelberg
Anti-γH2AX (Ser139) monoclonal rabbit	ab11174	Primär	TBS-T, 0.1 %	Abcam, Cambridge
Goat anti-Mouse-HRP	sc-516-102	Sekundär	MP 5 % TBS-T, 0.05 %	Santa Cruz Biotechnology, 69115, Heidelberg
Goat anti-Rabbit-HRP	Cs7074S	Sekundär	MP 5 % TBS-T, 0.05 %	Cell Signaling Technology, 01915 Danvers, Massachussetts

3.8 Comet Assay

Der alkalische Comet Assay, der auch als Single Cell Gel Electrophoresis assay (SCGE) bezeichnet wird, findet für die Testung von Chemikalien und Arzneimitteln in der Industrie und in Behörden Anwendung und ist in der OECD Test Guideline 489 beschrieben (OECD, 2016). Hierbei handelt es sich um eine *in vivo* Methode zur Messung von DNA-Strangbrüchen verschiedener eukaryotischer Zellen aus diversen Tierspezies, meistens Nagern, die zuvor mit einer Substanz behandelt wurden, deren toxikologisches Wirkprofil unbekannt ist (OECD, 2016). Unter alkalischen Bedingungen (pH > 13) können Einzelstrangbrüche detektiert werden (Olive *et al.*, 2006). Modifikationen des Protokolls erlauben darüberhinaus die Detektion von Doppelstrangbrüchen, die beispielsweise aus einer direkten Interaktion von ionisierender Strahlung mit der DNA entstanden sind, sowie geschädigte DNA-Basen wie 8-Oxoguanin (8-OxoG) (Olive *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2006). Außerdem sind apoptotische Zellen sowie cross-links zwischen DNA-Strängen und zwischen DNA und Proteinen detektierbar (Olive *et al.*, 2006). Die Methode eignet sich auch, um DNA-Reparatureffekte nach Exposition gegenüber genotoxischen Agenzien zu untersuchen (Singh *et al.*, 1988). In Abhängigkeit zur untersuchten Probe und des damit einhergehenden Wirkmechanismus wird die Verwendung modifizierter

Protokolle empfohlen, um unspezifische Schäden im Zuge der Aufarbeitung zu vermeiden, die Testsensitivität zu erhöhen und um Unterschiede einzelner Proben im Hinblick auf Ausmaß des induzierten Schadens zu detektieren (Collins *et al.*, 2023). Der alkalische Comet Assay weist Limitationen auf (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Olive *et al.*, 2006). So können nur prä-mutagene Läsionen anstelle von fixen DNA-Schäden detektiert werden (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Aufgrund von DNA-Reparatureffekten besteht eine starke Abhängigkeit der Ergebnisse vom Zeitpunkt der Aufarbeitung (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Olive *et al.*, 2006). Zusätzlich können pro-apoptotische oder stark zytotoxische Substanzen zu DNA-Strangbrüchen führen, was die Interpretation der Ergebnisse erschweren kann (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Olive *et al.*, 2006). Die Analyse von Substanzen, die zwei verschiedene Mechanismen der DNA-Schädigung aufweisen, kann die Interpretation der mittels Comet Assay erhobenen Ergebnisse ebenfalls erschweren (Olive *et al.*, 2006). So führen DNA quervernetzende Substanzen zu einer Maskierung von DNA-Einzelstrangbrüchen (Olive *et al.*, 2006; Merk *et al.*, 1999; Olive *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde eine *in vitro* Variante des alkalischen Comet Assays in Leberzellen etabliert. Im Unterschied zu der in OECD TG 489 beschriebenen Methode erfolgt die Substanzgabe in das Kultivierungsmedium der HepG2 Zelllinien oder der nach *in-situ* Perfusion erhaltenen, frisch isolierten Hepatoyzen anstatt am lebenden Tier. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgt im Einklang mit der in TG 489 beziehungsweise nach der von Singh *et al.* beschriebenen Methode (Singh *et al.*, 1988). Die Zellkerne werden mithilfe eines Lysepuffers isoliert und im Anschluss elektrophoretisch aufgetrennt, wobei eine Migration fragmentierter, relaxierter DNA in Richtung der Anode stattfindet. Unfragmentierte DNA verbleibt an gleicher Stelle in der Agarose. Das Ausmaß des Schadens kann im Anschluss mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie unter Betrachtung der Schweifintensität (engl. Tail Intensity; TI), die den Anteil der DNA im Schweif widerspiegelt und von der OECD für die Bewertung des Schadenausmaß empfohlen wird, quantifiziert werden. Nach der vorgesehenen Inkubationszeit werden die Zellen geerntet. Zur Bestimmung der Induktion von DNA-Strangbrüchen wurde nach der vorgesehenen Inkubationszeit zunächst das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mithilfe von Trypsin abgelöst. Nach Zentrifugation der Zellsuspension und Abtrennung des Überstandes erfolgte die

Resuspension in PBS. Anschließend wurden die Zellen in Low Melting Point Agarose aufgenommen. Die Inkubation in Lysepuffer erfolgte für 1 h, nachdem das Agarosezellgemisch auf Objektträger aufgetragen wurde. Nach Denaturierung mit alkalischem Elektrophoresepuffer (HepG2 Zellen: 20 min, PRH: 25 min) wurde die Elektrophorese (HepG2 Zellen 30 min, PRH 15 min) bei 350 mA durchgeführt. Schließlich wurden die Zellen neutralisiert und fixiert. Nach Trocknung der Objektträger erfolgte schließlich die Färbung mit Propidiumiodid. Zur mikroskopischen Auswertung wurde einAxioobserver Mikroskop von Zeiss mit integrierter Zen Software verwendet. Dieses ist mit einer Colibri LED Kamera ausgestattet. Die Datenprozessierung generierter fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen erfolgte mit der Comet IV Software von Instem und ermöglichte eine Quantifizierung verschiedener Parameter, welche zur Beurteilung des DNA-Schadens herangezogen werden können. Pro Behandlung und Experiment wurden 50 Zellen gemessen, wobei ein Objektiv (EC Plan-NEOFLUAR 10x/0.3) mit 10-fach Vergrößerung gewählt wurde. Zur statistischen Auswertung und Darstellung mittels GrapPad Prism wurden die medianbasierten Schweifintensitäten berücksichtigt. In nachfolgender Tabelle sind die Zusammensetzungen der unterschiedlichen Reagenzien aufgelistet.

Tabelle 17: Verwendete Puffer für den Comet Assay

Reagenz	Zusammensetzung	Menge [g/mL]	Herkunft
Agarose Low Melt (LMP) 0.5 %	Agarose LMP	0.5 g	Carl Roth GmbH & Co. Kg 76185 Karlsruhe
	ddH_2O	100 mL	
Agarose Normal Melt (NMP) 1.5 %	Agarose NMP	1.5 g	Genaxxon bioscience GmbH 89077 Ulm
	PBS	100 mL	
Elektrophoresepuffer pH > 13	ddH_2O	ad 1000 mL	
	EDTA 1 M	0.37 g	TH. Geyer GmbH & Co. KG 71272 Renningen
	NaOH 300 mM	12 g	Sigma-Aldrich, 89555 Steinheim
Lysepuffer pH 10	ddH_2O	ad 2000 mL	

	Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) 100 mM	37.2 g	TH. Geyer GmbH & Co. KG 71272, Renningen
	NaCl 2.5 M	146.1 g	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
	TRIS 10 mM	1.2 g	Carl Roth GmbH & Co. KG 76185 Karlsruhe
Neutralisationspuffer pH 7.5	ddH_2O	ad 2000 mL	
	TRIS 0.4 M	96.9 g	Carl Roth GmbH & Co. Kg 76185 Karlsruhe
Phosphatgepufferte Salzlösung	ddH_2O	ad 1000 mL	
	DPBS	8.55 g	Pan-Biotech GmbH 94501 Aidenbach
Propidiumiodidlösung 50 µg /mL	ddH_20	95 mL	
	PI-Lösung 1 mg/mL	5 mL	Carl Roth GmbH & Co. Kg 76185 Karlsruhe

3.9 BMD Modelling der mittels Comet Assay erhobenen Daten

Das Benchmark Dose (engl. Richtdosis, BMD) Modelling der ermittelten Daten erfolgte extern am Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM) durch Anke Londenberg. Hierfür wurden die Daten mithilfe der Software R 4.2.2 (2022-10-31 ucrt; R Core Team, 2022), proast (version 70.3., RIVM, https://www.rivm.nl/en/PROAST), sowie ggplot2 (version 3.4.0, Wickham, 2016, https://ggplot2.tidyverse.org) dplyr (Wickham *et al.*, 2023) und magrittr (Bache S. *et al.*, 2022; R Core Team, 2023; proast, 2025; Wickham, 2016; package 'magittr' , 2022) prozessiert. Zur Berechnung des BMD CIs mitsamt oberer und untere Grenze ist die Bestimmung der Benchmark Response (BMR), welche die relative, prozentuale Änderung im Vergleich zur Negativkontrolle beschreibt und auch als kritische Effektgröße (CES) bezeichnet wird, notwendig (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Insgesamt wurden drei CES ermittelt (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die CES_{SD} beschreibt die Standardabweichung und gleichzeitig die studienspezifische kritische Effektgröße (Djuari *&* Londenberg *et al.*, 2023). Die CES_{50} beschreibt die 50 %-ige Erhöhung der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die CES_{100} ist mit einer zweifachen Änderung der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle gleichzusetzen und wurde in dieser Arbeit als Vorraussetzung zur Einstufung als biologisch relevanter Effekt bestimmt (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Darüberhinaus erfolgte die Ermittlung eines median BMD Wertes (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die CI/BMD Werte wurden zur Gewährleistung

eines visuellen Vergleiches auf einer log10-Skala aufgetragen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Dabei erfolgte die Berechnung der CI Werte, die das Verhältnis des 90-igsten oberen und unteren Konfidenzintervallwerte (BMDu/BMDl) angeben und als Maß für die Präzision der BMD Berechnung herangezogen werden (Slob, 2014; White *et al.*, 2018). Die Präzision der Analysen wurde mithilfe des Modellmittelungsverfahren erhöht (Slob, 2018). Zusätzlich bietet die Kovariatanalyse eine Möglichkeit zur Erhöhung der Präzision durch Verringerung der CI Werte bei der Berechnung der BMD CIs, da Informationen aus mehreren Datensätzen zur Schätzung genutzt werden (Wills *et al.*, 2017; White *et al.*, 2019). Vorraussetzung hierfür ist die Konstanz einiger Parameter über mehrere Datensätze hinweg (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Zudem ist für das BMD Verfahren die logarithmische Normalverteilung des Datensatzes notwendig (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die Verteilung wurde für die vier besten Modelle innerhalb einer Familie mithilfe eines quantile-quantile (qq-plot) ermittelt (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die Datensätze wurden anhand weiterer Kriterien präselektioniert. So war mindestens ein statistisch signifikanter Anstieg der mittelbasierten Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle sowie ein mindestens zweifacher Anstieg der mittel-, oder medianbasierten mittleren Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle Vorraussetzung für das BMD Modelling (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Effekte nach Behandlung mit Konzentrationen, die zur Zytotoxizität und Präzipitation führen, wurden von den Analysen ausgeschlossen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Sowohl mittelwert-, als auch medianbasierte, prozentuale Schweifintensitäten wurden für das Modelling, sofern die genannten Kriterien erfüllt waren, verwendet (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Es erfolgte die Beurteilung der Sensitivität, der Spezifität und der Reproduzierbarkeit der verwendeten Leberzellmodelle in Bezug auf das Detektieren eines mutagenen Potentials (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In dem Ranking wurden sechs der zehn *N*-Nitrosamine mit bekannten Kanzerogenitätsdaten berücksichtigt, darunter NDMA, NDELA, S-NNN, NMA, NMtBu und NPro (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die Bestimmung der Sensitivität und der Spezifität erfolgte unter Berücksichtigung richtig positiv und negativ sowie falsch positiv und negativer Testantworten (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023).

$$Sensitivität = \frac{RP}{RP+FN} \qquad Spezifität = \frac{RN}{RN+FP}$$

Abbildung 31: Formeln zur Berechnung der Sensitivität und Spezifität der Zellmodelle. Modifiziert nach Djuari & Londenberg *et al.*, 2023.

Eine Beurteilung der Robustheit erfolgte unter Berücksichtigung der Korrelation zwischen Konzentration und Testantwort und der damit einhergehenden Fähigkeit, verschiedene *N*-Nitrosamine hinsichtlich ihres genotoxischen Potentials zu differenzieren.

3.10 Untersuchung des zeitabhängigen Anstiegs von O^6-Methylguanin und N7-Methylguanin in PRH

3.10.1 Isolierung genomischer DNA mittels Phenol-Chloroform Extraktion

Zur Isolierung von genomischer DNA wurde die Methode nach Carlsson *et al.* durchgeführt, die sich von der klassischen Methode, die zur Nukleinsäurenisolierung angewendet wird, unterscheidet (Carlsson *et al.*, 2022). So ist bekannt, dass sich durch zweifache Chloroformaufreinigung der Reinheitsgrad der DNA erhöhen lässt (Carlsson *et al.*, 2022; Toni *et al.*, 2018). Durch zusätzliche Waschschritte mit Ethanol lässt sich die Reinheit ebenfalls erhöhen (Carlsson *et al.*, 2022; Toni *et al.*, 2018). Auch die Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Menge isolierter Nukleinsäuren nehmen zu (Toni *et al.*, 2018). Die Bestimmung der DNA erfolgte photometrisch, wobei das zugrunde liegende Messprinzip durch das Lambeert-Beer-Gesetz beschrieben ist (s. Abb. 32):

$$A = - \log T = \log \frac{I0}{I} = \varepsilon \times c \times d$$

Abbildung 32: Formel zur Berechnung der Probenabsorption nach Lambert-Beer. A = Absorption, T= Transmission, I0/I = Intensität des gemessenen Lichtes vor/nach Probenpassage, ε = Absorptionskoeffizient, c = Konzentration der Probe, d. Weglänge des Lasers. Modifiziert nach Mäntele *et al.*, 2017.

Zur Quantifizierung erfolgt die Messung der Menge des absorbierten Lichtes bei 260 nm, während zur Bestimmung der Reinheit zusätzlich die Menge des absorbierten Lichtes bei 230 nm und bei 280 nm relevant ist (Toni *et al.*, 2018). Das Verhältnis der eingestrahlten Lichtmenge zur nach Probendurchlauf emittierten Menge wird durch die Multiplikation des molaren Absorptionskoeffizienten, der Probenkonzentration sowie der Wegstrecke beschrieben (Mäntele *et al.*, 2017). Dabei ist der molare Absorptionskoeffizient spezifisch und damit abhängig von den chemischen Eigenschaften des zu untersuchenden Analyten (Schaub *et al.*, 2025). Die Anwendbarkeit setztmonochromatisches Licht, die homogene Verteilung von Substanzen in der Probe, die vollständige Probenpassage des eingestrahlten Lichtes sowie der Ausschluss von Lichtstreuung und photochemischen Reaktionen in der Probe (Mäntele *et al.*, 2017) vorraus. Nach beendeter Inkubation wurden die Zellen zusammen mit dem Inkubationsmedium mithilfe eines Zellschabers in

ein Falkon überführt und zentrifugiert 210 g, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit PBS resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und zentrifugiert (300 g, 4 °C). Nach Absaugen von PBS wurde das Zellpellet bei -20 °C gelagert. Die Zellpellets wurden mit Lysepuffer geerntet. Nach Hinzufügen von Proteinase-K-Lösung und RNase-A-Lösung erfolgte das Invertieren bei 55 °C und 500 rpm im Thermoschüttler über Nacht. Nach Abkühlung erfolgte die Zugabe von Extraktionslösung 1. Die Zellen wurden gevortext und zentrifugiert (13300 rpm, RT). Die wässrige Phase wurde überführt und mit RNase A inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von Extraktionslösung 2. Die Proben wurden erneut gevortext und zentrifugiert (13300 rpm, 4 °C). Die wässrige Phase wurde in überführt. Es erfolgte die Zugabe von eiskaltem Ethanol 100 %. Durch Invertieren wurde die DNA ausgefällt. Dann erfolgte eine Zentrifugation (13300 rpm, 4 °C). Nach Abnahme des Überstandes erfolgte das Lösen der DNA in ddH_2O. Nach Zugabe von 3 M Natriumacetat und eiskaltem Isopropanol 100 % wurde die DNA gefällt. Nach einem erneuen Zentrifugationsschritt (13300 rpm, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit je 700 µL eiskaltem Ethanol 70 % gewaschen. Nach Zentrifugation (13300 rpm, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in ddH_2O gelöst. Nach 30 Minuten erfolgte die Messung der Reinheit (A260/230 nm und A260/280 nm) und des DNA-Gehaltes (A 260 nm).Vorraussetzung für die Methode zum enzymatischen Verdau der DNA war hierbei, dass der isolierte DNA-Gehalt bei mindestens 200 ng/50 µL liegt.

Tabelle 18: Zusammensetzung der für die Phenol-Chloroform Extraktion verwendeten Lösungen

Reagenz	Zusammensetzung	Mengen [g, mL]
Extraktionslösung 1	Chloroform	24 mL
	Isoamylalkohol	1 mL
	Phenol	25 mL
Extraktionslösung 2	Chloroform	24 mL
	Isoamylalkohol	1 mL
Lysepuffer	SDS-Lösung (10 %)	40 mL
	TAE Puffer	400 mL
	Triton-X-100 Lösung (10 %)	20 mL
SDS-Lösung 10 %	ddH_2O	20 mL
	SDS-Lösung 20 %	20 mL
TAE Puffer pH 8	ddH_2O	ad 1000 mL
	Essigsäure 100%	1.144 mL
	Na_2EDTA	0.186 g
	Tris	4.844 g
Triton-X-100 10 %	Triton-X-100	2 mL
	ddH_2O	18 mL

3.10.2 Messung des zeitabhängigen Anstiegs von O^6-MeG und N7-MeG mittels LC-MS

Zur Identifizierung und Quantifizierung von O^6-MeG-, und N7-MeG-Addukten sowie der adduktierten DNA-Base 2'Deoxyguanosin (dG) wurde der enzymatische Verdau der isolierten DNA und die Synthese der Standards durch Matthias Vogel im BfArM durchgeführt. Anschließend erfolgte die Messung mittels LC/MS. Für die Berechnung der Addukte/10^8 Nukleoside wurde die Teilchenanzahl von O^6-MeG und N7-MeG aus deren Konzentration berechnet. Die entsprechenden Konzentrationen von 2'Deoxyguanosin und O^6-MeG sowie N7-MeG wurden aus der Peakfläche von 2'Deoxyguanosin, O^6-MeG sowie N7-MeG multipliziert mit der Steigung der Kalibriergerade von 2'Deoxyguanosin bzw. der Steigung der Kalibriergerade von O^6-MeG ermittelt. Nach Multiplikation der Konzentration in mol/l mit der Avogadro-Konstanten konnte schließlich die Anzahl der DNA-Addukte pro 10^8 Nukleoside nach folgender Formel bestimmt werden, wobei durch den Wert 0.22 der spezifische GC-Gehalt der Ratte beschrieben ist (Schulte-Hubbert *et al.*, 2020, vgl. Abb. 33).

$$\frac{Addukte}{10^8\ Nukleoside} = \frac{Teilchenzahl\ (DNA\ Addukt)\ x\ 0.22}{Teilchenzahl\ (dG)}\ x\ 10^8$$

Abbildung 33: Formel zur Berechnung der Anzahl an DNA-Addukten/10^8 Nukleoside. Modifiziert nach Schulte-Hubbert *et al.*, 2020.

3.11 Mikrokern Assay

Mithilfe des Mikrokern Assays sind chromosomale Schäden infolge von aneugen oder klastogen wirkenden Substanzen detektierbar (OECD, 2023). Während der Zellteilung kann es zu einer Fehlverteilung von Chromosomen kommen, die in einer Bildung von Chromosomen oder Chromosomenfragmenten außerhalb des Zellkerns resultiert (Sommer *et al.*, 2020; Krupina *et al.*, 2021). Diese mikronukleare DNA ist im Zytoplasma lokalisiert, von einer Kernhülle umgeben und mit Histonen sowie Kernproteinen assoziiert (Fahrer *et al.*, 2024). Klastogene Effekte führen zu azentrischen Chromosomenbruchstücken und zeichnen sich durch strukturelle Änderungen aus, während aneugene Effekte durch den Verlust ganzer Chromosomen infolge von Chomosomenfehlverteilung charakterisiert sind und in numerischen Abberrationen resultieren (Sommer *et al.*, 2020). Aneugene Effekte resultieren aus einer Beeinträchtigung von Zentromeren, Kinetochore oder des Spindelapparates (Sommer *et al.*, 2020). Klastogene Effekte werden beispielsweise durch ionisierende Strahlung oder

Chemikalien wie Benzen hervorgerufen (Sommer *et al.*, 2020). Der Mikrokerntest erlaubt die Unterscheidung zwischen aneugenen und klastogenen Effekten durch immunochemisches Färben der Kinetochore oder fluoreszierender Hybridisierung mit telomeren, zentromeren Sonden (fluorescence in situ hybridization, FISH) (OECD, 2023; Fenech *et al.*, 1986; Eastmond *et al.*, 1989). CytoB hemmt die Zytokinese durch Hemmung der Bildung kontraktiler Mikrofilamente und durch Inhibierung der Polymerisation von Aktinfilamenten (Theodoropoulos *et al.*,1994; Scherlach *et al.*, 2010). Die Karyokinese hingegen wird nicht beeinflusst, was die Bildung von Mikrokernen ermöglicht (Sommer *et al.*, 2020). Die Durchführung des Mikrokerntestes erfolgte gemäß der OECD 487 Testguideline (OECD, 2023). Es wurde parallel eine Messung der Zellviabilität durchgeführt, da zytotoxische Effekte ebenfalls zu Mikrokernentstehung führen können, was die Identifizierung von durch genotoxischen Mechanismen hervorgerufenen Effekten erschweren kann (OECD, 2023). Zur Aussaat wurden 0.2 x 10^6 Zellen auf Deckgläschen in 3.5 cm Zellkulturschalen verwendet. Nach 24 h wurden die Zellen mit den Substanzlösungen inkubiert. Nach weiteren 24 h wurde das Medium abgesaugt und nach einem Waschschritt mit PBS durch frisches Medium ersetzt. Die Inkubation mit 6 µg/mL CytoB für 72 h wurde im Anschluss durchgeführt. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mithilfe von eiskaltem Methanol 100 % fixiert (10 Minuten, -20 °C). Dann erfolgte erneut ein Waschschritt mit PBS, bevor die Zellen mit dem Zellkernfarbstoff DAPI gefärbt und eingedeckelt wurden. Nach Trocknung erfolgte die Messung am Fluoreszenzmikroskop (Ex 358 nm/Em 461 nm) mittels integrierter ZEN Software. Das Axioobserver Mikroskop von Zeiss, welches mit einer Colibri LED Kamera ausgestattet ist, wurde verwendet. Die Anregung erfolgte fluorimetrisch durch Verwendung des Kanals, welcher für DAPI geeignet ist. Das Zählen der Zellen erfolgte manuell durch Auswählen repräsentativer Bildausschnitte unter Verwendung eines EC Plan-NEOFLUAR Objektives mit 63 x Vergrößerung. Zur Auswertung wurden jeweils 500 Doppelkerne pro Behandlung herangezogen, wobei die Anzahl der Mikrokerne zu berücksichtigen war. Daraus ließ sich Die Mikrokernrate, welche den relativen Anteil der Mikrokerne an Doppelkernen beschreibt, bestimmen. Die statistische Auswertung und Darstellung der Mikrokernrate erfolgte mit GraphPad Prism.

4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen der metabolischen Kompetenz in frisch isolierten PRH und in kryokonservierten PRH mittels LC-MS

Für die Interpretation der aus dem Comet Assay ermittelten Daten ist die Beurteilung der metabolischen Kompetenz der PRH bedeutsam. Dies diente zur Sicherstellung, dass zur Bearbeitung der Fragestellung ein geeignetes Modell gewählt wurde. Hierfür wurden isoformspezifische CYP Substrate ausgewählt. Nach Behandlung von PRH für 4 h erfolgte die Zellernte. Zellpellets, Zellüberstände und behandeltes, zellfreies Medium wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse mittels LC-MS durch Dr. Matthias Vogel (BfArM, Bonn) bei -80 °C gelagert. Als Kontrolle diente mit Substanzen versetztes, zellfreies Inkubationsmedium. Neben diesen Mediumkontrollen dienten unbehandelte Zellen als Kontrolle. Für den Vergleich zwischen der metabolischen Kompetenz unterschiedlicher CYP Isoformen aus frischen versus aufgetauten Zellen der Spezies Ratte wurde das Stoffwechselverhältnis ermittelt, welches aus dem Quotient aus Metabolit und Metabolit + Substrat berechnet wird. CYP2C19 scheint sowohl in frisch aufgetauten PRH als auch in isolierten PRH nahezu inaktiv zu sein, was sich durch die Abwesenheit des entsprechenden Metaboliten Hydroxymephenytoin, welcher aus Mephenytoin nach Inkubation mit aktivem CYP2C19 Enzym entsteht, ableiten lässt (Abb. 34).

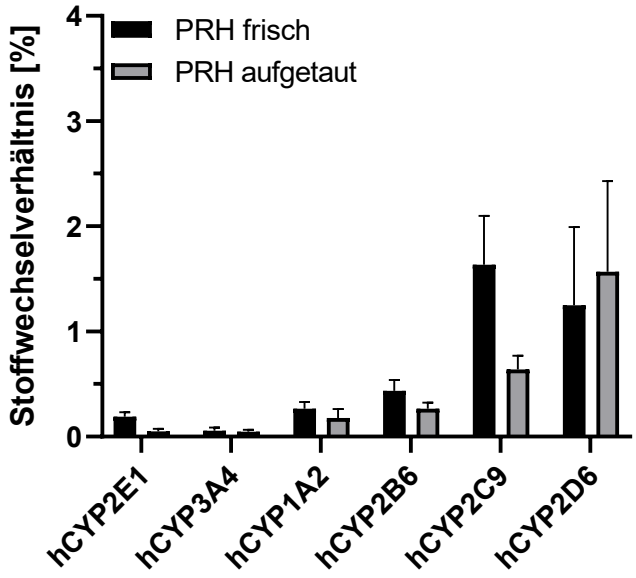

Abbildung 34: Stoffwechselverhältnis der verschiedenen Cytochrom-P450-Enzyme in PRH.
Dargestellt ist das auf n=3 basierende Verhältnis des gemessenen Metaboliten zur Summe aus Metabolit und Substrat im Überstand. PRH wurden mit etablierten humanen CYP Substraten für 4 h behandelt: CYP2B6; Bupropion, CYPE1; Chlorzoxazon, CYP2D6; Dextromethorphan, CYP3A4; Midazolam, CYP1A2; Phenacetin, CYP2C9; Tolbutamid.

Daher ließ sich kein Stoffwechselverhältnis bestimmen. Für CYP2A6, welches die Umsetzung von Nikotin zu Cotinin katalysiert, konnte kein Stoffwechselverhältnis bestimmt werden, da das Ausgangssubstrat Nikotin nicht detektierbar war. Die LC-MS Messungen der Substrate und Metaboliten in frischen Hepatozyten zeigen, dass es Unterschiede in der Höhe der ermittelten Verhältnisse einzelner CYP Isoenzyme gibt. Für CYP2D6 und CYP2C9 konnte in PRH für das Stoffwechselverhältnis Werte > 1 ermittelt werden. 3A4, 2E1 und 1A2 weisen ein Stoffwechselverhältnis deutlich < 1 auf. Mit Ausnahme von CYP2D6 weisen die untersuchten CYP Enzyme in frisch ausplattierten Zellen eine höhere Aktivität als in aufgetauten Zellen auf. Eine Erklärung für die vergleichsweise hohe Proteinaktivität von CYP2D6 in aufgetauten Zellen ist vermutlich in der großen Standardabweichung zu finden, welche auf eine große Variabilität zwischen einzelnen Messungen verweist. Das gemessene Stoffwechselverhältnis der untersuchten Enzyme ist in aufgetauten Hepatoyzten mit Ausnahme von CYP2C9 ähnlich wie in frischen Zellen. Somit sind aufgetaute PRH hinsichtlich der metabolischen Aktivierung von *N*-Nitrosaminen geeignet und eignen sich zur damit zur Untersuchung genotoxischer Eigenschaften.

4.2 Untersuchung der Zytotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in PRH mittels Zellviabilitätstest

4.2.1 Effekt von CPA

Zur Gewährleistung optimaler Kultivierungsbedingungen von PRH zur Untersuchung strukturell unterschiedlicher *N*-Nitrosamine hinsichtlich zytotoxischer und genotoxischer Effekte wurde die Zellviabilitätfrisch isolierter PRH in Vorversuchen unter Berücksichtigung unterschiedlicher Sauerstoffbedingungen und nach Exposition gegenüber CPA untersucht. Dabei wurden die Zellen nach Ausplattieren unter hypoxischen Sauerstoffbedingungen (7 % O_2) und unter Standardbedingungen mit einem Sauerstoffgehalt von 20 % bei jeweils 5 % CO_2 inkubiert und behandelt. Zusätzlich wurde der Effekt des Zytostatikums in Zellen untersucht, die nach dem Auftauen ausplattiert und unter hypoxischen Bedingungen (7 % O_2, 5 % CO_2) kultiviert wurden. Für frisch ausplattierte und aufgetaute Zellen wurde die Zellviabilität mittels Trypanblau ermittelt. Nach 3 h Anwachszeit erfolgte das Entfernen toter Zellen mithilfe von PBS. Dann erfolgte die Zugabe des Inkubationsmediums. Schließlich wurde eine vergleichende Beurteilung zytotoxischer Effekte von CPA mittels der im Zellviabilitätstest erhobenen Daten durchgeführt. Lichtmikroskopische Aufnahmen wurden für die Interpretation zytotoxischer Effekte ebenfalls berücksichtigt und sind im elektronischen Anhang dieser Arbeit zu finden (vgl. A3.1.1). PRH wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von 0.125 mM - 8 mM der Substanz behandelt und für 24 h inkubiert. Zur Beurteilung der Zellmorphologie wurde eine mittlere Konzentration CPA (0.5 mM), und eine hohe Konzentration CPA (8 mM) ausgewählt und mit unbehandelten Zellen verglichen (s. A3.1.1). Als Positivkontrolle dienten Zellen, die mit 0.1 % Saponin behandelt wurden (s. Abb. 35). Die Behandlung frisch ausplattierter PRH mit CPA unter reduziertem Sauerstoffgehalt (7 % O_2, 5 % CO_2) führte in konzentrationsabhängiger Weise zu einer Abnahme der Zellviabilität (Abb. 35).

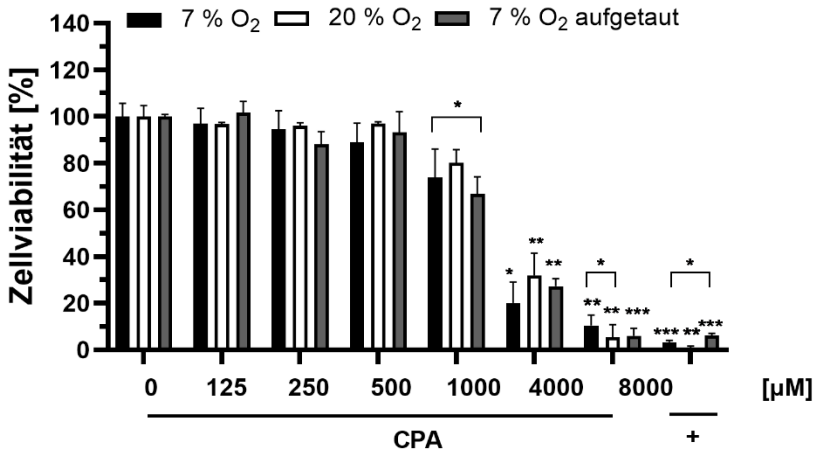

Abbildung 35: Effekt von CPA auf die Zellviabilität in PRH.
Zellviabilität (y-Achse) aufgetragen gegen aufsteigende Konzentrationen (x-Achse) nach 24 h Inkubation. Inkubationsmedium: (1.0 g/l Glucose DMEM, 10 % FKS, 1% P/S). Das Inkubationsmedium dienten als Negativkontrolle (-), 0.1 % Saponin diente als Positivkontrolle (+). Mittelwert ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle bezogen.*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; t-test.

Statistisch signifikante Effekte im Vergleich zur Negativkontrolle traten nach Behandlung mit 4 mM und 8 mM auf (s. Abb. 35). Die höchste Testkonzentration führte zu einer um etwa 90 % reduzierten Zellviabilität im Vergleich zu unbehandelten Zellen (vgl. Abb. 35). Nach Logarithmierung der Testkonzentrationen und mathematischer Modellierung konnte eine EC_{50} von 1.83 mM abgeleitet werden. Nach Isolierung der Zellen konnte mithilfe der Trypanblaufärbung eine Vitalität von ⌀ 92 % bestimmt werden. CPA führte in konzentrationsabhängiger Weise zu einer Reduktion der Zellviabilitätin frisch isolierten PRH nach 24 h, welche unter Standardbedingungen kultiviert wurden (20 % O_2, 5 % CO_2) (s. Abb. 35). Behandlung mit 8 mM führten zu einem maximal ausgeprägten zytotoxischen Effekt, der sich in einer um 95 % reduzierten Zellviabilität im Vergleich zur Negativkonrolle äußerte (Abb. 35). Statistische Signifikanz im Vergleich zur Negativkontrolle trat nach Behandlung mit 4 mM und nach Behandlung mit 8 mM ein (Abb. 35). Beim Vergleich primärer Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen (7 % O_2, 5 % CO_2) angewachsen und inkubiert wurden mit Zellen, die unter höherem Sauerstoffgehalt (20 %) angewachsen sind, ließen sich nach lichtmikroskopischer Betrachtung kaum Unterschiede in der Morphologie und dem Anwachsverhalten feststellen (s. Anhang 3.1.1). Nach mathematischer Modellierung ließ sich ein EC_{50} von 2.34 mM bestimmen. Der Einfrier-, und Auftauprozess primärer Zellen beeinträchtigte das Anwachsen der Zellen nicht,

sodass eine Behandlung aufgetauter PRH nach 3 h möglich war. Allerdings war eine Abnahme der Vitalität (⌀ 74 %) zum Zeitpunkt des Ausplattierens feststellbar. In aufgetauten PRH führte CPA in konzentrationsabhängiger Weise zu einer Reduktion derZellviabilität, wobei statistisch signifikante Effekte nach Behandlung mit 4 mM und 8 mM messbar waren (s. Abb. 35). Die Reduktion lebender Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle lag bei 94 % nach Behandlung mit der höchsten Konzentration (Abb. 35). Der Einfrier-, und Auftauprozess scheint darüberhinaus die Sensitivität von PRH gegenüber CPA nicht zu erhöhen, was anhand einer EC_{50} von 1.81 mM verdeutlicht wird, der sehr nahe an der EC_{50} nach Messung frisch ausplattierter PRH unter gleichen Kultivierungsbedingungen liegt (EC_{50}: 1.83 mM). Weder die Art der gewählten Kultivierungsbedingung noch Prozesse wie einmaliges Einfrieren und Auftauen von PRH hatten deutliche Effekte auf die Zellviabilität, weshalb keine Notwendigkeit zur Priorisierung einer der dargestellten Testkonditionen besteht (vgl. Abb. 35).

4.2.2 Effekt von MMS

Zur Untersuchung des Effektes von MMS auf die Zellviabilität, wurden die Zellen mit Konzentrationen im Bereich von 0 - 1600 µM behandelt und für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung zytotoxischer Effekte mittels Zellviabilitätstest. MMS zeigt im gewählten Konzentrationsbereich zytotoxische Effekte (Abb. 36).

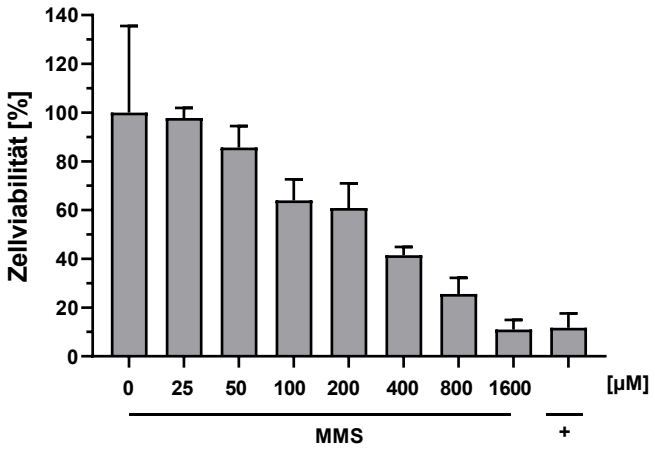

Abbildung 36: Effekt von MMS auf die Zellviabilität in PRH.
Zellviabilität (y-Achse) graphisch aufgetragen gegen aufsteigende Konzentrationen (x-Achse) (0 – 1600 µM) nach 24 h Inkubation. Inkubationsmedium: (1.0 g/l Glucose DMEM, 10 % FKS, 1% P/S). Das Inkubationsmedium diente als Negativkontrolle, 0.1 % Saponin diente als Positivkontrolle (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. t-test.

Dabei trat in konzentrationsabhängiger Weise eine Reduktion der Zellviabilität ein (vgl. Abb. 36). Behandlung mit der höchsten Testkonzentration führte zu einer um 90 %

reduzierten Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 36). Nach mathematischer Modellierung konnte eine EC_{50} von 260 µM bestimmt werden.
Damit ließen sich zytotoxische Effekte von MMS in PRH demonstrieren, weshalb diese Substanz idealerweise als Positivkontrolle für die Analyse zytotoxischer Eigenschaften von *N*-Nitrosaminen angewendet werden kann.

4.2.3 Effekte von NDMA und NDELA

Zur Untersuchung des Effektes von NDMA und NDELA auf die Zellviabilität wurden PRH nach dem Anwachsen für 24 h mit aufsteigenden Konzentrationen NDMA (0 - 10 mM) und NDELA (0 - 10 mM) behandelt und mittels Resazurinreduktionstest gemessen. Nach Behandlung mit NDMA blieben zytotoxische Effekte weitgehend aus (vgl. Abb. 37). Lediglich nach Behandlung mit 10 mM trat eine leichte Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle auf (Abb. 37).

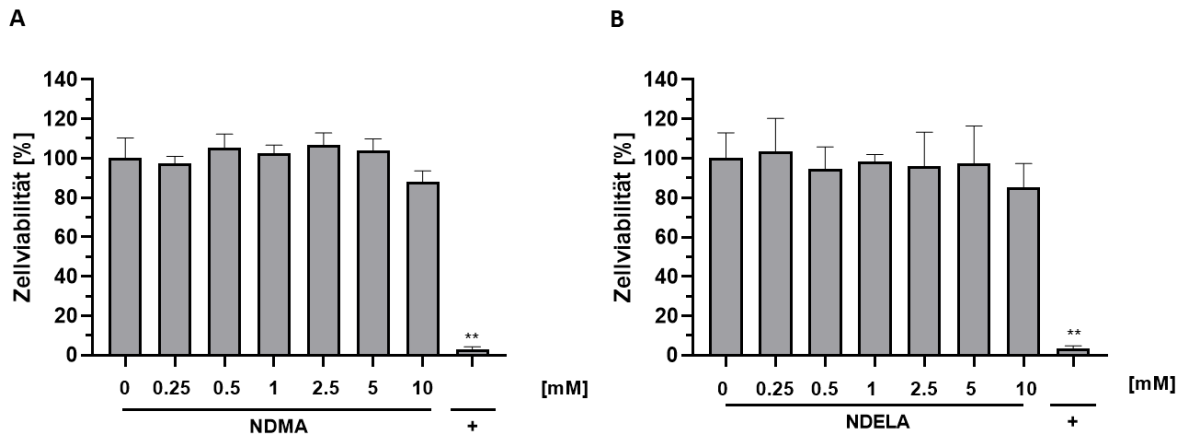

Abbildung 37: Effekt von NDMA und NDELA auf die Zellviabilität in PRH.
A Zellviabilität (y-Achse) nach Behandlung mit NDMA, graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. **B** Zellviabilität (y-Achse) nach Behandlung mit NDELA, graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=4 (NDMA) und n=3 (NDELA) Experimenten . Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (DMEM, 1 g/l glucose, 10 % FKS, 1 % P/S) bezogen. 0.1 % Saponin (+) diente als Positivkontrolle. **, $p < 0.01$; t-test.

Für NDELA zeigte sich, ähnlich wie für NDMA, eine leichte Abnahme der Zellviabilität nach Behandlung mit 10 mM (s. Abb. 37).

4.2.4 Effekte von NMtBu und NMIPA

PRH wurden mit NMtBu und NMIPA mit Konzentrationen von 0 - 10 mM für 24 h inkubiert. Die Zellviabilität wurde mittels Zellviabilitätstest gemessen. Nach Behandlung von PRH

mit NMtBu trat eine leichte Abnahme der Zellviabilität in den beiden höchsten Konzentrationen auf (5 mM, 10 mM) (Abb. 38 A).

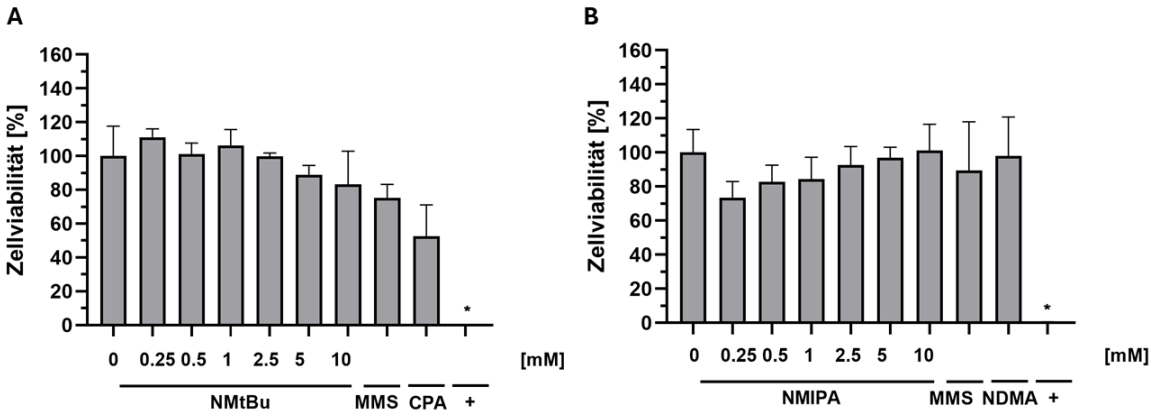

Abbildung 38: Effekt von NMtBu und NMIPA auf die Zellviabilität in PRH.
A Zellviabilität (y-Achse) nach Behandlung mit NMtBu, graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. **B** Zellviabilität (y-Achse) nach Behandlung mit NMIPA, graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. Als Positivkontrollen dienten 0.26 mM MMS, 5 mM NDMA, 1.8 mM CPA und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; t-test.

Das Ausmaß zytotoxischer Effeke unter den gegebenen Testbedingungen war für eine Kalkulierung der EC_{50} unzureichend. Die Behandlung mit NMIPA führte zu keiner Beeinträchtigung lebender Zellen, was anhand der nach Behandlung mit der höchsten Konzentration unveränderten Anzahl lebender Zellen erkennbar wird (s. Abb. 38 B). Die geringste Konzentration führte zu leichter Abnahme der Zellviabilität, was jedoch weniger auf substanzinduzierte Effekte als auf biologische Diversität zurückzuführen ist (s. Abb. 38 B). Für größere Unterschiede zwischen den Zellen im Hinblick auf Viabilität sprechen ebenso die hohen Fehlerbalken zwischen den einzelnen biologischen Replikaten.

4.2.5 Effekte von NNN und S-NNN

Für die Untersuchung zytotoxischer Effekte des tabakspezifischen Nitrosamins NNN wurden PRH mit aufsteigenden Konzentrationen (0 – 10 mM) der racemischen Form von NNN und dem S-Enantiomer (S-NNN) für 24 h behandelt. Dann erfolgte die Aufnahme lichtmikroskopischer Bilder sowie die Aufarbeitung und Messung mittels Zellviabilitätstest (vgl. A3.1.1, Abb. 39). Nach Behandlung mit der racemischen Form traten bereits ab 0.5 mM zytotoxische Effekte mit einer konzentrationsassoziierten Abnahme der Zellviabilität auf (Abb. 39 A).

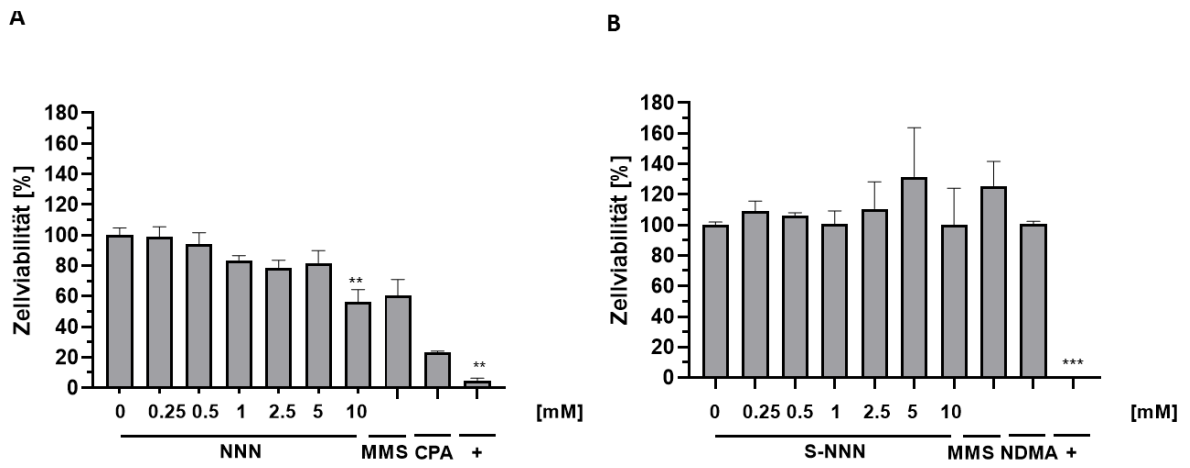

Abbildung 39: Effekt von NNN und S-NNN auf die Zellviabilität in PRH.
A Zellviabilität (y-Achse), nach Behandlung mit NNN, graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. **B** Zellviabilität (y-Achse) nach Behandlung mit S-NNN, graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. Als Positivkontrollen dienten 0.26 mM MMS, 1.8 mM CPA, 5 mM NDMA und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle DMEM, 1 g/l glucose, 10 % FKS, 1 % P/S (NNN) bzw 0.5 % DMSO (S-NNN) bezogen. **, $p < 0.01$;***, $p < 0.001$; t-test.

Die Reduktion lebender Zellen nach Behandlung mit 10 mM lag unter 50 %, weshalb keine EC_{50} abgeleitet werden konnte (s. Abb. 39 A). Die höchste Konzentration S-NNN (10 mM) führt lediglich zu einer Reduktion lebender Zellen von etwa 5 % im Vergleich zur Negativkontrolle nach 24 h (vgl. Abb. 39 B). Im Hinblick auf die Zellviabilität zeigen diese Ergebnisse, dass PRH deutliche sensitiver gegenüber dem Racemat sind.

4.2.6 Effekt von NPro

Zur Untersuchung zytotoxischer Effekte von NPro wurden PRH mit aufsteigenden Konzentrationen (0 - 2.5 mM) behandelt und die Zellviabilität nach 2 h sowie 24 h gemessen. Die Messung nach 2 h diente dem Ausschluss unspezifischer Effekte, die zur Strangbruchinduktion führen können und mittels Comet Assay detektierbar sind. Nach 2 h führte NPro ab Konzentrationen > 1 mM zu einer Reduktionder Zellviabilität, welche mit ansteigenden Konzentrationen zunahm (s. Abb. 40 A). Auffällig war der rapide Abfall der Viabilität, der sich nach Behandlung von 10 mM messen ließ (vgl. Abb. 40 A).

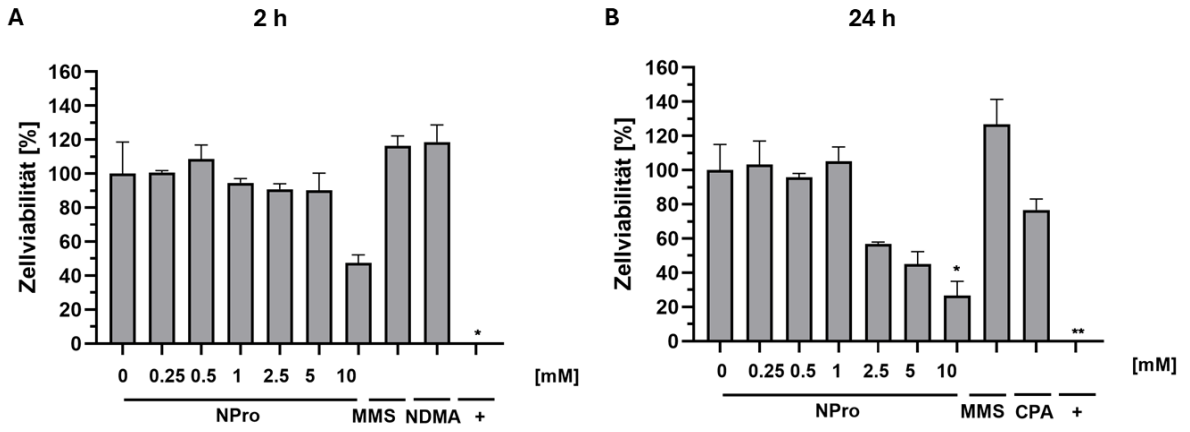

Abbildung 40: Effekt von NPro auf die Zellviabilität in PRH.
A Zellviabilität (y-Achse), nach 2 h Behandlung mit NPro, graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. **B** Zellviabilität (y-Achse) nach 24 h Behandlung mit NPro, graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. Als Positivkontrollen dienten 0.26 mM MMS, 5 mM NDMA, 1.8 mM CPA und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle DMEM, 1 g/l glucose, 10 % FKS, 1 % P/S (NNN) bzw 0.5 % DMSO (S-NNN) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; t-test.

Die Zellviabilitätlag nach Behandlung mit der höchstern Testkonzentration bei knapp unter 50 % (Abb. 40 A). Die Effekte waren zu schwach ausgeprägt, um eine EC_{50} abzuleiten. NPro zeigt nach 24 h deutliche zytotoxische Effekte, was anhand einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellviabilität erkennbar war (Abb. 40 B). Die Intensität induzierter zytotoxischer Effekte war für die Ableitung einer EC_{50} (4.2 mM) ausreichend.

4.2.7 Effekt von NMA

Um das Ausmaß zytotoxischer Effekte von NMA in PRH zu ermitteln, wurden diese mit aufsteigenden Konzentrationen (0 – 2.5 mM) behandelt. Hierbei war die höchste Konzentration aufgrund eingeschränkter Löslichkeit auf 2.5 mM begrenzt. Nach 24 h erfolgte die Messung mittels Zellviabilitätstest. NMA führt bereits ab 0.25 mM zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellviabilität in PRH (Abb. 41).

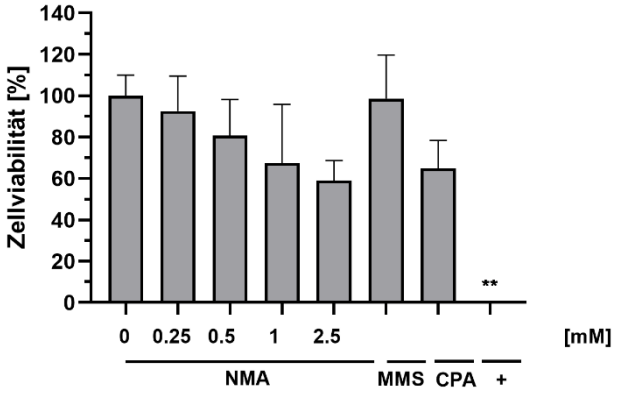

Abbildung 41: Effekt von NMA auf die Zellviabilität in PRH.
Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. Als Positivkontrollen dienten 0.26 µM MMS, 1.8 mM CPA und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (1 % DMSO) bezogen. **, $p < 0.01$; t-test.

Die Zellviabilität lag bis 2.5 mM über 50 %, weshalb keine EC_{50} abgeleitet werden konnte.

4.2.8 Effekt von NFA

PRH wurden mit aufsteigenden Konzentrationen NFA von 0 - 10 mM behandelt und für 24 h und 2 h inkubiert. Nach Behandlung von PRH mit NFA traten ab Konzentrationen > 0.5 mM zytotoxische Effekte auf (Abb. 42).

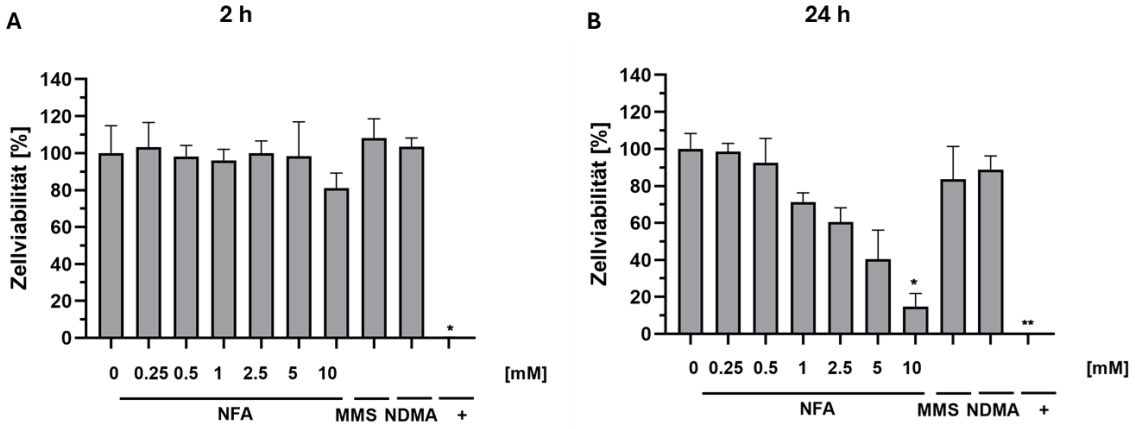

Abbildung 42: Effekt von NFA auf die Zellviabilität in PRH.
A Zellviabilität (y-Achse) nach Behandlung mit NFA für 2 h, graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse). **B** Zellviabilität (y-Achse) nach Behandlung mit NFA für 24 h graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse). Als Positivkontrollen dienten 0.26 mM MMS, 5 mM NDMA und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (DMEM, 1 g/l glucose, 10 % FKS, 1 % P/S) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; t-test.

10 mM NFA führte in PRH nach 2 h zu einer Abnahme der Zellviabilität um 20 % im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 42 A). Für die Evaluierung einer EC_{50} reichte der Grad der Effekte jedoch unter den gewählten Bedingungen nicht aus. Die höchste Test-

konzentration NFA führte nach 24 h zu einer um mehr als 80 % reduzierten Zellviabilität im Vergleich zu unbehandelten Zellen (vgl. Abb. 42 B). Zytotoxische Effekte spiegelten sich auch in den lichtmikroskopischer Aufnahmen wider, auf welchen starke Granularisierung und eine Reduktion lebender Zellen nach Behandlung mit 10 mM zu erkennen ist (s. Anhang A3.1.1). Nach Logarithmierung der Testkonzentrationen und mathematischer Modellierung konnte eine EC_{50} von 3.1 mM abgeleitet werden.

4.2.9 Effekt von NND

PRH wurden mit aufsteigenden Konzentrationen NND (0 - 500 µM) behandelt und für 24 h sowie für 2 h inkubiert. Danach wurden lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht (vgl. A3.1.1). Dann erfolgten jeweils Aufarbeitung und Messung zytotoxischer Effekte mittels Zellviabilitätstest. NND induzierte bereits nach 2 h starke zytotoxische Effekte (s. Abb. 43 A). Es ließ sich ein EC_{50} von 129 µM ermitteln. Während mittlere Konzentrationen NND kaum Einfluss auf die Zellviabilität in PRH nach 24 h Inkubation hatten, kam es nach Behandlung mit Konzentrationen > 100 µM zu einer um mehr als 90 %-igen Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 43 A)

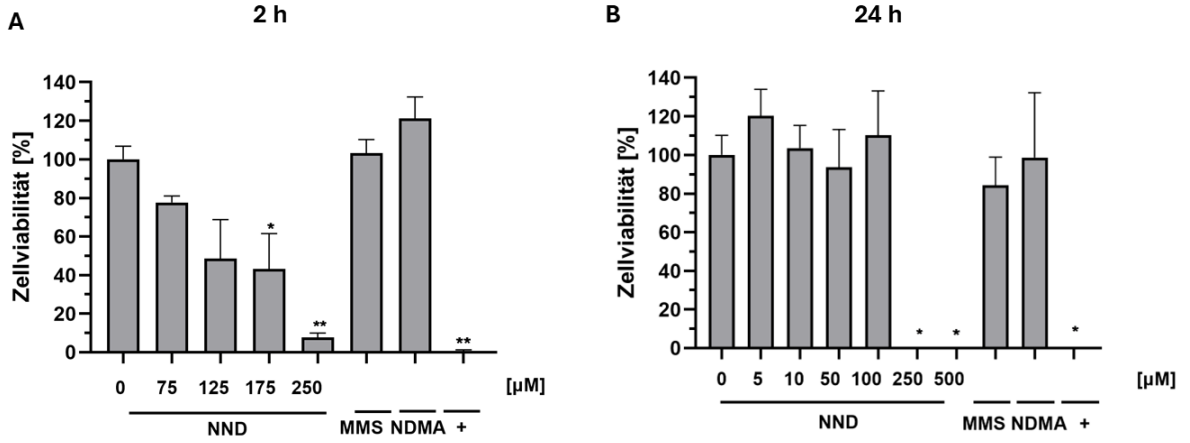

Abbildung 43: Effekt von NND auf die Zellviabilität in PRH.
A Zellviabilität (y-Achse) nach Behandlung mit NND für 2 h, graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse). **B** Zellviabilität (y-Achse) nach Behandlung mit NND für 24 h graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse). Als Positivkontrollen dienten 0.26 mM MMS, 5 mM NDMA und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % EtOH) bezogen.*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; t-test.

Es ließ sich eine EC_{50} von 209 µM berechnen (s. Abb. 43 B). Damit induziert NND zytotoxische Effekte im µM Bereich in PRH.

4.2.10 Effekt von NFluo

PRH wurden mit aufsteigenden Konzentrationen (0 - 500 µM) sowie 0 - 250 µM NFluo behandelt. Die Messung der Zellviabilität erfolgte nach 2 h und nach 24 h mittels Zellviabilitätstest. Nach 2 h Behandlung traten keinerlei zytotoxische Effekte in PRH auf (vgl. 44 A). Bereits geringe Konzentrationen der Substanz (5 µM, 10 µM) führen nach 24 h zu einer 30 %-igen Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 44 B).

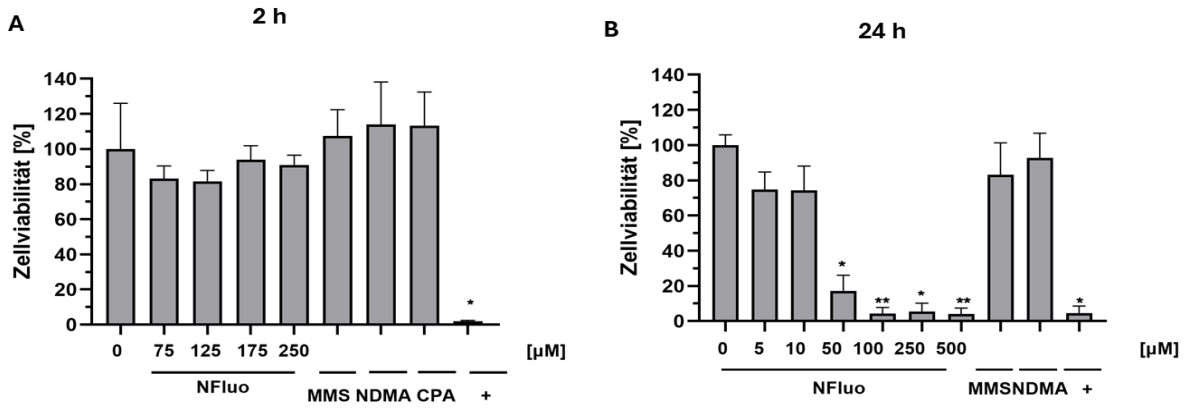

Abbildung 44: Effekt von NFluo auf die Zellviabilität in PRH.
A Zellviabilität (y-Achse) nach Behandlung mit NFluo für 2 h, graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse). **B** Zellviabilität (y-Achse) nach Behandlung mit NFluo für 24 h graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse). Als Positivkontrollen dienten 0.26 mM MMS, 5 mM NDMA und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % EtOH) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; t-test.

Das Ausmaß der durch NFluo induzierten zytotoxischen Effekte stieg rapide nach Behandlung mit Konzentrationen > 10 µM. So führten 50 µM NFluo zu einer um über 80 % reduzierten Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 44 B). Es ließ sich ein EC_{50} von 20 µM ermitteln.

4.2.11 Effekt von Fluo

Der selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitor Fluoxetin (Fluo) wurde mittels Zellviabilitätstest untersucht. PRH wurden mit aufsteigenden Konzentrationen Fluoxetin (Fluo) von 0 - 500 µM behandelt und für 24 h und für 2 h inkubiert. Dann erfolgten jeweils Aufarbeitung und Messung zytotoxischer Effekte von Fluo. Im Gegensatz zu *N*-Nitrosofluoxetin zeigte der selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitor Fluoxetin auch nach 2 h ab Konzentrationen > 10 µM bereits starke zytotoxische Effekte in PRH (vgl. Abb. 44 A, 45 A, EC_{50}: 38 µM).

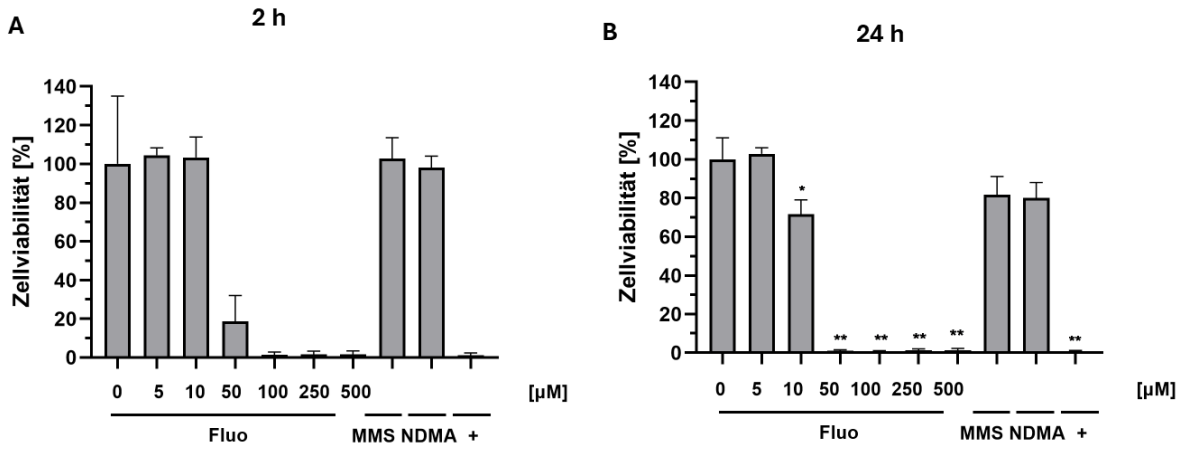

Abbildung 45: Effekt von Fluo auf die Zellviabilität in PRH.
A Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 2 h Inkubation. **B** Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. Als Positivkontrollen dienten 0.26 mM MMS, 5 mM NDMA und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; t-test.

Die Effekte waren nicht statistisch signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 45 A). Das ist vermutlich auf hohe Standardabweichungen zwischen biologischen Replikaten der Negativkontrolle zurückzuführen (Abb. 45 A). Messungen von Fluoxetin nach 24 h Behandlung zeigen starke zytotoxische Effekte bereits bei Konzentrationen > 10 µM, die statistisch signifikant waren (Abb. 45 B). Nach Logarithmierung der Konzentrationen und mathematischer Modellierung konnte eine EC_{50} von 10 µM bestimmt werden.

4.2.12 Zusammenfassung der Zytotoxizitätsdaten in PRH nach Behandlung mit strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen

Tabelle 19: Nach mathematischer Modellierung erhaltene EC_{50}-Werte in PRH

Testsubstanzen	EC_{50} 24h [mM]	EC_{50} 2h [mM]
Methylmethansulfonat (MMS)	0.26	n.d.
Cyclophosphamid (CPA)	> 8	n.d.
N-Nitrosodimethylamin (NDMA)	> 10	n.d.
N-Methyl-*N*-Nitroso-tert-butylamin (NMtBu)	> 10	n.d.

N-Methyl-*N*-Nitroso-iso-propylamin (NMIPA)	> 10	n.d.
(*S*)-*N'*-Nitrosonornikotin (S-NNN)	> 10	n.d.
N-Nitrosomethylanilin (NMA)	> 2.5	n.d.
N-Nitrosodiethanolamin (NDELA)	> 10	n.d.
N-Nitrosoprolin (NPro)	4.2	9.7
N-Nitrosofolsäure (NFA)	3.1	> 10
N-Nitrosodesloratadin (NND)	0.21	0.13
N-Nitrosofluoxetin (NFluo)	0.02	> 0.25
Fluoxetin (Fluo)	0.01	0.04

n.d. = nicht detektiert.

Unter den zehn getesteten Substanzen waren fünf *N*-Nitrosamine nicht zytotoxisch, darunter NDMA, NDELA, S-NNN, NMtBu und NMIPA (vgl. Abb. 37 - 39, Tab. 19). NMA, NPro und NFA hingegen zeigten zytotoxische Effekte mittlerer Ausprägung (vgl. Abb. 40-42, Tab. 19). NPro, NFA, NND, NFluo und Fluo wurden auch nach 2 h getestet, um zytotoxische Effekte zu detektieren, die für die Interpretation des Comet Assays zu berücksichtigen sind (s. Tab. 19). Für NPro konnte eine EC_{50} von 9.7 mM ermittelt werden (vgl. Tab. 19). Für NFA konnten nach 2 h keine zytotoxischen Effekte detektiert werden (s. Tab. 19). Wegen des eingeschränken Testkonzentrationsbereiches von NMA aufgrund von Präzipitation ließ sich keine EC_{50} ermitteln (s. Tab. 19). NND und NFluo sowie Fluo sind stark zytotoxische Substanzen (vgl. Abb. 43 - 45, Tab. 19). Wegen des für NND ungeeigneten Messzeitpunktes, der nach 24 h in einem rapiden Abfall der Zellviabilität ab Konzentrationen > 100 mM resultierte, wurde die Messung der Zytotoxizität nach 2 h unter Anpassung des Testbereiches mit engeren Konzentrationsstufen wiederholt (s. Abb. 43 B, 43 A). Mittels mathematischer Modellierung konnte für diese Substanz eine EC_{50} im mikromolaren Bereich ermittelt werden (EC_{50} 129 µM, s. Tab. 19). Für NFluo war eine EC_{50} von 0.02 mM nach 24 h ermittelbar (s. Tab. 19). Nach 2 h traten keinerlei zytotoxische Effekte auf (vgl. Abb. 44 A). Die nicht nitrosierte Ausgangssubstanz Fluo zeigte dagegen sowohl nach 24 h als auch bereits nach 2 h starke zytotoxische Effeke (s. Abb. 45 A, 45 B,

Tab. 19). So ließ sich nach 2 h eine EC_{50} von 38 µM und nach 24 h eine EC_{50} von 10 µM ermitteln (vgl. Tab. 19).

4.3 Untersuchung der Genotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in PRH mittels Comet Assay

Für den Comet Assay wurden die Zellen nach 2 h inkubation geeerntet. Da es sich bei der verwendeten Positivkontrolle MMS um eine direkt wirkende alkylierende Verbindung handelt und demzufolge zelluläre Reparaturprozesse der durch MMS induzierte Schäden rasch einsetzen, wurde für die Behandlung eine Dauer von 1 h gewählt. Das Zellpellet wurde mit PBS resuspendiert und in LMP aufgenommen. Nach Auftragung des Agarosezellgemisches auf Objektträger wurden die Zellen für 1 h in Lysepuffer inkubiert. Nach 25-minütiger Denaturierung mit alkalischem Elektrophoresepuffer folgte eine Elektrophorese für 15 Minuten. Schließlich wurden die Zellkerne mittels Neutralisationspuffer neutralisiert und mit Ethanol fixiert. Unmittelbar vor der mikroskopischen Auswertung wurden die Zellkerne mit 50 µL Propidiumiodid gefärbt.

4.3.1 Effekte von NDMA und NDELA

Zur Untersuchung genotoxischer Effekte wurden PRH nach dreistündiger Anwachszeit mit aufsteigenden Konzentrationen NDMA (0 - 10 mM) und NDELA (0 - 10 mM) behandelt. Die im Zellviabilitätstest nach mathematischer Modellierung ermittelten EC_{50} Werte von MMS (0.26 mM) und CPA (1.8 mM) wurden als Positivkontrollen verwendet. Dann erfolgten Aufarbeitung und Messung mittels Comet Assay. Die höchste Testkonzentration NDMA führte nach zweistündiger Inkubation von PRH zu einem statistisch signifikanten, 3.65-fachen Anstieg der medianbasierten Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 46).

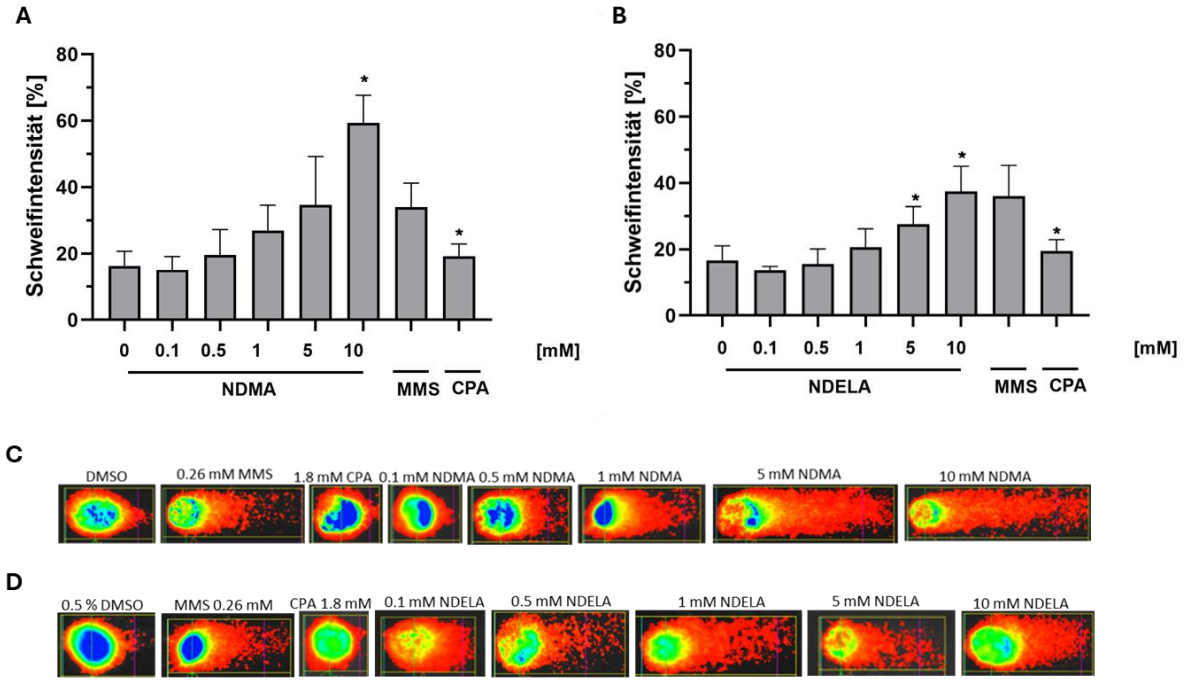

Abbildung 46: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDMA und NDELA in PRH.
A Schweifintensität [%] von NDMA nach 2 h Inkubation. **B** Schweifintensität [%] von NDELA nach 2 h Inkubation. **C** Repräsentative Bilder von Zellen nach 2 h Inkubation mit NDMA und Datenverarbeitung mit Comet IV. **D** Repräsentative Bilder von Zellen nach 2 h Inkubation mit NDELA und Datenverarbeitung mit Comet IV. 0.26 mM MMS und 1.8 mM CPA dienten als Positivkontrollen, 0.5 % DMSO diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden 1 h lang mit MMS behandelt. Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen aus n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; t-test.

Auch für NDELA konnte eine konzentrationsbhängige Zunahme der Schweifintensität gemessen werden, die nach Behandlung mit 5 mM und 10 mM statistisch signifikant war (s. Abb. 46 B). Mit einem maximalen medianbasierten Schweifintensitätsunterschied von 2.2 im Vergleich zur Negativkontrolle war der strangbruchinduzierende Effekt jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als für NDMA (vgl. abb. 46 A). Für MMS waren ebenfalls deutliche strangbruchinduzierende Effekte messbar (s. Abb. 46 A, B). Für CPA hingegen waren die Effekte minimal ausgeprägt (vgl. Abb. 46 A, B). Daher wurden für weitere Experimente 5 mM NDMA als zweite Positivkontrolle eingesetzt (vgl. Abschnitte 4.3.2 - 4.3.6).

4.3.2 Effekte von NMtBu und NMIPA

Zur Untersuchung genotoxischer Effekte von NMtBu und NMIPA wurden PRH mit Konzentrationen im Bereich von 0 - 10 mM behandelt und nach 2 h mittels Comet Assay aufgearbeitet. NMtBu führte zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der medianbasierten Schweifintensität, wobei keine statistisch signifikanten Effekte messbar waren (Abb. 47 A).

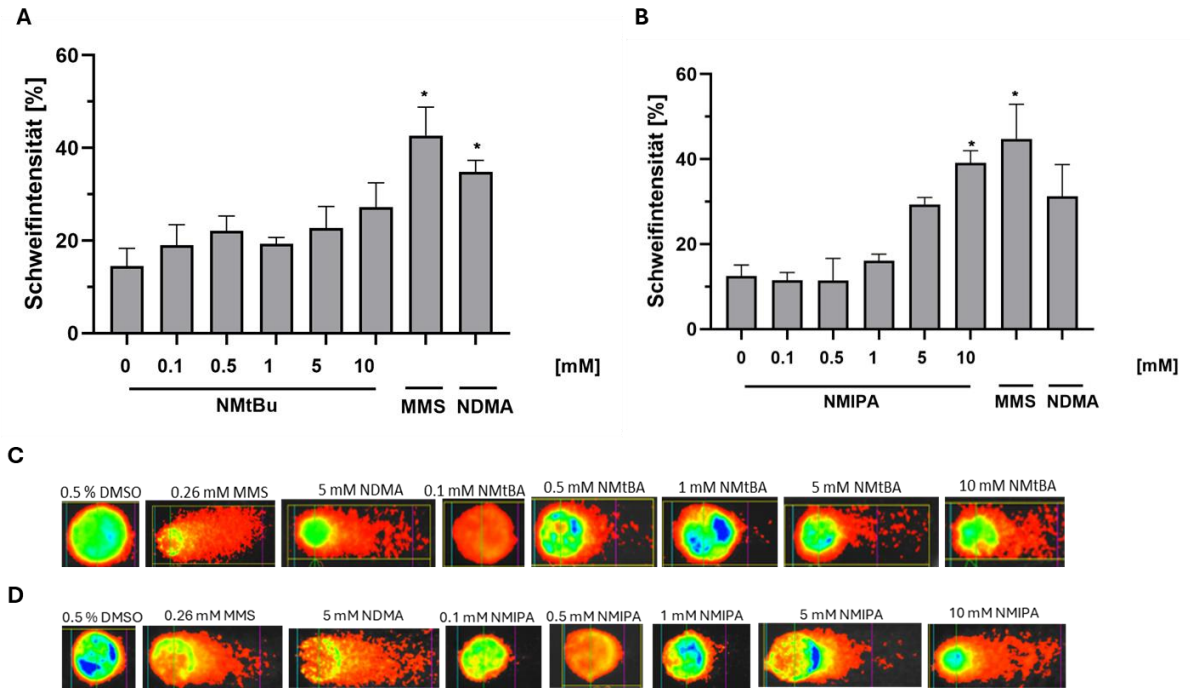

Abbildung 47: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NMtBu und NMIPA in PRH.
A Schweifintensität [%] von NMtBu nach 2 h Inkubation. **B** Schweifintensität [%] von NMIPA nach 2 h Inkubation. **C** Repräsentative Bilder von Zellen nach 2 h Inkubation mit NMtBu und Datenverarbeitung mit Comet IV. **D** Repräsentative Bilder von Zellen nach 2 h Inkubation mit NMIPA und Datenverarbeitung mit Comet IV. 0.26 mM MMS und 5 mM NDMA dienten als Positivkontrollen, 0.5 % DMSO diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden 1 h lang mit MMS behandelt. Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen aus n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; t-test.

Die maximale medianbasierte Schweifintensität konnte nach Behandlung mit 10 mM gemessen werden und lag bei 1.9 (s. Abb. 47 A). NMIPA führte ebenfalls zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der medianbasieren Schweifintensität, die nach Behandlung mit 10 mM einen maximalen Anstieg von 3.1 im Vergleich zur Negativkontrolle zur Folge hatte (vgl. Abb. 47 B). NDMA und MMS führten zu deutlichen strangbruchinduzierenden Effekten, wobei für MMS statistische Signifikanz messbar war (s. Abb. 47 A, B).

4.3.3 Effekte von NNN und S-NNN

Zur Untersuchung genotoxischer Effekte von racemischen NNN und S-NNN wurden PRH mit Konzentrationen im Bereich von 0 - 10 mM behandelt. NNN führte nach 2 h zu keinen strangbruchinduzierenden Effekten in PRH (Abb. 48 A).

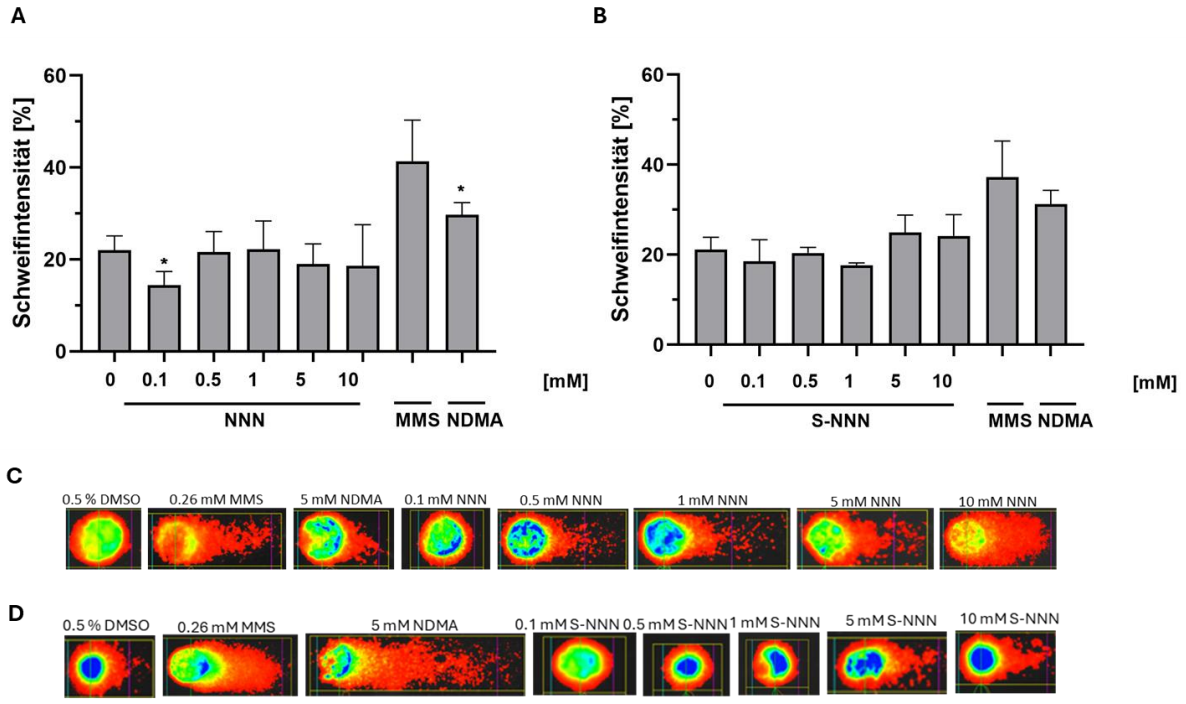

Abbildung 48: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NNN und S-NNN in PRH.
A Schweifintensität [%] von NNN nach 2 h Inkubation. **B** Schweifintensität [%] von S-NNN nach 2 h Inkubation. **C** Repräsentative Bilder von Zellen nach 2 h Inkubation mit NNN und Datenverarbeitung mit Comet IV. **D** Repräsentative Bilder von Zellen nach 2 h Inkubation mit S-NNN und Datenverarbeitung mit Comet IV. 0.26 mM MMS und 5 mM NDMA dienten als Positivkontrollen, 0.5 % DMSO diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden 1 h lang mit MMS behandelt. Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen aus n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; t-test.

NDMA hingegen hatte einen statistisch signifikanten, strangbruchinduzierenden Effekt im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 48 A). Es konnten keine strangbruchinduzierenden Effekte von S-NNN in PRH gemessen werden (vgl. Abb. 48 B).

4.3.4 Effekte von NPro und NMA

PRH wurden mit aufsteigenden Konzentrationen NPro (0 - 10 mM) und NMA (0 - 2.5 mM) behandelt. Für den Comet Assay wurden die Zellen nach 2 h inkubation geerntet. NPro führte zu einem leichten Anstieg der medianbasierten Schweifintensität (Abb. 49 A).

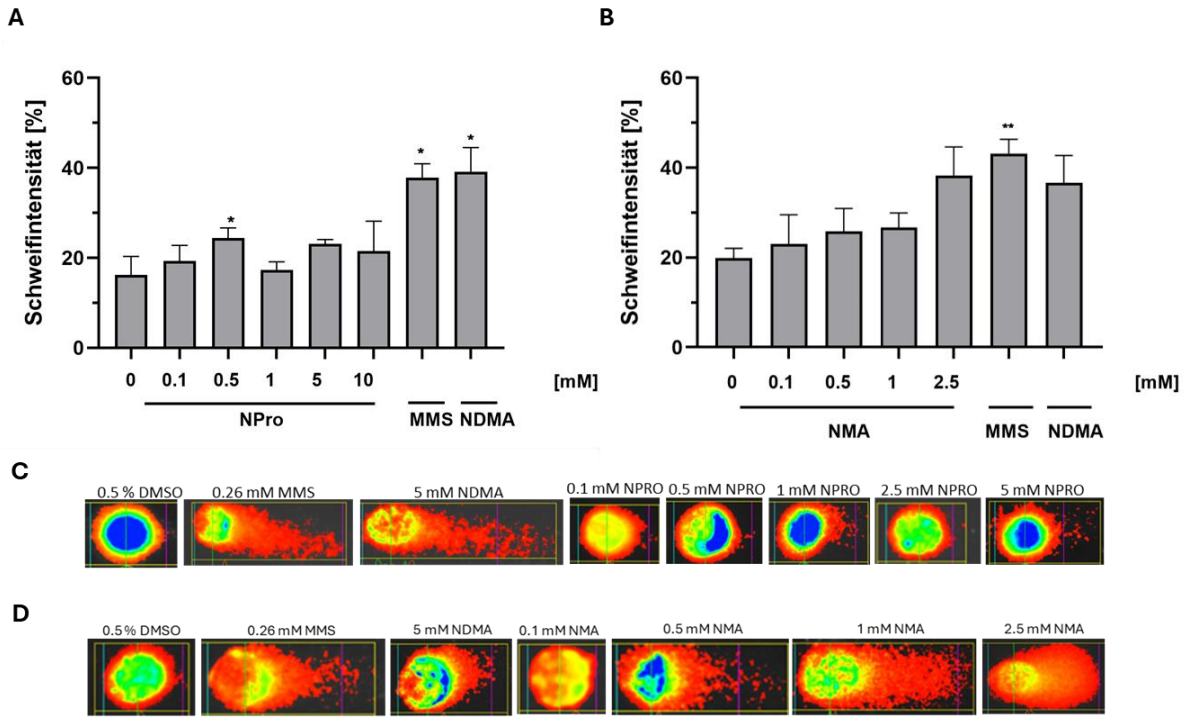

Abbildung 49: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NPro und NMA in PRH.
A Schweifintensität [%] von NPro nach 2 h Inkubation. **B** Schweifintensität [%] von NMA nach 2 h Inkubation. **C** Repräsentative Bilder von Zellen nach 2 h Inkubation mit NPro und Datenverarbeitung mit Comet IV. **D** Repräsentative Bilder von Zellen nach 2 h Inkubation mit NMA und Datenverarbeitung mit Comet IV. 0.26 mM MMS und 5 mM NDMA dienten als Positivkontrollen, 0.5 % DMSO diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden 1 h lang mit MMS behandelt. Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen aus n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen.*, $p < 0.05$;**, $p < 0.01$; t-test.

Nach Behandlung mit 0.5 mM war der messbare strangbruchinduzierende Effekt maximal und lag bei 1.5 im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 49 A). Die 2 h Behandlung mit NMA führte in einer konzentrationsabhängigen Weise zu einem Anstieg der medianbasierten Schweifintensität, der sich in einem mit 1.9-fach maximal ausgeprägten Anstieg im Vergleich zur Negativkontrolle äußerte und nach Behandlung mit 2.5 mM auftrat (vgl. Abb. 49 B). Dieses Resultat spiegelte sich in den repräsentativen Bildern nach Datenprozessierung wider (s. Abb. 49 D).

4.3.5 Effekte von NFA und NND

PRH wurden mit aufsteigenden Konzentrationen NFA (0 - 10 mM) und NND (0 - 175 µM) behandelt. Für den Comet Assay wurden die Zellen nach 2 h (MMS 1 h) Inkubation geerntet und aufgearbeitet. Das DNA-Strangbruchlevel nach Behandlung mit NFA blieb unverändert niedrig und ähnelt dem der Negativkontrolle (Abb. 50 A).

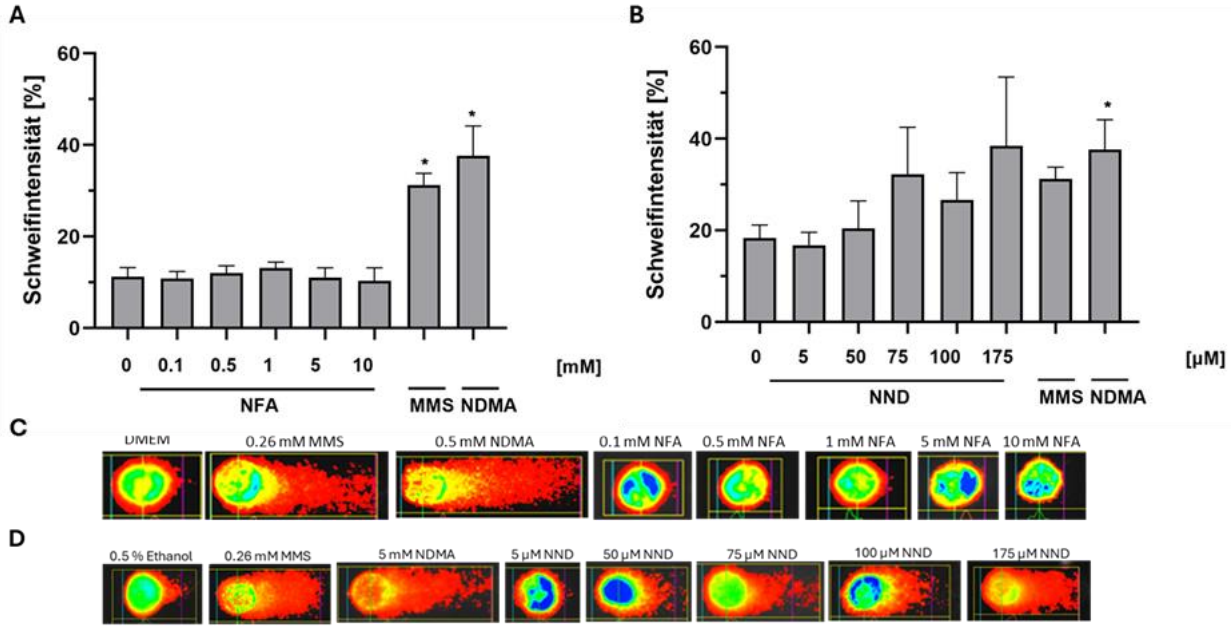

Abbildung 50: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NFA und NND in PRH.
A Schweifintensität [%] von NFA nach 2 h Inkubation. **B** Schweifintensität [%] von NND nach 2 h Inkubation. **C** Repräsentative Bilder von Zellen nach 2 h Inkubation mit NFA und Datenverarbeitung mit Comet IV. **D** Repräsentative Bilder von Zellen nach 2 h Inkubation mit NND und Datenverarbeitung mit Comet IV. 0.26 mM MMS und 5 mM NDMA dienten als Positivkontrollen, DMEM, 1 g/l glucose, 10 % FKS, 1 % P/S (NFA) und 0.5 % EtOH (NND) dienten als Negativkontrollen. Die Zellen wurden 1 h lang mit MMS behandelt. Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen pro Experiment. Dargestellt ist der Mittelwert der Mediane aus insgesamt 3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrollen (DMEM, 1 g/l glucose, 10 % FKS, 1 % P/S und 0.5 % EtOH) bezogen. *, $p < 0.05$; t-test.

Der stärkste Effekt äußerte sich in einem 1.2-fach induziertem Anstieg der medianbasierten Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle nach Behandlung mit 1 mM (vgl. Abb. 50 A). NND zeigte hingegen deutliche Effekte auf das DNA-Strangbruchlevel in PRH (s. Abb. 50 B). Ein mit 2.1-fach maximal ausgeprägter Anstieg der medianbasierten Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle konnte nach Behandlung mit 175 µM NND gemessen werden (s. Abb. 50 B). Für die Interpretation der Ergebnisse muss jedoch die starke Reduktion viabler Zellen um fast 60 % im Vergleich zur Negativkontrolle, die nach 2 h auftrat, berücksichtigt werden (Abb. 50 B). Augrund hoher Standardabweichungen zwischen einzelnen biologischen Replikaten waren die Ergebnisse nicht statistisch signifikant (vgl. Abb. 50 B). Wie zuvor beobachtet führten MMS und NDMA zu einer starken Induktion des DNA-Strangbruchlevels (vgl. Abb. 50 A, B).

4.3.6 Effekte von NFluo und Fluo

PRH wurden mit aufsteigenden Konzentrationen NFluo (0 - 500 µM) und Fluo (0 - 50 µM) behandelt. Nach 2 h (MMS 1 h) erfolgten Ernte und Aufarbeitung mittels Comet Assay. Das NDSRI NFluo zeigte sehr starke strangbruchinduzierende Effekte in PRH (s. Abb. 51 A).

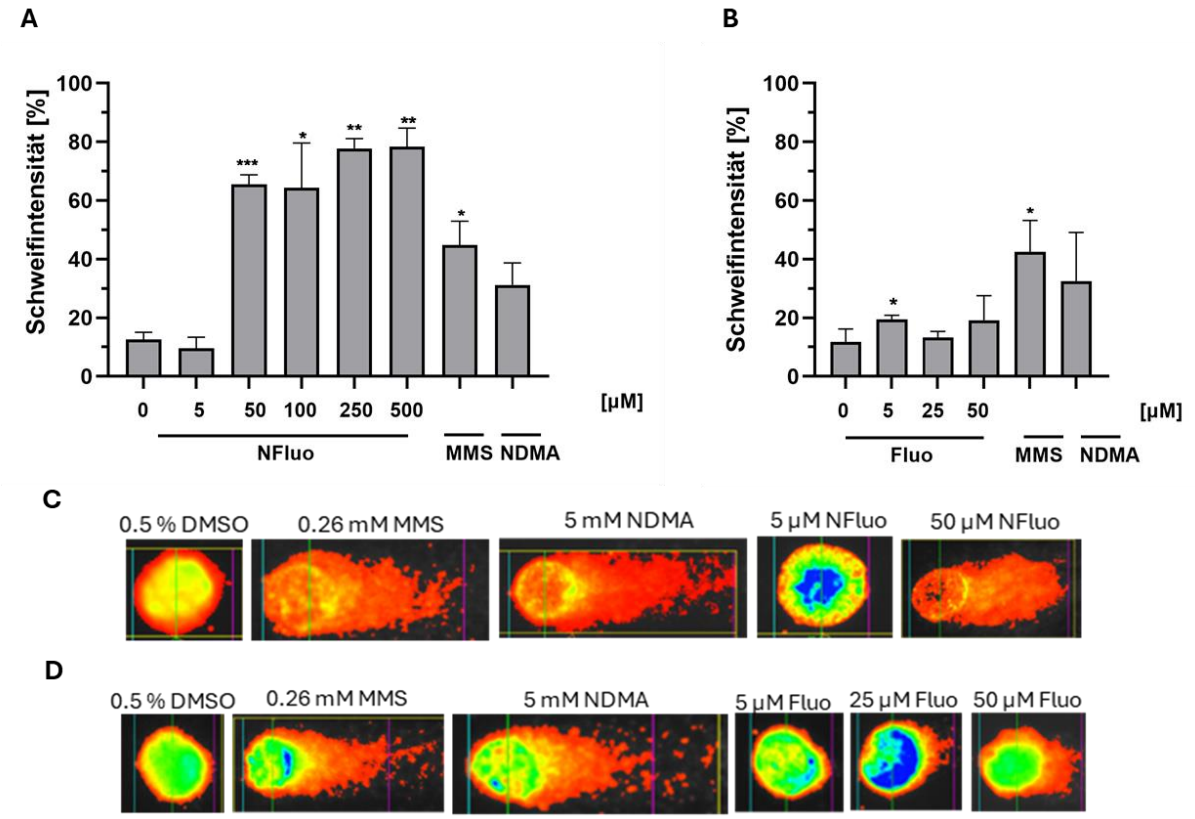

Abbildung 51: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NFluo und Fluo in PRH.
A Schweifintensität [%] von NFluo nach 2 h Inkubation. **B** Schweifintensität [%] von Fluo nach 2 h Inkubation. **C** Repräsentative Bilder von Zellen nach 2 h Inkubation mit NFluo und Datenverarbeitung mit Comet IV. **D** Repräsentative Bilder von Zellen nach 2 h Inkubation mit Fluo und Datenverarbeitung mit Comet IV. 0.26 mM MMS und 5 mM NDMA dienten als Positivkontrollen, 0.5 % DMSO diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden 1 h lang mit MMS behandelt. Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen pro Experiment. Dargestellt ist der Mittelwert der Mediane aus insgesamt 3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; t-test.

So führten bereits Konzentrationen > 5 µM zu einem starken Anstieg der Schweifintensität (vgl. Abb. 52 A). Behandlung mit der höchsten Konzentration (500 µM) führte zu einem im Vergleich zur Negativkontrolle nahezu 7.5-fach ausgeprägten Anstieg der medianbasierten Schweifintensität (s. Abb. 51 A). Die nicht nitrosierte Form induzierte nach 2 h ebenfalls Strangbrüche in PRH (s. Abb. 51 B). Das Ausmaß der Strangbruchformation war schwach, trat jedoch bereits nach Behandlung mit niedrigen Konzentrationen (5 µM) auf (vgl. Abb. 51 B).

4.3.7 Zusammenfassung der Comet Assay Daten in PRH nach Behandlung mit strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen

Tabelle 20: Maximale medianbasierte Schweifintensitätsunterschiede in PRH

Testsubstanzen	Maximaler medianbasierter Schweifintensitätsunterschied
NDMA	3.7
NMtBu	1.9
NMIPA	3.1
S-NNN	1.2 (5 mM)*
NMA	1.9
NDELA	2.2
NPro	1.5 (5 mM)*
NFA	1.2 (1 mM)*
NND	2.1 (0.175 mM)*
NFluo	6.3
Fluo	1.7 (5 µM)*

*: Von maximalen Testkonzentrationen abweichende Konzentrationen, die in maximalen medianbasierten Schweifintensitätsunterschieden im Vergleich zur Negativkontrolle resultierten, sind in Klammern angegeben.

Vier der zehn getesteten Verbindungen zeigten einen mehr als zweifachen Anstieg des jeweils höchsten gemessenen medianbasierten Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle, darunter NDMA (3.7), NDELA (2.2), NMIPA (3.1) und NFluo (6.3) (s. Tab. 20, Abb. 46, Abb. 47, Abb. 51). Auch NND induzierte einen mehr als 2-fachen Anstieg der medianbasierten Schweifintensität bei 175 µM. Aufgrund der ausgeprägten Zytotoxizität ab 129 µM konnte dieser Effekt nicht eindeutig als Alkylierungsschaden interpetiert werden (vgl. Tab. 19, Tab. 20, Abb. 50). Für NFA, S-NNN, NMA, NMtBu, Fluo und NPro konnten im gewählten Zellmodell mit medianbasierten Schweifintensitätsunterschieden < 2 im Vergleich zur Negativkontrolle keine eindeutig strangbruchinduzierenden Effekte

mittels alkalischem Comet Assay gemessen werden (vgl. Tab. 20, Abb. 47, Abb. 48, Abb. 49, Abb. 50, Abb. 51).

4.3.8 BMD Modelling der mittels Comet Assay erhobenen Daten

Die mittels Comet Assay erhobenen Genotoxizitätsdaten wurden einem BMD Modelling unterzogen, für welches unter anderem die proast software Version 70.3 genutzt wurde, um ein Potency Ranking der untersuchten Nitrosamine durchzuführen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Dies erfolgte durch Anke Londenberg am Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin in Hannover. Die BMR ist definiert als die prozentuale Veränderung mittlerer Schweifintensitätswerte im Vergleich zur Negativkontrolle und gleichzusetzen mit der kritischen Effektgröße (CES) (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). NFluo war sowohl unter Berücksichtigung mean-, als auch medianbasierter Daten die am stärksten wirkende Substanz im gewählten Leberzellmodell, unabhängig vom zugrunde liegenden CES (s. Tab. 21, Abb. 51). Geschätzte obere und untere BMD Konfidenzintervalle sowie der BMD_{median} (BMDu, BMDl, BMD_{median}) nach Modellmittelung für CES_{50} und CES_{100} für alle in PRH signifikant positiv getesteten Verbindungen sind in nachfolgender Tabelle dargestellt (s. Tab. 21, Djuari & Londenberg *et al.*, 2023).

Tabelle 21: BMD Konfidenzintervalle (BMD CIs) BMDl, BMDu und BMDmedian in PRH.
BMD Modelling durchgeführt von Anke Londenberg, Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM), Hannover. Modifiziert nach Djuari & Londenberg *et al.*, 2023.

Substanz	BMDl [mM]	BMDu [mM]	BMD_{median} [mM]	CES
NDMA	0.0702	8.1	2.61	0.5
	0.398	9.92	4.68	1.0
NDELA	0.277	7.93	3.1	0.5
	1.25	12.1	6.22	1.0
NFluo	0.00443	0.0253	0.0106	0.5
	0.00559	0.0312	0.0143	1.0
NMIPA	0.127	6.59	2.2	0.5
	0.534	8.54	3.98	1.0

In PRH erfüllten NDMA, NFluo, NDELA und NMIPA die Kriterien, die für ein Ranking des strangbruchinduzierenden Potentials mithilfe des BMD Verfahrens Vorraussetzung sind (vgl. Abschnitt 4.3.7, Tab. 20, Abschnitt 4.3.8, Tab. 21), Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Bei der Interpretation der Datenverteilung von NFluo und NMIPA ist zu berücksichtigen, dass die logarithmische Normalverteilung der Schweifintensität nicht klar angenommen werden konnte (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). So gab es im unteren Konzentrationsbereich beider Substanzen mehrere Ausreißer (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die geschätzte BMD_{100} von NFluo ist durch den gewählten Konzentrationsbereich nicht gut abgedeckt (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Zusätzliche Daten zwischen Negativkontrolle und der entsprechenden Konzentration NFluo wären hilfreich zur Schätzung und Modellierung der Dosis-Wirkungsbeziehung (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Da die CES_{SD}, die die gepoolte Varianz innerhalb der Gruppe gewählter Testsubstanzen widerspiegelt, in PRH bei mindestens 50 % lag und zwischen mean-, und medianbasierten Daten variierte, empfahl sich die CES_{100} für die vergleichende Untersuchung der Wirksamkeit der Testsubstanzen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Slob *et al.*, 2017). Die CES_{50} beschreibt eine 50 %-ige Steigerung der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle, während die CES_{100} die Konzentration angibt, welche in einer Verdopplung der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle resultiert (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Zeller *et al.*, 2017). Die auf CES_{100} basierenden BMD CI Werte waren für alle getesteten Substanzen größer als die auf CES_{50} basierenden Werte (vgl. Tab. 21, Djuari & Londenberg *et al*, 2023). Die BMD Modellierung ermöglichte ein Potency Ranking von NDMA, NDELA, NFluo und NMIPA in PRH, welches in Abbildung 52 A dargestellt ist (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Abb. 52 A). Für NDMA, NMIPA und NDELA ermöglichten die Daten aufgrund großer Unsicherheiten der BMD CIs keine Unterscheidung hinsichtlich des DNA-strangbruchinduzierenden Potentials (vgl. Abb. 52 A, Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Das Ranking ergab zusammenfassend folgendes Ergebnis: NFluo > NDMA/NDELA/NMIPA (s. Tab. 21, Abb. 52 A). Unter den zehn getesteten Verbindungen waren vier Nitrosamine positiv: NDMA, NDELA, NMIPA und NFluo (s. Tab. 21, Abb. 52 A). Schließlich konnte mithilfe der BMD Modellierung eine Bewertung der Sensitivität und Spezifität der PRH für die getesten Verbindungen erfolgen, wobei vier der zehn Substanzen, für die es keine Daten in der Literatur gibt, von der Bewertung

ausgeschlossen wurden (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Unter den Substanzen sind NDMA, NDELA, NMA, S-NNN bekannte Nagerkanzerogene (IARC, 1978; Schmähl *et al.*, 1976; Lijinsky *et al,* 1984; Thomas *et al.,* 2024; Knasmüller *et al.*, 1986; Liu *et al.*, 2008; Preussmann *et al.*, 1982; Hecht *et al.*, 1989; Guttenplan *et al.*, 2019; Padma *et al.*, 1989; Druckrey *et al.*, 1967). Da nur zwei der vier als solche erkannt wurden, ließ sich eine Sensitivität von 50 % ermitteln. NMtBu und NPro sind bekanntermaßen nicht kanzerogen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Nixon *et al.*, 1976; Mirvish *et al.*, 1987). Die Testung in PRH zeigte in diesem Zusammenhang keine Abweichung, weshalb eine Spezifität von 100 % erzielt werden konnte. Unter den vier Verbindungen, für die bisher wenig Daten hinsichtlich des kanzerogenen Potentials existieren, NMIPA sowie den NDSRIs NND, NFluo und NFA wurden mit NFluo und NMIPA zwei Substanzen positiv getestet (vgl. Tab. 21, Abb. 52 A). Schließlich erfolgte ein Sensitivitätsranking von PRH, PHH, HepG2 + Ratten S9 Mix, HepG2 + Hamster S9 Mix und PCLIS hinsichtlich der Detektion des genotoxischen Potentials anhand der in allen Zellmodellen positiv getesten Substanz NDMA (vgl. Abb. 52 B Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Das Ranking basiert auf den CES_{100}, da dieser präzisere BMD CIs ergibt als der CES_{50} (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Bei Grenzwert Effekten kann es zur Clusterung zwischen Maximum und Minimum kommen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In diesem Fall sind medianbasierte Daten robuster, da sie weniger sensitiv gegenüber diesen Effekten sind (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Auch für geringe Konzentrationen sowie für die die Negativkontrolle konnte bereits in vorherigen Experimenten gezeigt werden, dass meanbasierte Daten fehleranfälliger gegenüber Varianzen und Ausreißern sind als medianbasierte Daten (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Um eine finale Entscheidung zu treffen, ob mean-, oder medianbasierte Daten für die Analyse verwendet werden, sind weitere Daten erforderlich (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Da alle PCLIS aus einem Donor stammten und interindividuelle Unterschiede daher nicht berücksichtigt werden, wurden diese aus dem Ranking ausgeschlossen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die Reihenfolge der Testsensitivität war letztendlich PHH > HepG2/PRH und ist in Abbildung 52 B dargestellt (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023, vgl. Abb. 52 B). Zwischen PRH, den mit Ratten S9 Mix und mit Hamster S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen war keine Unterscheidung in Bezug auf Testsensititvität ermittelbar (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023, s. Abb. 52).

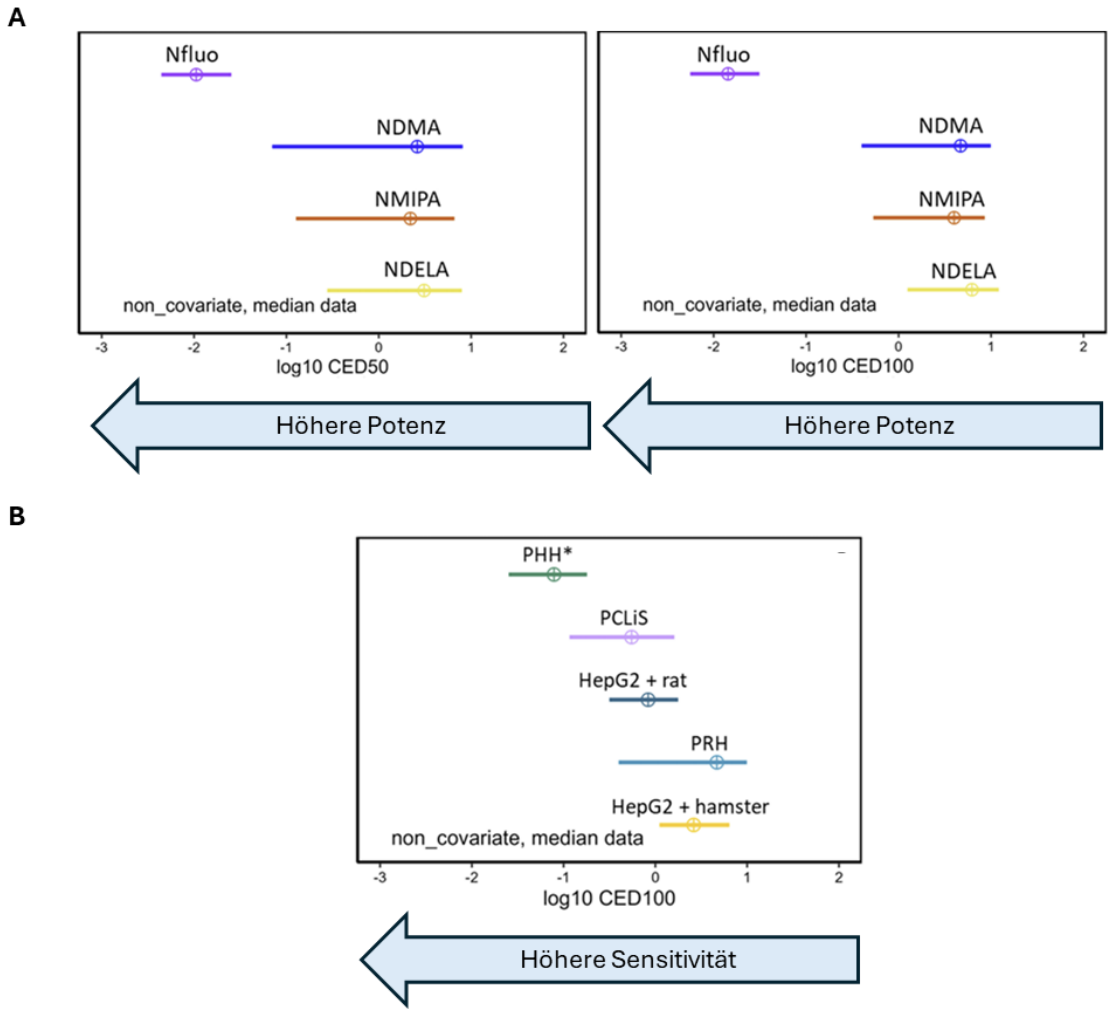

Abbildung 52: BMD Modellierung der positiv getesteten N-Nitrosamine
Auftragung des medianbasierten CI/BMD Wertes anhand einer log10 Skala. Gezeigt ist die CES_{100}. Links jeder Linie ist der BMDl und rechts jeder Linie der BMDu. Der Median BMD Wert ist in Form eines Kreises dargestelt. **A** Potency Ranking der im alkalischen Comet Assay positiv getesteten *N*-Nitrosamine NDMA, NFluo, NDELA und NMIPA in PRH. Geschätzte beideitige 90 % Konfidenzintervalle und Median BMD nach Modellmittelung basierend auf CES_{50} und CES_{100}. Gezeigt sind die medianbasierten Schweifintensitätsdaten. B Sensitivitätsranking von NDMA in PHH, PCLIS, HepG2+Ratten S9 Mix, PRH, HepG2 + Hamster S9 Mix. BMD Modellierung durchgeführt von Anke Londenberg, Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM), Hannover. Modifiziert nach Djuari & Londenberg *et al.*, 2023.

4.3.9 Vergleich des Comet Assays mit dem Ames Test hinsichtlich der Prädiktivität der Vorhersage des genotoxischen und mutagenen Potentials strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine

Die mithilfe des Comet Assays erhobenen Daten wurden schließlich genutzt, um die Prädiktivität hinsichtlich der Vorhersage des genotoxischen und mutagenen Potentials der Nitrosamine mit dem innerhalb des EMA Projektes optimierten Ames Preinkubationstest zu vergleichen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Für sechs der zehn getesteten Substanzen existieren Tumordaten, darunter sind NDMA, NDELA, S-NNN, NNN und NMA bekannte Nagerkarzinogene und NMtBu sowie NPro bekannte Nicht-

Kanzerogene (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die Bewertung der Prädiktivität basiert auf der Untersuchung dieser Verbindungen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). S-NNN und NNN werden als eine Substanz bewertet (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). Innerhalb des EMA Projektes wurde der Ames Preinkubationstest unter Verwendung von nicht induziertem 30 % (v/v) Hamster S9 Mix und einer Vorinkubationszeit von 30 Minuten bei 30 °C, einer Inkubationszeit von 72 h +/- 2 h bei 37 °C und Verwendung der fünf Teststämme S. Typhimurium TA1535, TA1537, TA98, TA100 und E.coli WP2uvrA für die vergleichende Gegenüberstellung mit dem Comet Assay herangezogen, wobei auch Bakterienstammspezifische Positivkontrollen gemäß der aktuellen Version der OECD 471 mitgeführt wurden (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Damit entsprach das gewählte Testsetting dem von der EMA publizierten EAT Protokoll (Djuari & Londenberg *et al*., 2023; EMA, 2023). Im Vergleich zum EAT Protokoll der EMA wurden jedoch für die vergleichende Gegenüberstellung der Prädiktivität mit dem Comet Assay die beiden Teststämme TA100 und TA1537 zusätzlich angewendet (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). NPro wurde in allen Leberzellmodellen und im Ames Test negativ getestet (Djuari & Londenberg *et al*. 2023). In den beiden HepG2 Zelllinien wurde NMtBu positiv getestet, was in einer Testspezifität von 50 % resultierte (Djuari & Londenberg *et al*. 2023). In allen anderen Zellsystemen innerhalb des Comet Assays und des Ames Testes wurde NMtBu negativ getestet, was in einer Spezifität von 100 % resultierte (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). Da in mit Hamster S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen alle bekannten Nagerkarzinogene als solche erkannt wurden, konnte die Sensitivität mit 100 % bewertet werden (Djuari & Londenberg *et al*. 2023). Zudem wurden NMIPA, NND, NFluo und NMtBu in diesem Zellmodell positiv getestet (M. Djuari & Londenberg *et al*., 2023). In mit Ratten S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen wurde nur NDMA als positiv erkannt, weshalb die Sensitivität mit 25 % bewertet wurde (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). In PRH und PHH wurden S-NNN und NMA im Comet Assay nicht als positiv erkannt (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). Daraus resultierte eine Sensitivität von 50 % für diese beiden primären Zell-modelle (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). PHHs konnten alle Nitrosamine hinsichtlich ihres genotoxischen Potentials voneinander unterscheiden, was auf ein robustes Konzentrations-Wirkungsverhältnis zurückzuführen ist (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Somit waren HepG2 Zellen + Hamster S9 Mix am sensitivsten, während PHHS das robusteste Leberzellmodell repräsentierte (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). NDELA

wurde im Ames Test nicht positiv getestet, weshalb die resultierende Testsensitivität mit 75 % bewertet wurde (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023).

4.4 Untersuchung der DNA-Reparaturmechanismen in PRH

4.4.1 Messung der Genotoxizität nach Behandlung mit NDMA, NFluo, NBH und NNT vor und nach Erholungszeit mittels Comet Assay

Das nachfolgende Experiment diente dazu, mögliche DNA-Reparaturmechanismen in PRH nach Behandlung mit unterschiedlichen Nitrosaminen, darunter NDMA und den NDSRIs NBH, NFluo und NNT mittels Comet Assay zu detektieren. Um DNA-Strangbrüche zu identifizieren, die nicht aus einem Alkylierungsschaden resultieren, wurden Messungen der Zellviabilität mittels Zellviabilitätstest durchgeführt. Hierfür wurden PRH mit ansteigenden Konzentrationen NDMA (0 - 500 µM), NBH (0 - 500 µM) und NNT (0 - 50 µM) behandelt und für 2 h inkubiert. Dann erfolgte die Zellernte und Aufarbeitung mittels Zellviabilitätstest. Mit dem Ausbleiben einer Abnahme der Zellviabilität aller Testsubstanzen in den drei gewählten Konzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle ließen sich zytotoxische Effekte nach einer dem Comet Assay entsprechenden Inkubationsdauer von 2 h ausschließen (s. Abb. 53).

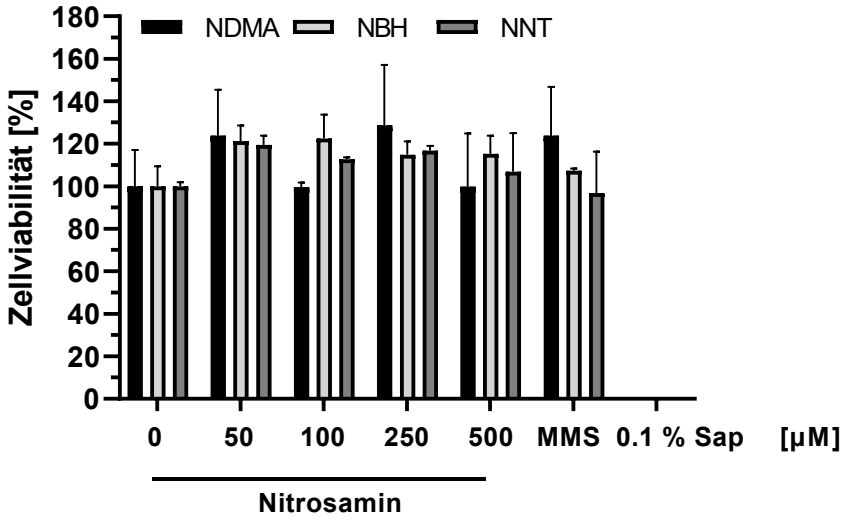

Abbildung 53: Effekt von NDMA, NBH und NNT auf die Zellviabilität in PRH.
Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 2 h Inkubation. Als Positivkontrollen dienten 0.3 mM MMS und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=2 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. t-test.

Die hohen Standardabweichungen in den mit NDMA behandelten Zellen verweisen auf große Schwankungen zwischen den biologischen Replikaten, was bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen ist (vgl. Abb. 53). Zur Untersuchung strangbruchinduzierender Effekte wurden PRH mit aufsteigenden Konzentrationen des jeweiligen Nitrosamins behandelt. Nach 2 h erfolgte für die Hälfte der Zellen die Ernte und Aufarbeitung mittels Comet Assay. Die Behandlung mit der Positivkontrolle MMS erfolgte 1 h vor Zellernte. Nach 2 h konnte für alle Nitrosamine in den gewählten Konzentrationen ein Anstieg der Schweifintensität detektiert werden, welcher nach Vergleich mit der Negativkontrolle allerdings nur für NFluo, NBH und NNT statistisch signifikant war (Abb. 54 a).

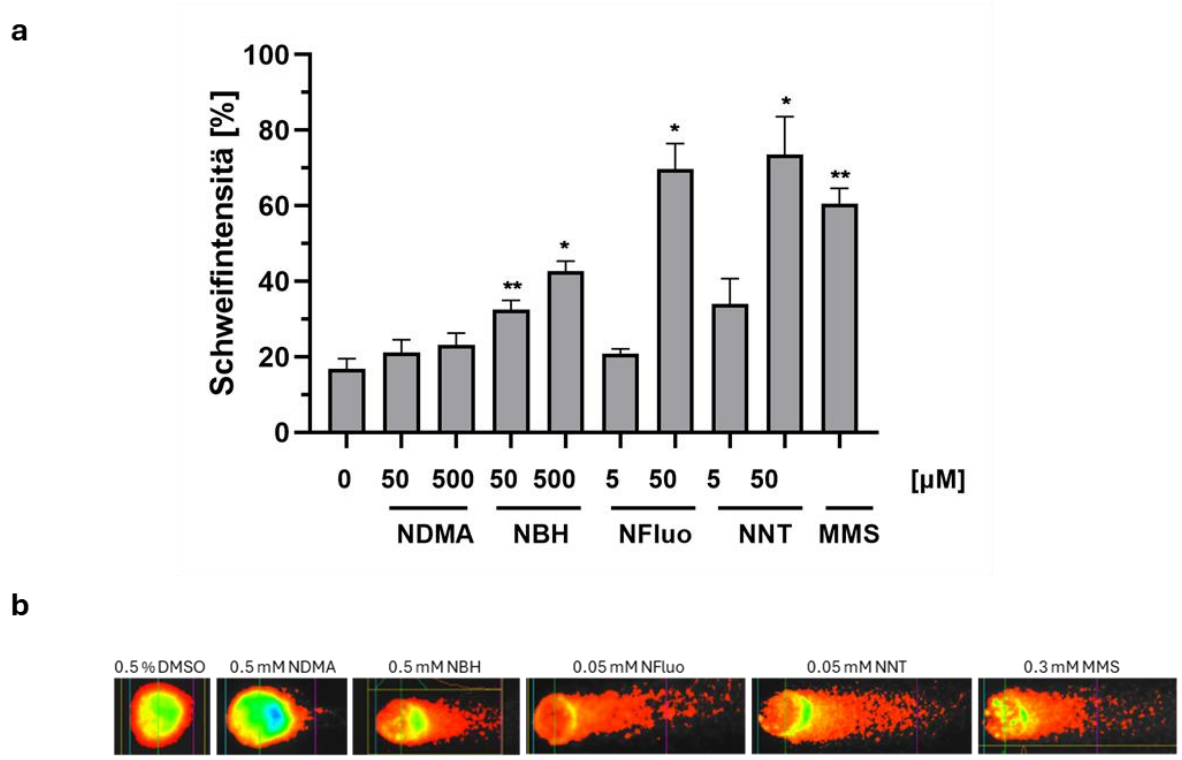

Abbildung 54: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDMA, NBH, NFluo und NNT in PRH.
a Schweifintensität [%] nach 2 h Inkubation + 0 h Erholungszeit. **b** Repräsentative Bilder von PRH nach 2 h Inkubation + 0 h Erholungszeit und nach der Datenverarbeitung mit Comet IV. 0.3 mM MMS diente als Positivkontrolle, 0.5 % DMSO diente als Negativkontrolle. Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen pro Experiment. Dargestellt ist der Mittelwert der Mediane aus insgesamt 3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; t-test.

Das stärkste strangbruchinduzierende Potential hatte NNT mit einem medianbasierten Schweifintensitätsunterschied von 4.4 nach Behandlung mit 50 µM, gefolgt von NFluo (4.14, 50 µM) und NBH (2.53, 500 µM). NDMA induzierte einen Schweifintensitätsunterschied < 2 im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 54). Die übrigen Zellen wurden mit PBS gewaschen, bevor sie mit frischem Medium für weitere 24

h inkubiert wurden. Dann erfolgte erneut die Aufarbeitung der Zellen mittels Comet Assay. Nach 2 h und 24 h Erholungszeit war für alle Nitrosamine in den gewählten Konzentrationen ein Anstieg der Schweifintensität im Vergleich zum Zeitpunkt nach 2 h + 0 h Erholung messbar (Abb. 54, Abb. 55).

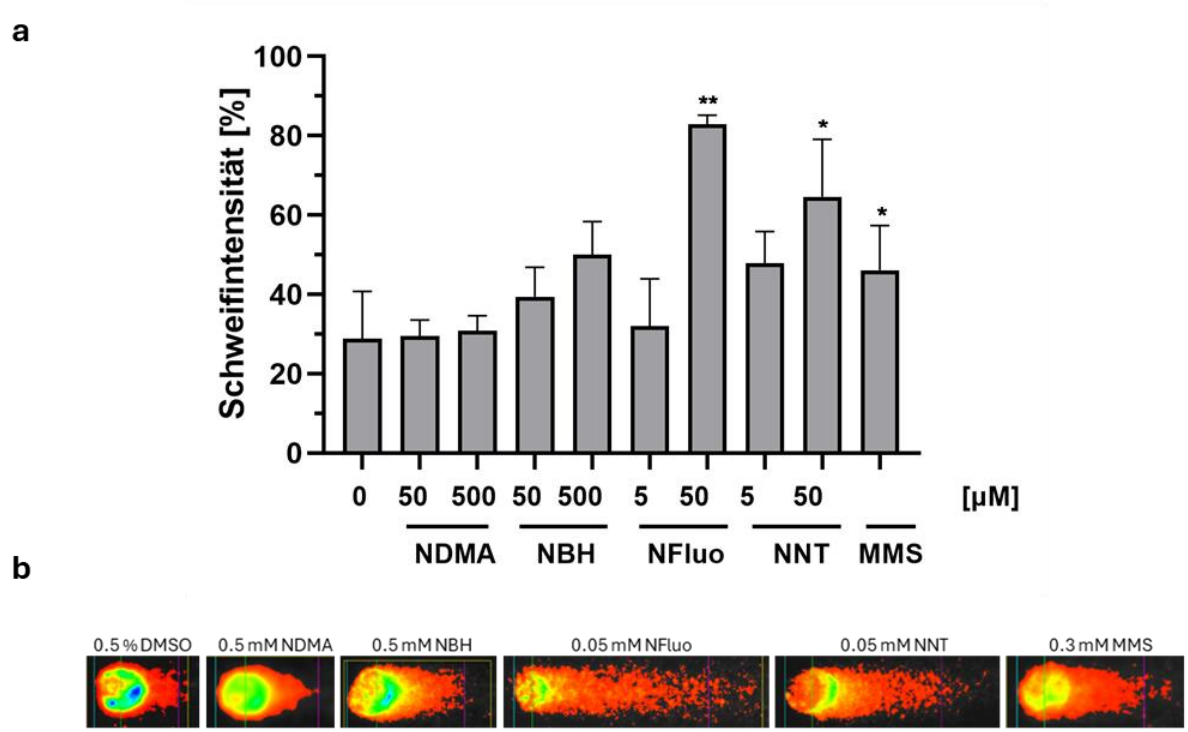

Abbildung 55: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDMA, NBH, NFluo und NNT in PRH.
a Schweifintensität [%] nach 2 h Inkubation + 24 h Erholungszeit. **b** Repräsentative Bilder von PRH nach 2 h Inkubation + 24 h Erholungszeit und nach der Datenverarbeitung mit Comet IV. 0.3 mM MMS diente als Positivkontrolle, 0.5 % DMSO diente als Negativkontrolle. Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen pro Experiment. Dargestellt ist der Mittelwert der Mediane aus insgesamt 3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; t-test.

In der Negativkontrolle lag nach 2 h und 24 h Erholungszeit eine höhere Schweifintensität und damit ein höheres basales DNA-Strangbruchlevel vor als nach 2 h und 0 h Erholungszeit (vgl. Abb. 54 a, 55 a). Der relative Schweifintensitätsunterschied im Vergleich zur Negativkontrolle war nach 24 h Erholungszeit für alle Testsubstanzen geringer ausgeprägt als nach 2 h (vgl. Abb. 54 a, 55 a). Dieser lag für NDMA nach Behandlung mit 500 µM bei 1.1 (vgl. Abb 56). Für 50 µM NNT lag dieser nach 24 h bei 2.3 und für 50 µM NFluo bei 2.9 (s. Abb. 55). Für NBH lag der Schweifintensitätsunterschied im Vergleich zur Negativkontrolle nach 24 h bei 1.7 und damit ähnlich wie für die Positivkontrolle MMS (1.6) (Abb. 55). Für MMS war nach 2 h + 24 h Erholungszeit damit ein

stark reduzierter Schweifintensitätsunterschied im Vergleich zum Messzeitpunkt nach 2 h + 0 h Erholungszeit feststellbar.

4.4.2 Untersuchung des zeitabhängigen Anstiegs von O^6-MeG und N7-MeG und Einfluss der MGMT in PRH nach Behandlung mit NDMA mittels LC-MS

Im nächsten Schritt sollten der zugrundeliegende DNA-Adduktbildungsverlauf ebenso wie DNA-Reparaturmechanismen nach Behandlung mit NDMA genauer untersucht werden. Zur Analyse der zeitabhängigen Entstehung von O^6-MeG-, und N7-MeG-Addukten wurden PRH hierfür mit 1 mM NDMA behandelt. Als Positivkontrolle wurde 0.5 mM TMZ verwendet.Die Ernte erfolgte nach 2 h, 4 h, 18 h und 24 h (s. Abb. 56 A, 57 A) sowie in einem unabhängigen, zweiten Experiment nach 2 h, 4 h und 24 h (s. Abb. 56 B, 57 B). Um den Einfluss der MGMT auf die zeitabhängige DNA-Reparatur und den Adduktbildungsverlauf zu untersuchen, wurden die Zellen im zweiten Experiment vergleichend mit und ohne MGMT-Inhibitor O^6-BG für 90 Minuten vorbehandelt (s. Abb. 56 B, Abb. 57 B). Nach Zellernte wurde die DNA mittels Chloroform-Phenol Extraktion isoliert (vgl. Abschnitt 3.10.1) und von Matthias Vogel im BfArM mittels LC-MS vermessen.

Messung von O^6-MeG

NDMA führte in beiden Experimenten zu einem zeitabhängigen Anstieg der O^6-MeG Addukte (vgl. Abb. 56 A, B).

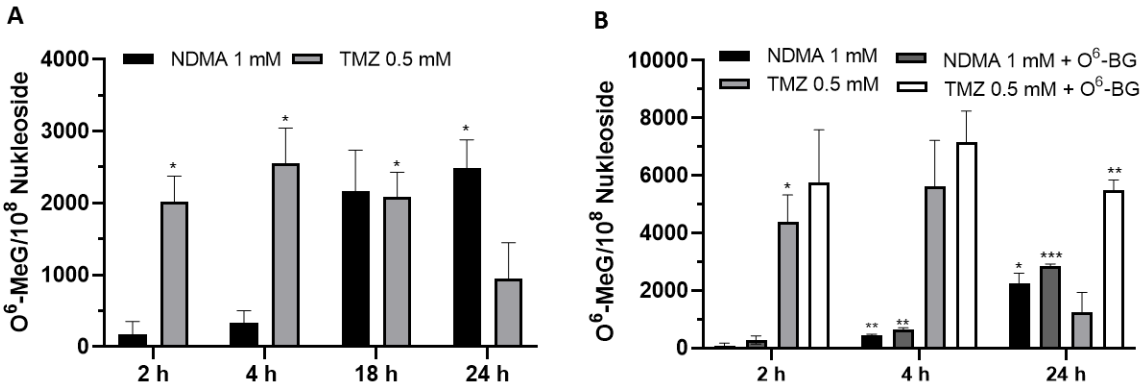

Abbildung 56: O^6-MeG-Addukte in PRH nach Behandlung mit NDMA.
Anzahl der O^6-MeG-Addukte/10^8 Nukleoside (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Zeit (x-Achse). **A** Anzahl der O^6-MeG Addukte auf 10^8 Nukleoside nach 2 h, 4 h, 18 h und 24 h Inkubation mit NDMA. **B** Anzahl der O^6-MeG Addukte auf 10^8 Nukleoside nach 2 h, 4 h und 24 h Inkubation mit NDMA +/- 20 µM O^6-BG (Vorinkubation für 90 min). Als Positivkontrolle diente 0.5 mM TMZ. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO +/- O^6-BG nach 0 h Inkubation bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; t-test.

Dieser Anstieg korrelierte mit der Inkubationsdauer und erreichte das Maximum im gewählten Untersuchungszeitraum nach 24 h mit 2486 gemessenen Addukten/10^8

Nukleoside, wobei der Effekt des Anstiegs im Vergleich zur Negativkontrolle statistisch signifikant war (vgl. Abb. 56 A. Die direkt alkylierende Substanz TMZ führte bereits nach 2 h zu einer starken Zunahme der O^6-MeG-Addukte (s. Abb. 56 A). Nach 4 h führte TMZ zu einem statistisch signifikanten Anstieg von O^6-MeG im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 56 A). Der maximale Effekt von TMZ trat nach 4 h Inkubation auf und lag bei 2557 induzierten O^6-MeG-Addukten/10^8 Nukleoside (vgl. Abb. 56 A). Im zweiten Experiment führte NDMA ebenfalls in zeitabhängiger Weise zu einem Anstieg gemessener O^6-MeG-Addukte (s. Abb. 56 B). Auch hier konnten mit 2846 O^6-MeG-Addukte/10^8Nukleoside nach Behandlung mit MGMT-Inhibitor sowie mit 2244 Addukten /10^8Nukleoside ohne MGMT-Inhibitor das Maximum nach 24 h erreicht werden (s. Abb. 56 B). Der Anstieg der O^6-MeG-Addukte im Vergleich zum 0 h Zeitpunkt war nach 4 h und 24 h sowohl für O^6-BG unbehandelte PRH als auch für Zellen, die mit O^6-BG behandelt wurden, statistisch signifikant (vgl. Abb. 56 B). Nach Inhibierung des MGMT-Enzyms trat zu allen Zeitpunkten ein leichter Anstieg der gemessenen Addukte im Vergleich zu entsprechend unbehandelten Zellen auf (s. Abb. 56 B). Der Effekt von O^6-BG war allerdings nicht statistisch signifikant (vgl. Abb. 57 B). Das Maximum gemessener O^6-MeG Addukte wurde für TMZ mit und ohne MGMT-Inhibitor nach 4 h Inkubation erreicht und lag bei 5625 O^6-MeG/10^8 Nukleosiden (s. Abb. 56 B). Inhibition von MGMT führte zu 7158 O^6-MeG Addukten/10^8 Nukleosiden vgl. Abb. 56 B). Ein statistisch signifikanter Effekt im Vergleich zum 0 h Zeitpunkt trat allerdings nur nach 2 h ohne MGMT-Inhibitor sowie nach 24 h mit MGMT-Inhibitor auf (vgl. Abb. 56 B). Der im Vergleich zu TMZ zeitlich langsamere Anstieg von durch NDMA induzierten O^6-MeG Addukten ist auf die zeitlich langsam ablaufende enzymkatalysierte metabolische Aktivierung dieses Nitrosamins zurückzuführen. Der Prozess der hydrolytischen Spaltung von TMZ, der zur Bildung des reaktiven 3-methyl-(triazen-1-yl)imidazol-4-carboximid (MTIC) führt, läuft hingegen schneller ab (Reid *et al.*, 1997) (vgl. Abb 56 A, B). In diesem Zusammenhang kann die DNA rascher durch das aus TMZ gebildete Zerfallsprodukt als durch das nach metabolischer Aktivierung von NDMA entstehende Methylcarbocation alkyliert werden. Ferner ließ sich mit den NDMA behandelten PRH demonstrieren, dass MGMT-Inhibition durch O^6-BG die Anzahl der O^6-MeG-Addukte beeinflusst (s. Abschnitt 4.4.2, Abb. 56 B). So ließ sich in mit NDMA und O^6-BG behandelten Zellen ein Anstieg detektierter Addukte im Vergleich zu den mit NDMA behandelten Zellen ohne Vorbehandlung mit O^6-BG messen (vgl. Abb. 56 B).

Messung von N7-MeG

Der N7-MeG- Adduktbildungsverlauf nach Behandlung mit NDMA ähnelt dem Verlauf von O^6-MeG und erreicht ebenfalls nach 24 h mit im Mittel 20200 gemessenen Addukten einen Höhepunkt, welcher im Vergleich zum 0 h Zeitpunkt statistisch signifikant war (s. Abb. 57 A).

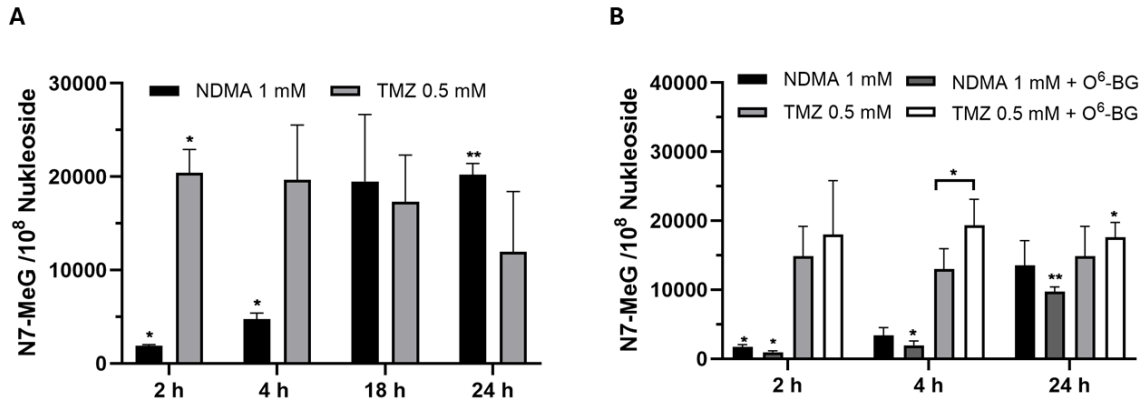

Abbildung 57: N7-MeG-Addukte in PRH nach Behandlung mit NDMA.
A Anzahl der N7-MeG Addukte auf 10^8 Nukleoside nach 2 h, 4 h, 18 h und 24 h Inkubation mit NDMA. **B** Anzahl der N7-MeG Addukte auf 10^8 Nukleoside nach 2 h, 4 h und 24 h Inkubation mit NDMA +/- 20 µM O^6-BG (Vorinkubation für 90 min). Als Positivkontrolle diente 0.5 mM TMZ. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO +/- O^6-BG nach 0 h Inkubation bezogen. *, $p < 0.05$;**, $p < 0.01$; t-test.

Die Anzahl an N7-MeG-Addukten lag 8.1-fach über der Anzahl an O^6-MeG-Addukten und korrelliert damit mit in der Literatur beschriebenen Daten für NDMA (s. Abb. 56 A, 57 A, Pegg *et al.*, 1978). Die maximal gemessene Anzahl von N7-MeG-Addukten nach Behandlung mit TMZ wurde nach 2 h Inkubation detektiert und lag bei 20400 (vgl. Abb. 57 A). Nach 2 h führte TMZ zu einem statistisch signifikanten Anstieg gemessener N7-MeG-Addukte im Vergleich zur Negativkontrolle nach 0 h (vgl. Abb. 57 A). Das Verhältnis der Anzahl gemessener O^6-MeG-Addukte im Vergleich zur Anzahl gemessener N7-MeG-Addukte lag mit 8.0 in ähnlicher Größenordnung wie nach NDMA Behandlung (vgl. Abb. 56 A und Abb. 57 A). NDMA führte nach 24 h sowohl mit als auch ohne MGMT-Inhibitor zur maximalen Anzahl von N7-MeG-, welche in PRH ohne O^6-BG bei 13527/10^8 Nukleosiden lag (vgl. Abb. 57 B). Dies entspricht einem 2.4-fachen Anstieg gegenüber der Anzahl gemessener O^6-MeG-Addukte(vgl. Abb. 56 B, Abb. 57 B). Die gemessene Adduktanzahl von N7-MeG für mit NDMA und O^6-BG behandelten Zellen lag nach 24 h bei 9763/10^8 Nukleosiden. Damit lag das Verhältnis von N7-MeG/O^6-MeG Addukten bei 1.4 (vgl. Abb. 56 B, 57 B). Bei den mit NDMA für 2 h behandelte Zellen trat sowohl mit als auch ohne

MGMT-Inhibitor ein signifikanter Anstieg der N7-MeG-Addukte im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle auf (s. Abb. 57 B). Bei den mit dem MGMT-Inhibitor behandelten PRH trat nach 4 h und 24 h zusätzlich ein statistisch signifikanten Anstieg der Anzahl an N7-MeG-Addukten im Vergleich zum 0 h Zeitpunkt auf (s. Abb. 57 B). Für TMZ waren nach Inhibierung der MGMT eine höhere Zahl an N7-MeG-Addukten im Vergleich zu entsprechend behandelten Zellen ohne O^6-BG feststellbar (vgl. Abb. 57 B). Im Vergleich zur 0 h Behandlung trat nur in mit O^6-BeG behandelten Zellen nach 24 h ein statistisch signifikanter Anstieg gemessener N7-MeG-Addukte im Vergleich zum 0 h Zeitpunkt auf (s. Abb. 57 B). Für PRH ohne O^6-BG Behandlung war die maximal detektierbare Zahl von N7-MeG-Addukten nach 24 h erreicht und lag bei 14847 gemessenen Addukten/10^8 Nukleosiden, was einer 2.6-fach erhöhten Anzahl gemessener N7-MeG-Addukte im Vergleich zu O^6-MeG-Addukten entspricht (vgl. Abb. 56 B, Abb. 57 B). TMZ führte nach 4 h mit 19300 gemessenen N7-MeG-Addukten/10^8 Nukleoside zu maximalen Effekten, wobei dieser in mit O^6-BG vorinkubierten PRH detektierbar war (s. Abb. 57 B). Das Verhältnis N7-MeG/O^6-MeG-Addukte lag damit bei 1.3. Zusammenfassend war die Anzahl gemessener N7-MeG-Addukte auch im zweiten Experiment sowohl für NDMA als auch für TMZ, unabhängig von O^6-BG, höher als die Anzahl gemessener O^6-MeG-Addukte (vgl. Abb. 56 B, Abb. 57 B). O^6-BG hatte einen leicht induzierenden Effekt auf die Anzahl an O^6-MeG-Addukten nach NDMA Behandlung, welcher jedoch nicht statistisch signifikant war (s. Abb. 57 B). MGMT-Inhibition führte auch in mit TMZ behandelten Zellen zu einem Anstieg der Zahl an O^6-MeG-Addukten, der ebenfalls nicht statistisch signifikant war (vgl. Abschnitt 4.2.2.2, Abb. 57 B). In mit NDMA behandelten PRH hatte O^6-BG keinen induzierenden Effekt auf die Zahl an N7-MeG-Addukten (s. Abb. 57 B). Demgegenüber verstärkte O^6-BG interessanterweise die Anzahl der induzierten N7-MeG-Addukte in mit TMZ behandelten Zellen nach einer Inkubationsdauer von 4 h in statistisch signifikantem Ausmaß (vgl. 57 B). Der vergleichsweise langsame Anstieg gemessener N7-MeG-Addukte nach Behandlung mit NDMA ist mit der enzymatisch bedingten metabolischen Aktivierung, die bekanntermaßen zeitlich langsamer abläuft als spontane Hydrolyse von TMZ zu MTIC, erklärbar und eine Begründung für dieses Resultat (s. Abschnitt 4.2.2.2 Abb. 57 A und Abb. 57 B) (Raid *et al.*, 1997). Die Schnelligkeit der DNA-Alkylierung durch das reaktive Imidazotriazen konnte durch den recht schnellen Anstieg der N7-MeG-Addukte nach Behandlung mit TMZ demonstriert werden (s. Abb. 57 A, B). Sowohl die relative

Anzahl detektierter N7-MeG-Addukte im Vergleich zu O^6-MeG Addukten nach Behandlung mit NDMA und TMZ welche in beiden Experimenten detektierbar war, ebenso wie der Anstieg von O^6-MeG-Addukten nach Behandlung mit O^6-BG in Kombination mit TMZ und NDMA enstpricht den Erwartungen und deckt sich mit der Literatur (vgl. Abb. 56A, B sowie Abb. 57 A, B). Dass sich die Bedeutung der MGMT-Inhibition auf O^6-MeG-Addukte beschränkt konnte nach Behandlung mit NDMA und O^6-BG demonstriert werden (s. Abb. 56 B und Abb. 57 B). Für die mit TMZ behandelten Zellen traf die Limitation auf O^6-MeG nicht zu, was sich in einem Anstieg der N7-MeG-Addukte in mit O^6-BG behandelten PRH äußerte (s. Abb. 57 B).

4.5 Untersuchungen der Metabolischen Kompetenz in HepG2 mittels LC-MS

Zur Testung der metabolischen Kompetenz der HepG2 Zelllinien HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 wurden die Zellen mit Substraten humaner CYP Enzyme inkubiert. Dabei wurde Substrat im Überschuss eingesetzt, um die Vorraussetzungen für eine quantitative Umsetzung zu realisieren. Nach 4 h Inkubation erfolgte die Ernte der Zellen sowie des Überstandes, welcher bis zur LC-MS Messung in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert wurde. Als Kontrollen dienten mit Substrat behandeltes Inkubationsmedium sowie der Überstand unbehandelter Zellen. Die Berechnung der metabolischen Kompetenz durch Bestimmung des Stoffwechselverhältnis erfolgte wie in Abschnitt 3.5 beschrieben. Da ein Großteil der Metaboliten in das Medium transportiert wird, wurde für die Berechnung der Überstand berücksichtigt. Die Messungen wurden von Matthias Vogel im BfArM durchgeführt. Nach Behandlung der Zellen mit Substraten humaner CYP Enzyme waren die Metaboliten Hydroxychlorzoxazon, Acetaminophen und Dextrorphan detektierbar, was die Proteinaktivität für CYP2E1, CYP1A2 und CYP2D6 anhand des Stoffwechselverhältnisses ermöglichte war (Abb. 58).

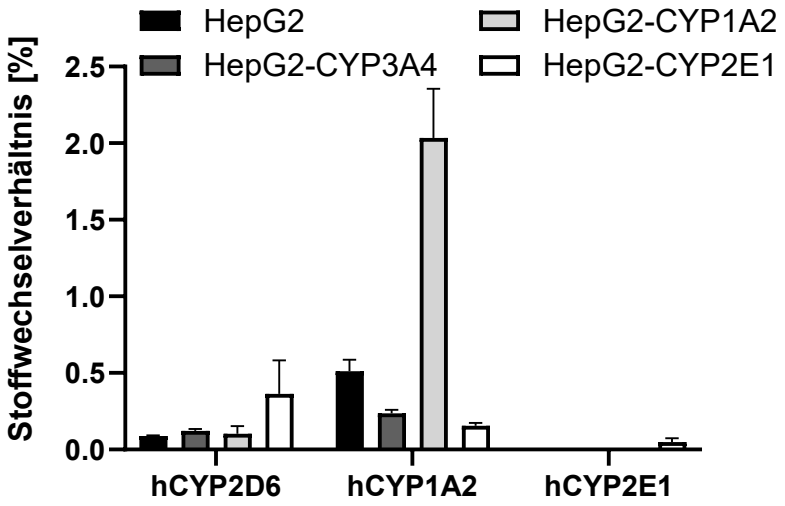

Abbildung 58: Stoffwechselverhältnis der verschiedenen Cytochrom-P450-Enzyme in HepG2 Zellen.
Dargestellt ist das aus n=3 basierende Verhältnis des gemessenen Metaboliten zur Summe aus Metabolit und Substrat im Überstand. HepG2 Zellen wurden mit etablierten humanen CYP Substraten für 4 h behandelt (CYPE1; Chlorzoxazon, CYP2D6; Dextromethorphan, CYP1A2; Phenacetin). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten.

Proteinaktivität von CYP1A2 war in allen Zelllinien messbar, wobei das Signal für Acetaminophen in HepG2-CYP1A2 Zellinkubationen 5-10-fach höher als in der Mediumkontrolle war (vgl. Abb. 58). CYP1A2 Aktivität war zudem in HepG2, HepG2-CYP3A4 und HepG2-CYP2E1 Zellen nachweisbar (s. Abb. 58). CYP2D6 Aktivität, welche für die metabolische Umsetzung von Dextromethorphan relevant ist, ließ sich auch für HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 Zellen nachweisen (s. Abb. 58). Anhand des messbaren Signals von Hydroxychlorzoxazon nach Inkubation mit HepG2-CYP2E1 ließ sich außerdem CYP2E1 Aktivität in HepG2-CYP2E1 Zellen nachweisen (vgl. Abb. 58). Für HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2 Zellen war keine Proteinaktivität der entsprechenden Isoform nachweisbar (s. Abb. 58).

4.6 Untersuchung der Zytotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 mittels Zellviabilitätstest

4.6.1 HepG2, HepG2-CYP3A4 und HepG2-CYP1A2 Zellen nach Behandlung mit CPA

HepG2, HepG2-CYP3A4 und HepG2-CYP1A2 Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen CPA (0 - 9 mM) behandelt. Nach 24 h erfolgte die Aufarbeitung und Messung zytotoxischer Effekte mittels Zellviabilitätstest. Nach 24 h führten 1.5 mM CPA

in HepG2 Zellen bereits zu einer Abnahme der Zellviabilität um 20 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 59).

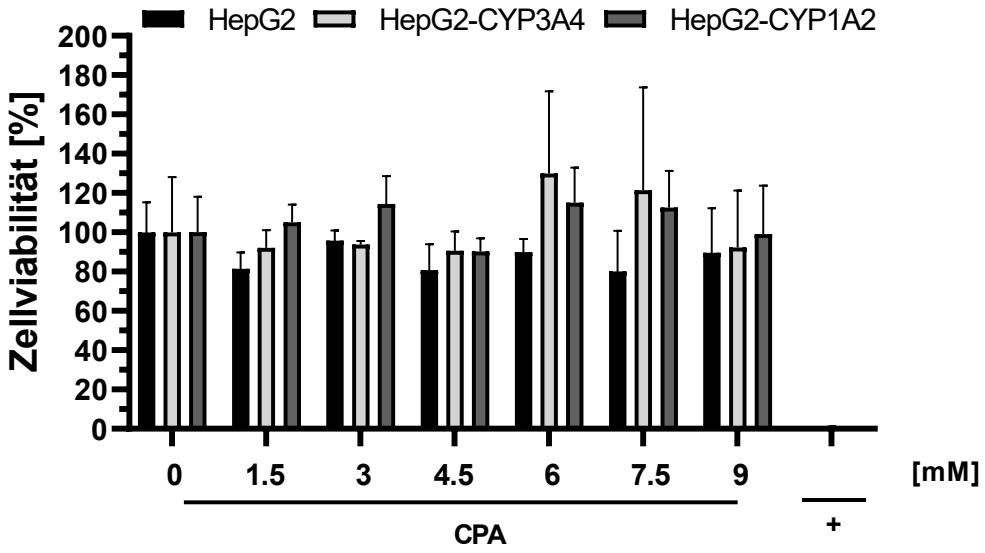

Abbildung 59: Zellviabilität in HepG2 Zellen nach Behandlung mit CPA.
Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. t-test.

Höhere Konzentrationen führten zu keiner signifikanten Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 59). In HepG2-CYP3A4 Zellen traten nach Behandlung mit 4.5 mM maximale Effekte auf, die in einer Abnahme der Zellviabilität um 10 % im Vergleich zur Negativkontrolle resultierten (s. Abb. 59). Die biologischen Replikate der nach Behandlung mit 6 mM und 7.5 mM behandelten Zellen zeigten große Unterschiede in Bezug auf Reproduzierbarkeit, erkennbar anhand der hohen Standardabweichungen (Abb. 59). In HepG2-CYP1A2 Zellen waren die durch CPA induzierten Effekte nach Behandlung mit 4.5 mM CPA maximal und mit einer 10 %-igen Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle von ähnlicher Ausprägung wie in HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit 4.5 mM CPA (s. Abb. 59). Die Behandlung mit der höchsten Testkonzentration führte zu einer Abnahme der Zellviabilität um weniger als 10 % im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 59).

4.6.2 HepG2 und HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit MMS

Zur Untersuchung des Effektes von MMS auf die Zellviabilität wurden HepG2 Zellen und HepG2-CYP3A4 Zellen mit Konzentrationen im Bereich von 0 - 900 µM behandelt und für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung und Messung zytotoxischer Effekte

mittels Zellviabilitätstest. MMS führte in HepG2 Zellen nach 24 h zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Zellviabilität (Abb. 60 A).

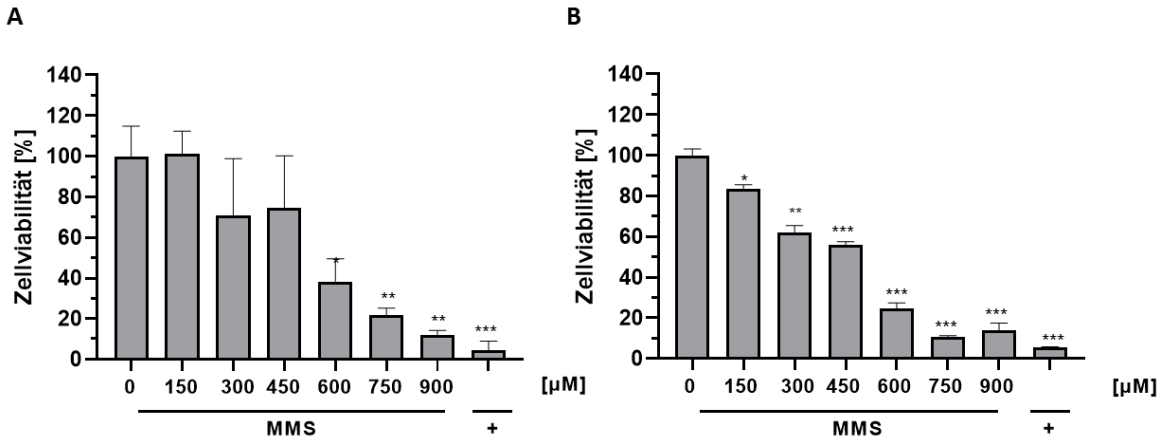

Abbildung 60: Effekt von MMS auf die Zellviabilität in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP3A4 Zellen.
A Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation in HepG2 Zellen. **B** Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation in HepG2-CYP3A4 Zellen. 0.1 % Saponin (+) diente als Positivkontrolle. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=4 (HepG2) bzw. n=3 (HepG2-CYP3A4) Experimenten (0 - 900 µM). Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; t-test.

So konnte nach Logarithmierung der Konzentrationen und mathematischer Modellierung ein EC_{50}-Wert von 524 µM berechnet werden. MMS führte auch in HepG2-CYP3A4 Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellviabilität nach 24 h, welche etwas intensiver ausgeprägt war im Vergleich zur Wildtyp Zelllinie (s. Abb. 60 B). Nach mathematischer Modellierung resultierte ein EC_{50}-Wert von 400 µM.

4.6.3 HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit MMS

HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen MMS (0 - 900 µM) behandelt. Nach 24 h erfolgten Aufarbeitung und Messung zytotoxischer Effekte mittels Zellviabilitätstest. Auch in HepG2-CYP1A2 führte MMS nach 24 h zu einer Abnahme der Zellviabilität, die in ihrem Ausmaß mit der verwendeten Testkonzentration korreliert (Abb. 61 A).

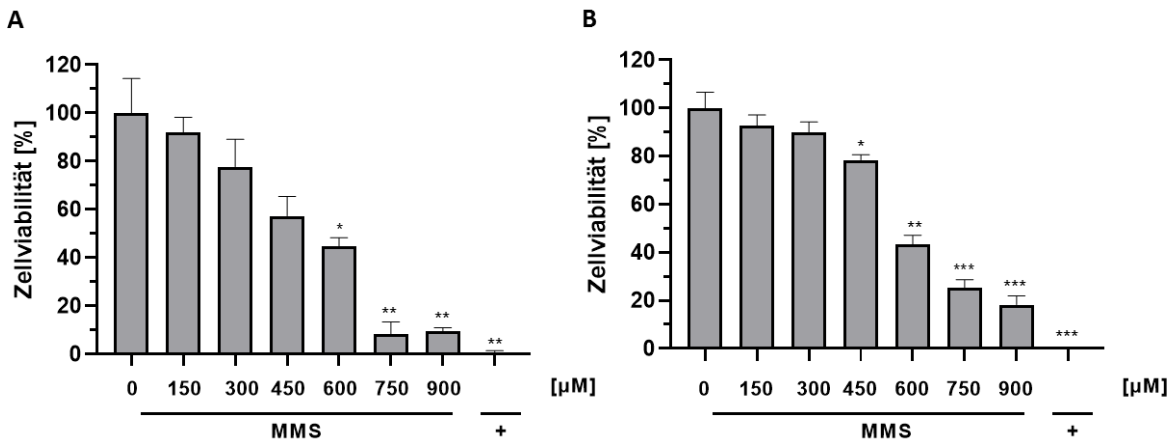

Abbildung 61: Effekt von MMS auf die Zellviabilität in HepG2-CYP1A2 Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen.
A Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation in HepG2-CYP1A2 Zellen. **B** Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation in HepG2-CYP2E1 Zellen. 0.1 % Saponin (+) diente als Positivkontrolle. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen.*, $p < 0.05$;**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; t-test.

Ähnlich wie HepG2-CYP3A4 Zellen zeigten HepG2-CYP1A2 Zellen eine im Vergleich zum Wildtyp etwas höhere Sensitivität gegenüber MMS (s. Abb. 61 A). Der nach mathematischer Modellierung resultierende EC_{50}-Wert von 490 µM lag zwischen dem im Wildtyp ermittelten EC_{50}-Wert und dem in HepG2-CYP3A4 berechneten EC_{50}-Wert. Nach Behandlung von HepG2-CYP2E1 mit MMS war eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität zu beobachten (vgl. Abb. 61 B). Statistisch signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Negativkontrolle traten nach Behandlung mit 450 µM - 900 µM auf (vgl. Abb. 61 B). Nach mathematischer Modellierung konnte ein EC_{50}-Wert von 582 µM ermittelt werden, welcher sehr nahe an dem entsprechenden EC_{50}-Wert der Wildtyp Zelllinie lag.

4.6.4 HepG2 Zellen nach Behandlung mit NDMA

HepG2-Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen NDMA (0 - 10 mM) für 24 h und 72 h behandelt. Anschließend erfolgten Aufarbeitung und Messung der Zellviabilität mittels Zellviabilitätstest. NDMA induzierte weder nach 24 h noch nach 72 h signifikante zytotoxische Effekte in HepG2 Zellen (Abb. 62 A, Abb. 62 B).

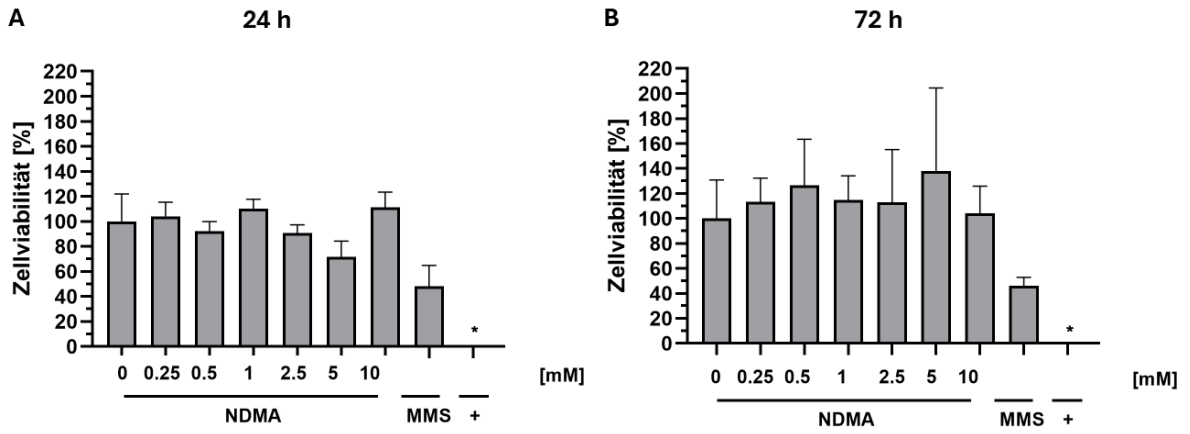

Abbildung 62: Effekt von NDMA auf die Zellviabilität in HepG2 Zellen.
A Zellviabilität (y-Achse), aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. **B** Zellviabilität (y-Achse), aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 72 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.52 mM) und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; t-test.

Erkennbar war dies an einer im Vergleich zur Negativkontrolle nach Behandlung mit 10 mM nach beiden Zeitpunkten ähnlichen Zellviabilität zum Zeitpunkt der Messung (Abb. 62 A, B).

4.6.5 HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit NDMA

HepG2-CYP3A4 Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen NDMA (0 - 10 mM) für 24 h und 72 h behandelt. Anschließend erfolgte die Messung der Zellviabilität mittels Zellviabilitätstest. In HepG2-CYP3A4 war nach beiden Inkubationszeitpunkten mit NDMA keine Reduktion der Zellviabilität messbar (Abb. 63 A, Abb. 63 B).

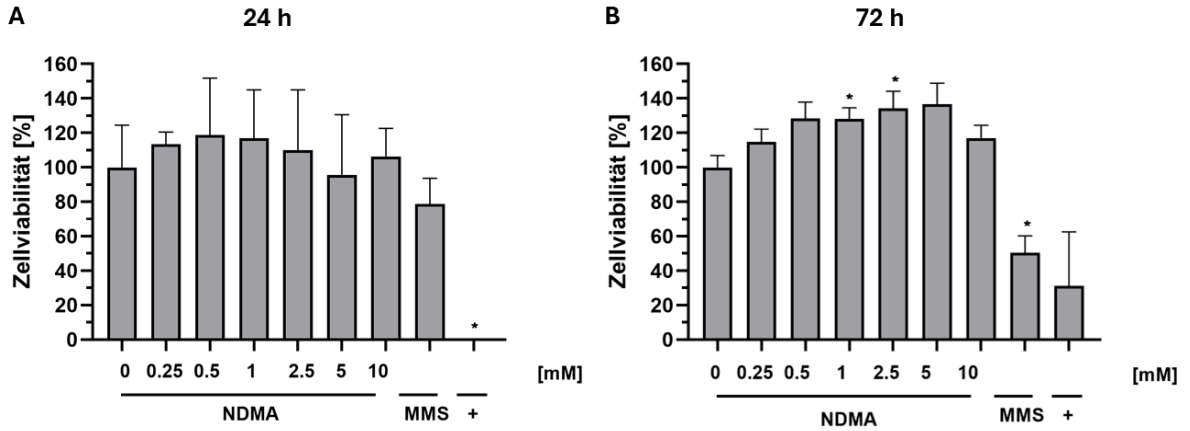

Abbildung 63: Effekt von NDMA auf die Zellviabilität in HepG2-CYP3A4 Zellen.
A Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. **B** Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 72 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.40 mM) und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; t-test.

Die Positivkontrolle MMS induzierte nach 72 h eine statistisch signifikante Reduktion der Zellviabilität, die bei knapp 50 % im Vergleich zur Negativkontrolle lag (s. Abb. 63 B).

4.6.6 HepG2-CYP1A2 Zellen nach Behandlung mit NDMA

HepG2-CYP1A2 Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen NDMA (0 - 10 mM) behandelt. Nach 24 h und 72 h erfolgte dann jeweils die Aufarbeitung mittels Zellviabilitätstest. Nach 90-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde die Zellviabilität gemessen. In HepG2-CYP1A2 Zellen induzierte NDMA keine zytotoxischen Effekte (vgl. Abb. 64 A).

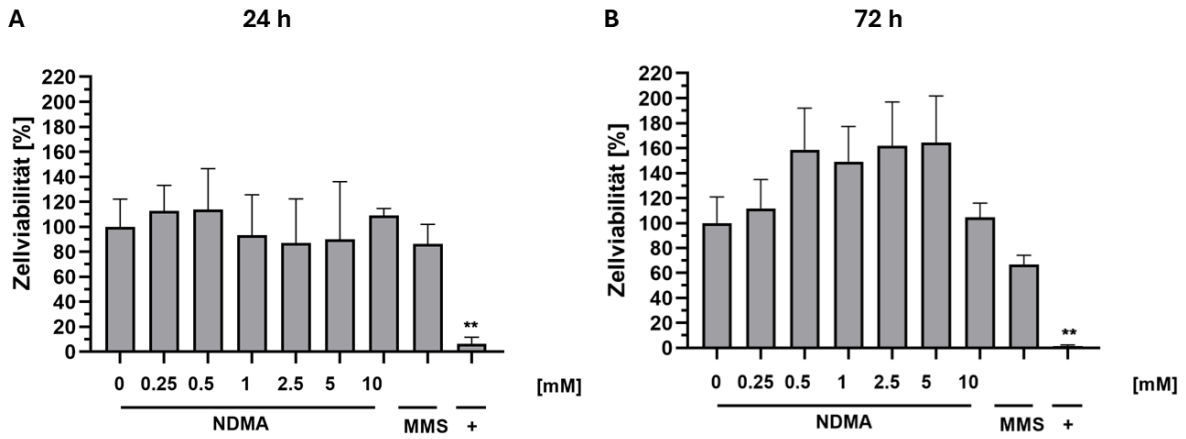

Abbildung 64: Effekt von NDMA auf die Zellviabilität in HepG2-CYP1A2 Zellen.
A Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. **B** Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 72 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.49 mM) und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen.**, $p < 0.01$; t-test.

So zeigten die auf n=3 basierenden Messungen der Zellviabilität eine im Vergleich zur Negativkontrolle unveränderte Zellviabilität sowohl nach 24 h als auch nach 72 h (s. Abb. 64 A, 64 B).

4.6.7 HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NDMA

Nachdem HepG2-CYP2E1 Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen NDMA (0 - 10 mM) für 24 h und 72 h behandelt wurden, erfolgten jeweils Aufarbeitung und Messung der Zellviabilität mittels Zellviabilitätstest. Nach 24 h konnte kein eindeutig zytotoxischer Effekt von NDMA in HepG2-CYP2E1 Zellen festgestellt werden (Abb. 65 A).

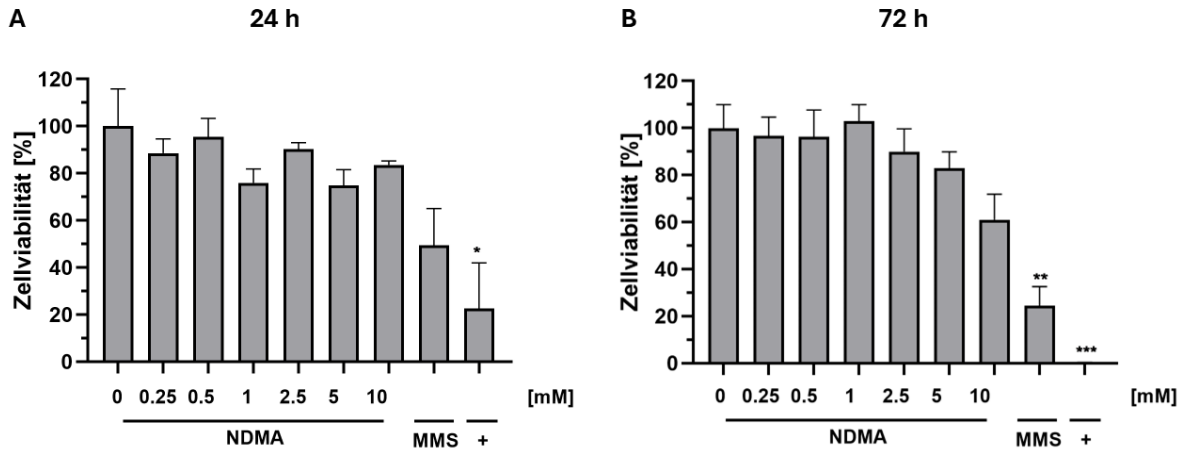

Abbildung 65: Effekt von NDMA auf die Zellviabilität in HepG2-CYP2E1 Zellen.
A Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. **B** Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 72 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.58 mM) und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen.*, $p < 0.05$;**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, t-test.

Nach 72 h hingegen führte die Substanz in konzentrationsabhängiger Weise zu einer Abnahme der Zellviabilität, welche nach Behandlung mit 10 mM bei etwa 60 % im Vergleich zur Negativkontrolle lag (vgl. Abb. 65 B).

4.6.8 HepG2 Zellen nach Behandlung mit NDELA

HepG2 Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen NDELA (0 - 10 mM) behandelt. Nach 24 h sowie nach 72 h erfolgten Aufarbeitung und Messung zytotoxischer Effekte mittels Zellviabilitätstest.NDELA führte nach 72 h zu zytotoxischen Effekten (Abb. 66 B).

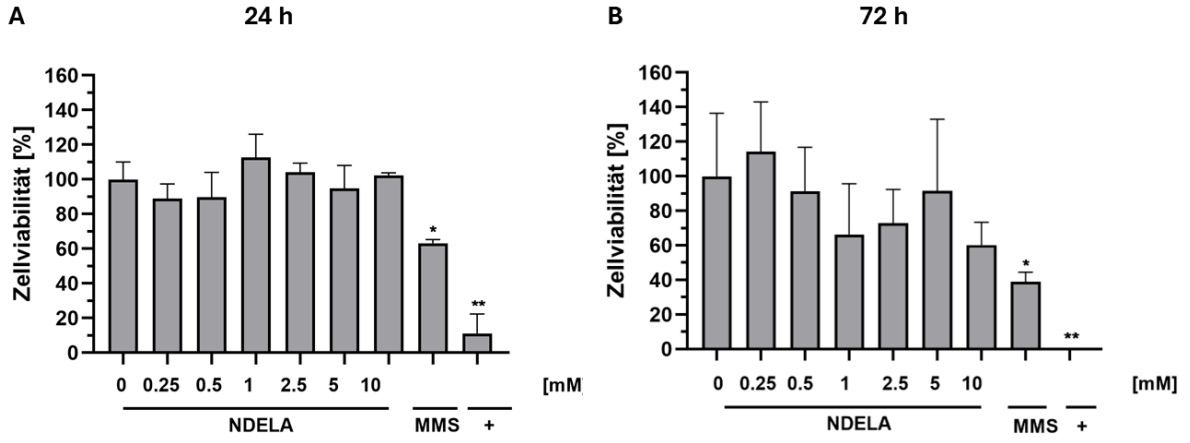

Abbildung 66: Effekt von NDELA auf die Zellviabilität in HepG2 Zellen.
A Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. **B** Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 72 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.52 mM) und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; t-test.

Der Effekt war nach Behandlung mit 1 mM maximal resultierte in einer um 40 % reduzierten Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 66 B). Die Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch signifikant, was auf hohe Standardabweichungen zwischen biologischen Replikaten zurückgeführt werden kann (s. Abb. 66 A, 66 B.

4.6.9 HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit NDELA

Zur Messung zytotoxischer Effekte wurden HepG2-CYP3A4 Zellen für 24 h und 72 h mit aufsteigenden Konzentrationen NDELA (0 - 10 mM) behandelt. Dann erfolgte die Aufarbeitung und Messung mittels Zellviabilitätstest. In HepG2-CYP3A4 führte NDELA zu keiner Reduktion der Zellviabilität nach 24 h (s. Abb. 67 A).

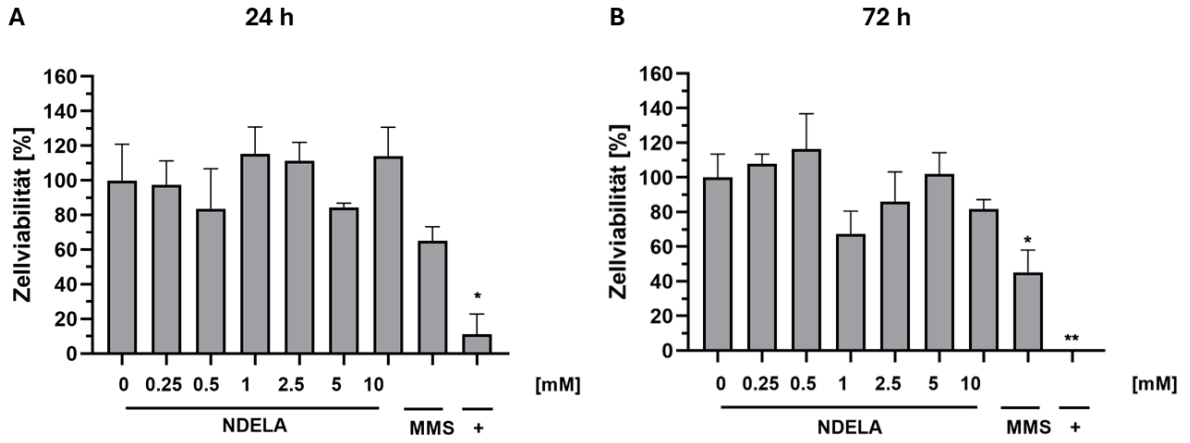

Abbildung 67: Effekt von NDELA auf die Zellviabilität in HepG2-CYP3A4 Zellen.
A Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. **B** Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 72 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.40 mM) und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$;**, $p < 0.01$; t-test.

Nach 72 h Inkubation führte NDELA zu einer Abnahme der Zellviabilität (vgl. Abb. 67 B). Der maximale Effekt trat nach Behandlung mit 1 mM NDELA auf und war mit einer um 40 % reduzierten Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle ähnlich stark ausgeprägt wie im Wildtyp nach 72 h Inkubation (s. Abb. 66 B, 67 B).

4.6.10 HepG2-CYP1A2 Zellen nach Behandlung mit NDELA

HepG2-CYP1A2 Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen NDELA (0 - 10 mM) behandelt. Nach 24 h und 72 h erfolgten Aufarbeitung und Messung zytotoxischer Effekte mittels Zellviabilitätstest. Auch in HepG2-CYP1A2 führte NDELA zu keinen starken zytotoxischen Effekten nach 24 h (vgl. Abb. 68 A).

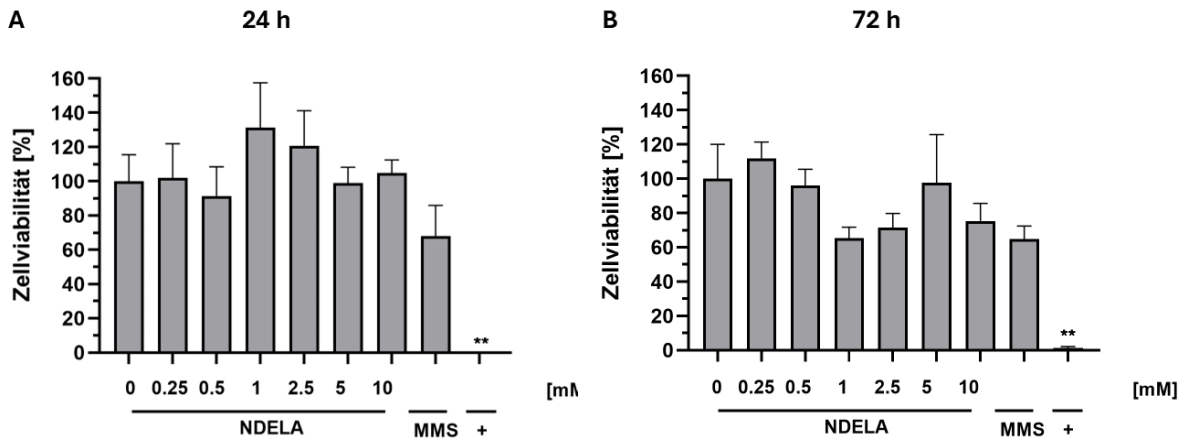

Abbildung 68: Effekt von NDELA auf die Zellviabilität in HepG2-CYP1A2 Zellen.
A Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. **B** Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 72 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.49 mM) und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. **, $p < 0.01$; t-test.

Eine Reduktion der Zellviabilität um knapp 40 % im Vergleich zur Negativkontrolle konnte nach 72 h gemessen werden (Abb. 68 B).

4.6.11 HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NDELA

HepG2-CYP2E1 Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen NDELA (0 - 10 mM) behandelt. Aufarbeitung und Messung zytotoxischer Effekte erfolgten nach 24 h und nach 72 h. Nach 24 h induzierte NDELA in HepG2-CYP2E1 Zellen leichte zytotoxische Effekte. (Abb. 69 A, 69 B).

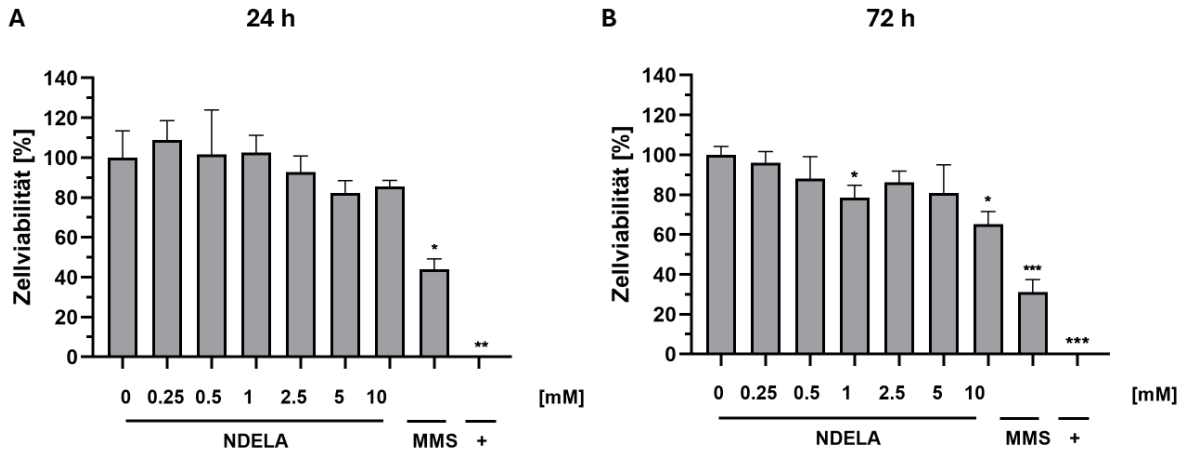

Abbildung 69: Effekt von NDELA auf die Zellviabilität in HepG2-CYP2E1 Zellen.
A Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation **B** Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 72 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.58 mM) und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$;**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; t-test.

Diese waren nach 72 h etwas deutlicher ausgeprägt (vgl. Abb. 69). Behandlung mit 10 mM nach 72 h resultierte in einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität um mehr als 30 % im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 69 B).

4.6.12 HepG2 Zellen nach Behandlung mit S-NNN

Zur Messung zytotoxischer Effekte wurden HepG2 Zellen mit S-NNN (0 - 10 mM) behandelt. Nach 24 h und nach 72 h erfolgten Aufarbeitung und Messung mittels Zellviabilitätstest. Behandlung mit 10 mM des *N*-Nitrosamins S-NNN resultierte nach 24 h in einer statistisch signifikanten Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 70 A). Zytotoxische Effekte traten auch nach 72 h auf (vgl. Abb. 70 B).

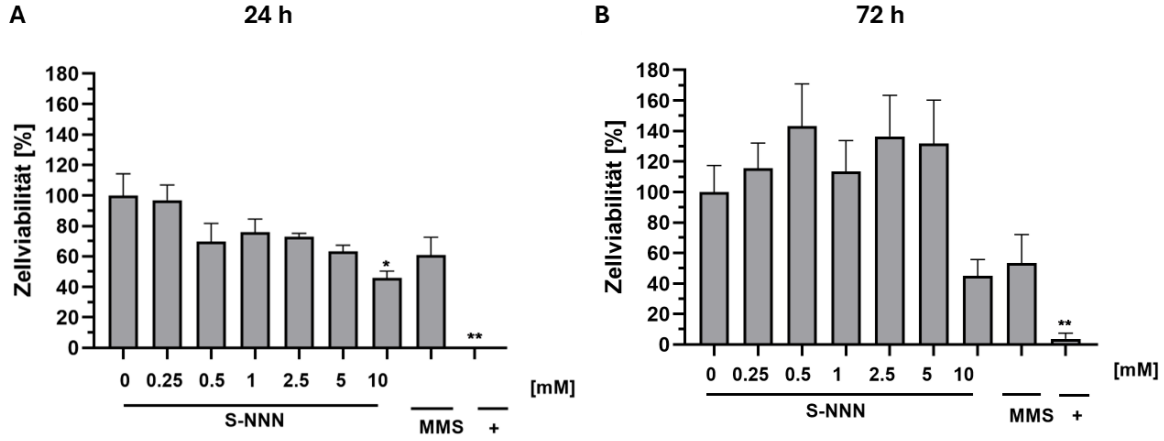

Abbildung 70: Effekt von S-NNN auf die Zellviabilität in HepG2 Zellen.
A Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. **B** Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 72 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.52 mM) und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; t-test.

Die Effekte waren nicht signifikant, was auf hohe Standardabweichungen zwischen einzelnen biologischen Replikaten zurückgeführt werden kann (s. Abb. 70 B). Nach mathematischer Modellierung ließ sich ein EC_{50}-Wert von 9.93 mM berechnen.

4.6.13 HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit S-NNN

HepG2-CYP3A4 Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen S-NNN (0 - 10 mM) behandelt. Nach 24 h und 72 h erfolgten Aufarbeitung und Messung der Zellviabilität mittels Zellviabilitätstest. In HepG2-CYP3A4 Zellen traten Effekte auf die Zellviabilität erst nach 72 h auf (Abb. 71 B).

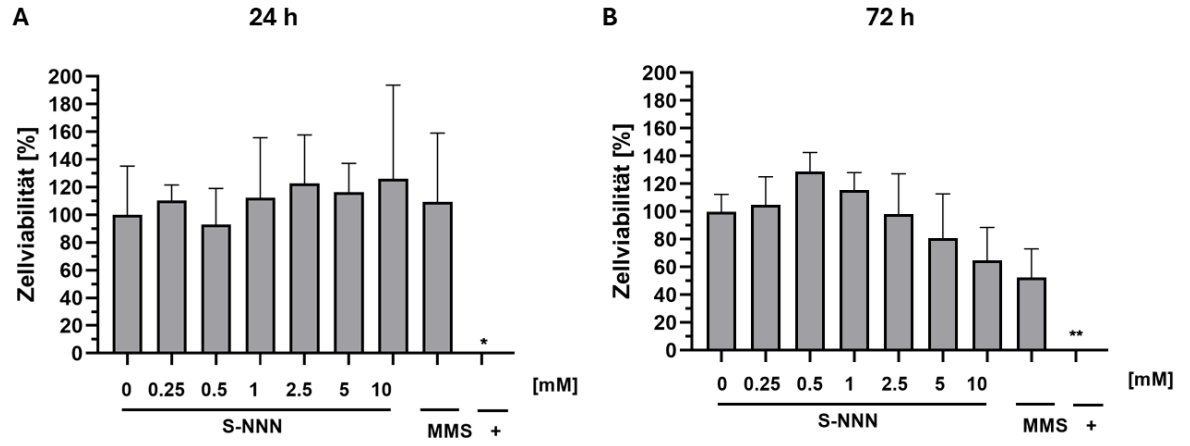

Abbildung 71: Effekt von S-NNN auf die Zellviabilität in HepG2-CYP3A4 Zellen.
A Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. **B** Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 72 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.40 mM) und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; t-test.

Nach beiden Inkubationszeitpunkten waren die Effekte zu schwach, um EC_{50}-Werte abzuleiten (s. Abb. 71 A, 71 B).

4.6.14 HepG2-CYP1A2 Zellen nach Behandlung mit S-NNN

HepG2-CYP1A2 Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen S-NNN (0 - 10 mM) für 24 h und 72 h behandelt. Dann erfolgten Aufarbeitung und Messung zytotoxischer Effekte mittels Zellviabilitätstest. Ähnlich wie im Wildtyp traten zytotoxische Effekte sowohl nach 24 h als auch nach 72 h auf (s. Abb. 72 A, Abb. 72 B).

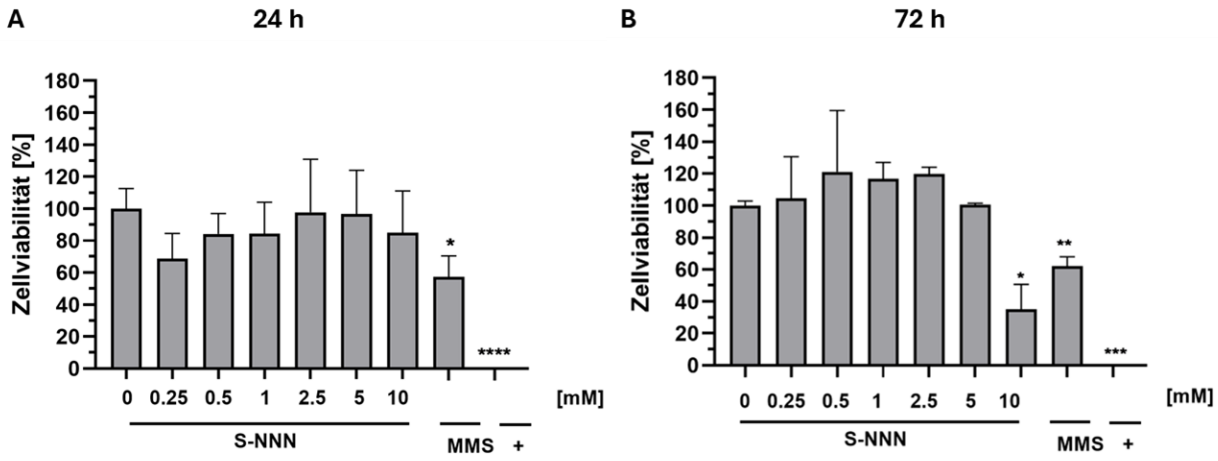

Abbildung 72: Effekt von S-NNN auf die Zellviabilität in HepG2-CYP1A2 Zellen.
A Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. **B** Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 72 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.49 mM) und 0.1% Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; t-test.

Nach 72 h kam es nach Behandlung mit der höchsten Konzentration (10 mM) zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität (s. Abb. 72 B). Nach mathematischer Modellierung ließ sich ein EC_{50}-Wert von 9.59 mM nach 72 h ermitteln (vgl. Abb. 72 B, Tab. 22). Nach 24 h inkubation mit der höchsten Testkonzentration S-NNN kam es in HepG2-CYP1A2 Zellen zu einer Abnahme der Zellviabilität um 14 % (vgl. Abb. 72 A).

4.6.15 HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit S-NNN

Die Behandlung von HepG2-CYP2E1 Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen S-NNN (0 – 10 mM) erfolgte für 24 h und 72 h, bevor die Zellen zur Messung zytotoxischer Effekte geerntet und aufgearbeitet wurden (s. Abb. 73 A, Abb. 73 B).

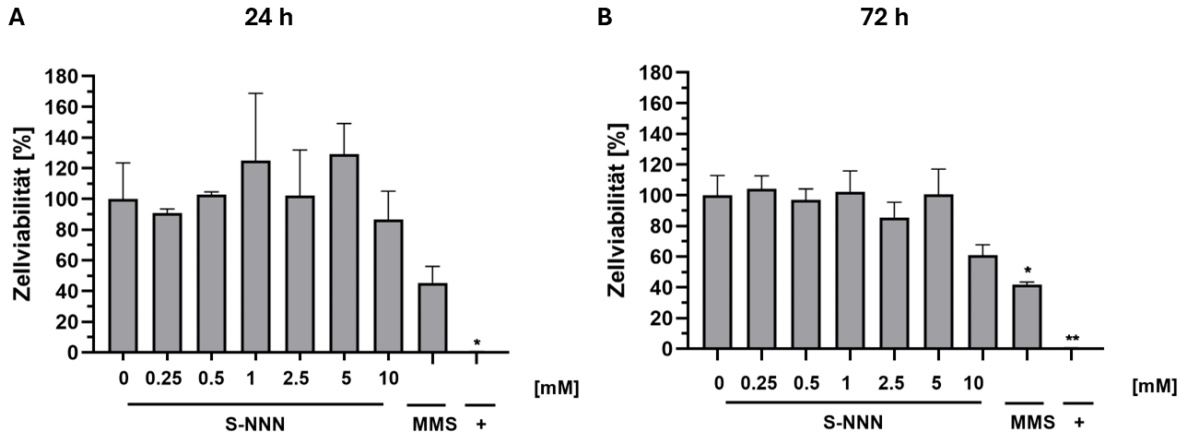

Abbildung 73: Effekt von S-NNN auf die Zellviabilität in HepG2-CYP2E1 Zellen.
Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation (A) und nach 72 h Inkubation (B). Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.58 mM) und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen.*, $p < 0.05$;**, $p < 0.01$; t-test.

Nach 72 h reduzierte S-NNN die Zellviabilität in HepG2-CYP2E1 Zellen um 39 % im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 73 B). Die Effekte waren nicht statistisch signifikant (vgl. Abb. 73).

4.6.16 Zusammenfassung der Zytotoxizitätsdaten in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 nach Behandlung mit strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen

Tabelle 22: Nach mathematischer Modellierung erhaltene EC_{50} -Werte in HepG2 Zellen

Testsubstanz	HepG2		HepG2-CYP3A4		HepG2-CYP1A2		HepG2-CYP2E1	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
CPA	> 9	n.d.	> 9	n.d.	> 9	n.d.	n.d.	n.d.
MMS	0.52	n.d.	0.40	n.d.	0.49	n.d.	0.58	n.d.
NDELA	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
NDMA	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
S-NNN	> 10	9.93	> 10	> 10	> 10	9.59	> 10	> 10

n.d. = nicht detektiert.

Die untersuchten *N*-Nitrosamine NDELA, NDMA und S-NNN induzierten im verwendeten Konzentrationsbereich weder nach 24 h noch nach 72 h ausgeprägte zytotoxische Effekte in den verwendeten Zelllinien HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 (vgl. Tab. 22). S-NNN hatte den größten Einfluss auf die Reduktion der Zellviabilität in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP1A2 Zellen (vgl. Abb. 70, 72, s. Tab. 22). In diesem Zusammenhang konnten für HepG2 Zellen und für HepG2-CYP1A2 Zellen EC_{50}-Werte abgeleitet werden, die knapp unter 10 mM lagen (s. Tab. 22). Die Abnahme der Zellviabilität nach Behandlung mit NDMA und NDELA war in HepG2-CYP2E1 Zellen am deutlichsten ausgeprägt (vgl. Abb. 65, Abb. 69). Im Gegensatz zu CPA wurden durch MMS zytotoxische Effekte induziert, die ebenfalls die Ermittlung von EC_{50}-Werten in den vier Zelllinien ermöglichten (s. Tab. 22). EC_{50}-Werte im Bereich zwischen 0.4 mM und 0.58 mM demonstrieren, dass die Zelllinien ähnlich sensitiv gegenüber von MMS induzierten zytotoxischen Effekten sind (s. Tab. 22). MMS stellt eine geeignete Positivkontrolle für Zellviabilitätsmessungen in HepG2 Zellen dar (vgl. Tab. 22).

4.7 Untersuchung der Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 nach Behandlung mit strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen mittels Western Blot

4.7.1 HepG2 Zellen nach Behandlung mit NDMA

Zur Untersuchung des Effektes von NDMA auf die an der DNA-Schadensantwort beteiligten Proteine p53 und γH2AX wurden HepG2 Zellen mit ansteigenden Konzentrationen NDMA (0 - 10 mM) behandelt. NDMA führte in HepG2 Zellen zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der p53 Proteinintensität (s. Abb. 74 B).

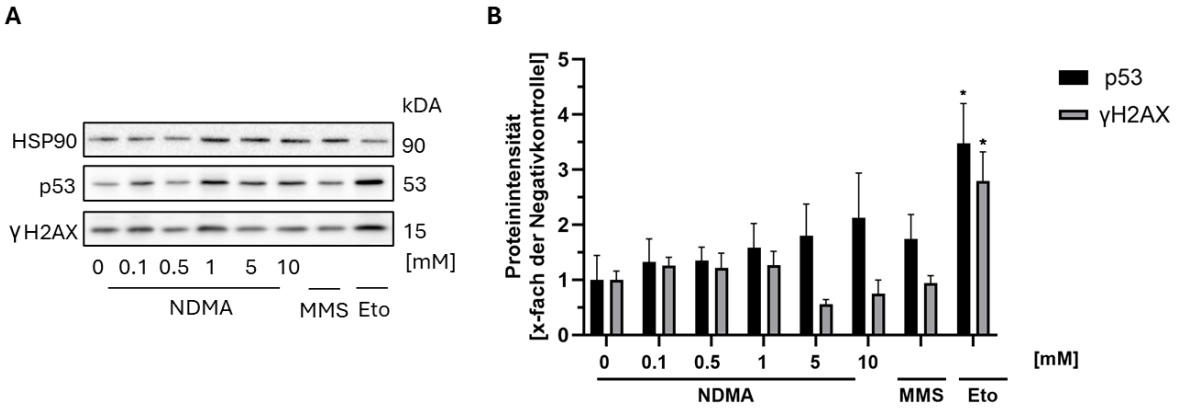

Abbildung 74: Effekt von NDMA auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2 Zellen.
A Repräsentativer Western Blot von HSP90, p53 und γH2AX nach 2 h Inkubation. **B** Densitometrische Auswertung mittels Azure Spot und GraphPad Prism nach 2 h Inkubation. P53 (schwarz), γH2AX (grau). Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.52 mM) und 10 µM Etoposid. Die Proteinintensität der detektierten Proteine wurde auf die Bandenintensität von HSP90 (Ladekontrolle) bezogen. Die Behandlungen wurden auf das korrigierte Verhältnis der negativen Kontrollinkubation (0.5 % DMSO) normalisiert. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; t-test.

Nach 2 h Inkubation mit der höchsten Konzentration wies das p53-Level fast das 2.5-fache der Negativkontrolle auf (s. Abb. 74 B). Auch das γH2AX Proteinlevel wurde bis zu einer Konzentration von 1 mM zunächst schwach induziert (Abb 74 B). Etoposid (Eto) führte zu einem signifikanten Anstieg der p53 Signalintensität (vgl. Abb 74 A, B). Die durch Etoposid vermittelte Wirkung auf das γH2AX Proteinlevel war deutlich ausgeprägt und äußerte sich in einem signifikanten Anstieg im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 74 B). MMS schien keinen Einfluss auf die Proteinintensität von γH2AX in HepG2 zu haben (Abb. 75 B). Das p53 Proteinlevel hingegen wurde durch das direkt wirkende Alkylanz MMS induziert, was auch anhand des repräsentativen Western Blots erkennbar ist (vgl. Abb. 74 A, 74 B).

4.7.2 HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit NDMA

Zur Untersuchung des Effektes von NDMA auf die an der DNA-Schadensantwort beteiligten Proteine p53 und γH2AX in HepG2-CYP3A4 Zellen wurden diese mit ansteigenden Konzentrationen der Substanz (0 - 10 mM) behandelt. Nach 2 h erfolgten Zellernte und Aufarbeitung mittels Western Blot. Auch in HepG2-CYP3A4 Zellen kam es nach 2 h zu einem Anstieg des p53 Proteinlevels nach Inkubation mit NDMA (vgl. Abb. 75 A, B).

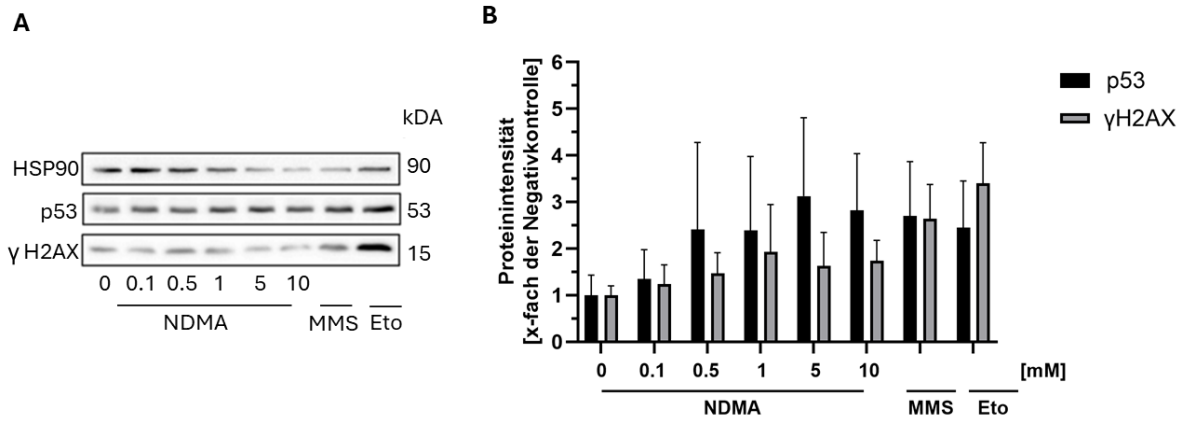

Abbildung 75: Effekt von NDMA auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP3A4 Zellen.
A Repräsentativer Western Blot von HSP90, p53 und γH2AX nach 2 h Inkubation. **B** Densitometrische Auswertung mittels Azure Spot und GraphPad Prism nach 2 h Inkubation. P53 (schwarz), γH2AX (grau). Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.40 mM) und 10 µM Etoposid. Die Proteinintensität der detektierten Proteine wurde auf die Bandenintensität von HSP90 (Ladekontrolle) bezogen. Die Behandlungen wurden auf das korrigierte Verhältnis der negativen Kontrollinkubation (0.5 % DMSO) normalisiert. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten.

Nach Inkubation mit 5 mM ließ sich die höchste Proteinmenge an p53 detektieren, welche um das 3-fache höher war als in der Negativkontrolle (s. Abb. 75 B). Nach Inkubation mit 10 mM sank der Proteinspiegel leicht (Abb. 76 B). 1 mM NDMA induzierte einen im Vergleich zur Negativkontrolle 1.9-fachen Anstieg des γH2AX Proteinlevels (vgl. Abb. 75 B). Höhere Konzentrationen führten zu einem Abfall des Proteinlevels in HepG2-CYP3A4 Zellen (s. Abb. 75 B). Die Positivkontrollen führten auch in dieser Zelllinie zu einem Anstieg der p53 Signalintensität, wobei Eto deutlicher induzierend auf die γH2AX Proteinintensität als auf die p53 Proteinintensität wirkte (vgl. Abb. 75 A, B). Bei MMS hingegen war der Einfluss auf p53 dominant (Abb. 75 B).

4.7.3 HepG2-CYP1A2 Zellen nach Behandlung mit NDMA

Zur Untersuchung des Effektes auf die an der DNA-Schadensantwort beteiligten Proteine p53 und γH2AX in HepG2-CYP1A2 Zellen wurden diese mit NDMA (0 - 10 mM) behandelt und nach 2 h aufgearbeitet (s. Abb. 76). In HepG2-CYP1A2 Zellen kam es durch NDMA nach Inkubation mit Konzentrationen > 0.1 mM zu einem schwach ausgeprägten Anstieg des p53 Signals, was anhand des repräsentativen Western Blots erkennbar ist (s. Abb. 76 A, B

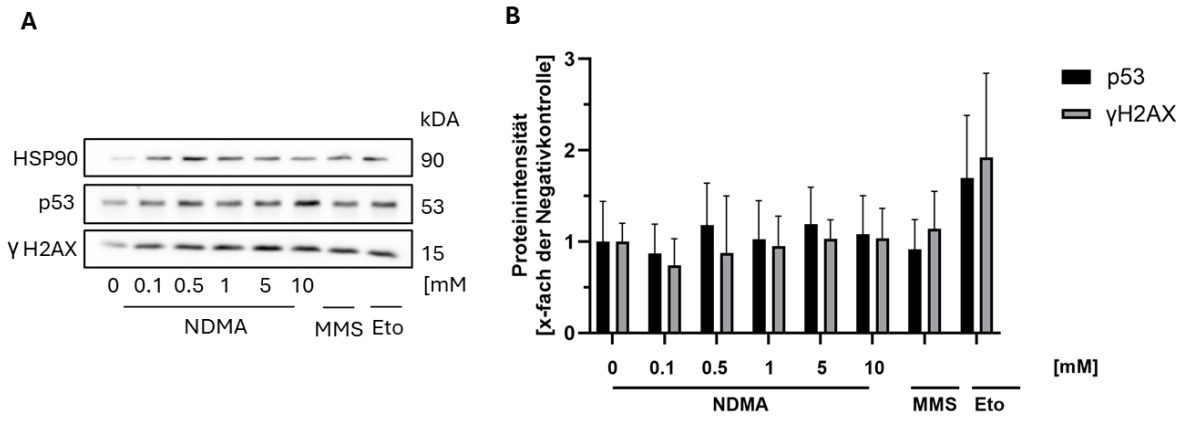

Abbildung 76: Effekt von NDMA auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP1A2 Zellen.
A Repräsentativer Western Blot von HSP90, p53 und γH2AX nach 2 h Inkubation. **B** Densitometrische Auswertung mittels Azure Spot und GraphPad Prism nach 2 h Inkubation. P53 (schwarz), γH2AX (grau). Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.49 mM) und 10 µM Etoposid. Die Proteinintensität der detektierten Proteine wurde auf die Bandenintensität von HSP90 (Ladekontrolle) bezogen. Die Behandlungen wurden auf das korrigierte Verhältnis der negativen Kontrollinkubation (0.5% DMSO) normalisiert. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten.

Der Effekt auf die γH2AX Proteinintensität war schwächer ausgeprägt (Abb. 76 B). Das p53-, und γH2AX Proteinlevel blieben in dieser Zelllinie unbeeinflusst von der Positivkontrolle MMS (Abb. 76 B). Etoposid führte im Vergleich zur Negativkontrolle zu leicht erhöhten Proteinleveln von p53 und γH2AX (s. Abb. 76 B).

4.7.4 HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NDMA

Zur Untersuchung des Effektes von NDMA in HepG2-CYP2E1 Zellen wurden diese mit ansteigenden Konzentrationen (0 – 10 mM) behandelt.

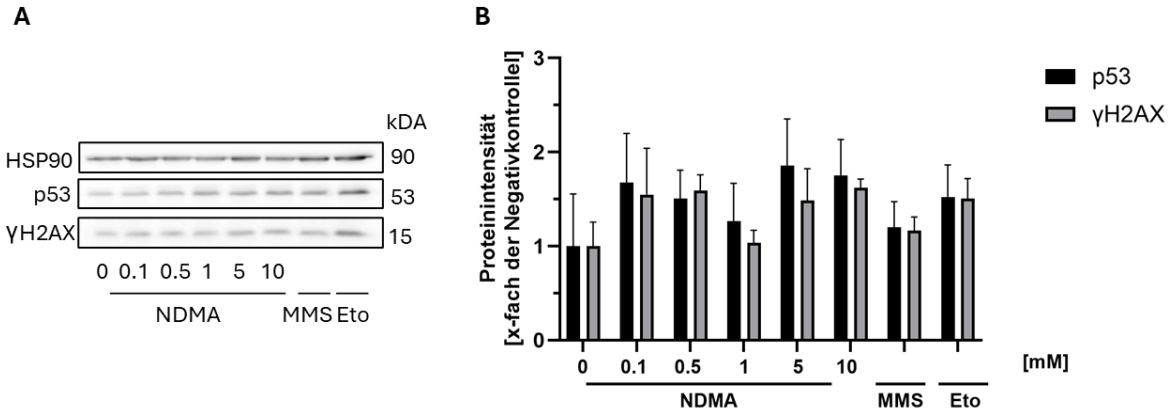

Abbildung 77: Effekt von NDMA auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP2E1 Zellen.
A Repräsentativer Western Blot von HSP90, p53 und γH2AX nach 2 h Inkubation. **B** Densitometrische Auswertung mittels Azure Spot und GraphPad Prism nach 2 h Inkubation. P53 (schwarz), γH2AX (grau). Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.49 mM) und 10 µM Etoposid. Die Proteinintensität der detektierten Proteine wurde auf die Bandenintensität von HSP90 (Ladekontrolle) bezogen. Die Behandlungen wurden auf das korrigierte Verhältnis der negativen Kontrollinkubation (0.5 % DMSO) normalisiert. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten.

NDMA hatte eine induzierende Wirkung auf die Proteinintensitäten von p53 und γH2AX in HepG2-CYP2E1 Zellen (Abb. 77). Maximale Signalintensität, erkennbar an einem im Vergleich zur Negativkontrolle 1.8-fachen Anstieg des p53 Signals, wurde bereits nach Behandlung mit 5 mM erreicht (Abb. 77 B). Für γH2AX war die detektierte Signalintensität mit einem im Vergleich zur Negativkontrolle 1.6-fachen Anstieg maximal und trat nach Behandlung mit 10 mM auf (vgl. Abb. 77 B). NDMA führte mit Ausnahme von HepG2-CYP1A2 Zellen in allen Zelllinien zu einem deutlichen Anstieg des p53 Proteinlevels, der in HepG2-CYP3A4 am deutlichsten ausgeprägt war (vgl. Abb. 74 - 77). Jedoch sollten hohe Fehlerbalken bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden (s. Abb. 74 - 77). In HepG2-CYP1A2 und in HepG2 Zellen blieb das γH2AX Proteinlevel nahezu unbeeinflusst von NDMA (s. Abb. 74, Abb. 76). Die relativ schwachen Effekte auf p53 und γH2AX, welche in HepG2-CYP2E1 Zellen induziert wurden, liegen möglicherweise an der gewählten Inkubationsdauer (vg. Abb. 77).

4.7.5 HepG2 Zellen nach Behandlung mit NDELA

Um den Einfluss von NDELA auf p53 und γH2AX in HepG2 Zellen zu analysieren, wurden diese mit zunehmenden Konzentrationen der Substanz (0 - 10 mM) behandelt. NDELA führte in HepG2 Zellen zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des p53 Proteinlevels, welches nach Inkubation mit 10 mM ungefähr 4.5-fach über dem Proteinlevel der Negativkontrolle lag (Abb. 78 B).

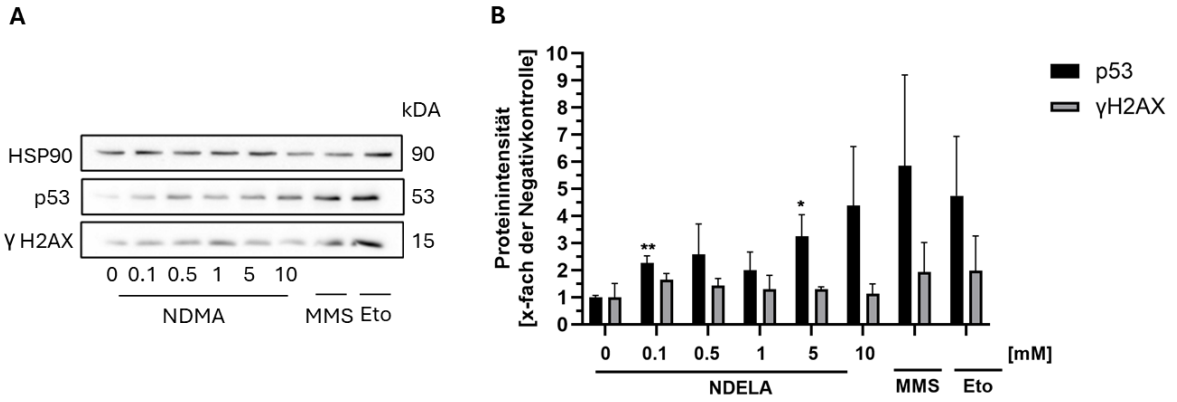

Abbildung 78: Effekt von NDELA auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2 Zellen.
A Repräsentativer Western Blot von HSP90, p53 und γH2AX nach 2 h Inkubation. **B** Densitometrische Auswertung mittels Azure Spot und GraphPad Prism. P53 (schwarz), γH2AX (grau) nach 2 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.52 mM) und 10 µM Etoposid. Die Proteinintensität der detektierten Proteine wurde auf die Bandenintensität von HSP90 (Ladekontrolle) bezogen. Die Behandlungen wurden auf das korrigierte Verhältnis der negativen Kontrollinkubation (0.5 % DMSO) normalisiert. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; t-test.

Konzentrationen > 0.1 mM führten zu einem sehr schwach ausgeprägten Anstieg der γH2AX Proteinintensität (s. Abb. 78 B). Bei Konzentrationen > 1 mM hingegen blieb die Konzentration des an der DNA-Schadensantwort beteiligten Proteins hingegen nahezu unbeeinflusst (Abb. 78 B). Auch die beiden Positivkontrollen entfalteten in dieser Zelllinie schwache Effekte auf das γH2AX Level (Abb. 78 B). P53 wurde in HepG2 Zellen durch beide Positivkontrollen induziert, was auch im repräsentativen Western Blot sichtbar war (s. Abb. 78 A, B).

4.7.6 HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit NDELA

HepG2-CYP3A4 Zellen wurden mit NDELA (0 - 10 mM) behandelt. Nach 2 h erfolgten Zellernte und Aufarbeitung mittels Western Blot. Auch in HepG2-CYP3A4 Zellen führte NDELA zu einem Anstieg des p53 Proteinlevels (Abb. 79 B).

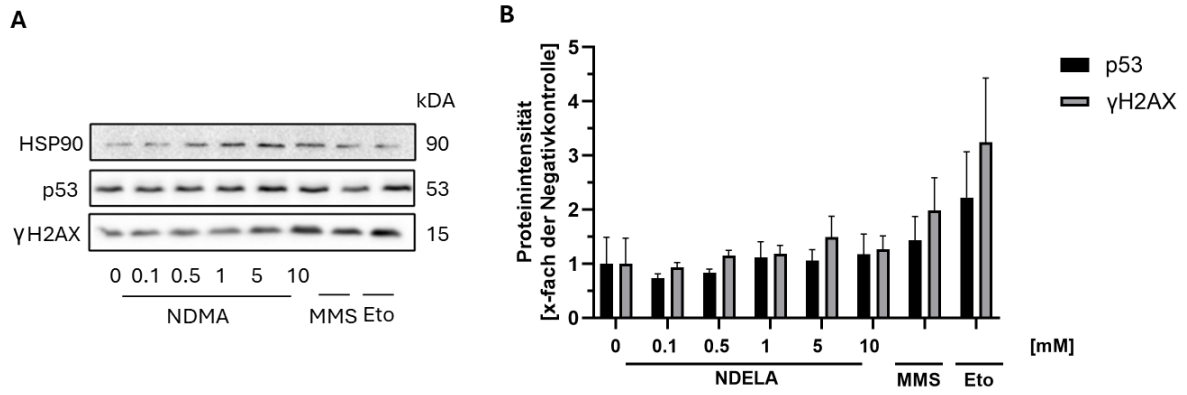

Abbildung 79: Effekt von NDELA auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP3A4 Zellen.
A Repräsentativer Western Blot von HSP90, p53 und γH2AX nach 2 h Inkubation. **B** Densitometrische Auswertung mittels Azure Spot und GraphPad Prism nach 2 h Inkubation. P53 (schwarz), γH2AX (grau). Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50} -Wert von MMS (0.40 mM) und 10 µM Etoposid. Die Proteinintensität der detektierten Proteine wurde auf die Bandenintensität von HSP90 (Ladekontrolle) bezogen. Die Behandlungen wurden auf das korrigierte Verhältnis der negativen Kontrollinkubation (0.5 % DMSO) normalisiert. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten.

Zusätzlich wurde das γH2AX Proteinlevel induziert, wobei das Ausmaß des Effektes sogar etwas deutlicher auf dieses Protein zu sein schien (s. Abb. 79 B). Bei beiden Proteinen korrelierte der Anstieg mit der Höhe der Konzentration (Abb. 79 B). Die beiden Positivkontrollen Etoposid und MMS bewirkten ebenfalls eine Zunahme der Konzentrationslevel beider Proteine, wobei der Einfluss auf γH2AX dominierte (s. Abb. 79) B. Der durch Etoposid vermittelte Anstieg war hierbei intensiver ausgeprägt als der durch MMS induzierte Anstieg (s. Abb. 79 B).

4.7.7 HepG2-CYP1A2 Zellen nach Behandlung mit NDELA

Zur Untersuchung des Effektes von NDELA auf die an der DNA-Schadensantwort beteiligten Proteine p53 und γH2AX in HepG2-CYP1A2 Zellen wurden diese mit ansteigenden Konzentrationen der Substanz (0 - 10 mM) behandelt. Nach 2 h erfolgten Zellernte und Aufarbeitung mittels Western Blot. In HepG2-CYP1A2 Zellen führte NDELA bis 0.5 mM (p53) bzw 1 mM (γH2AX) zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Proteinintensitäten von p53 und γH2AX (Abb. 80).

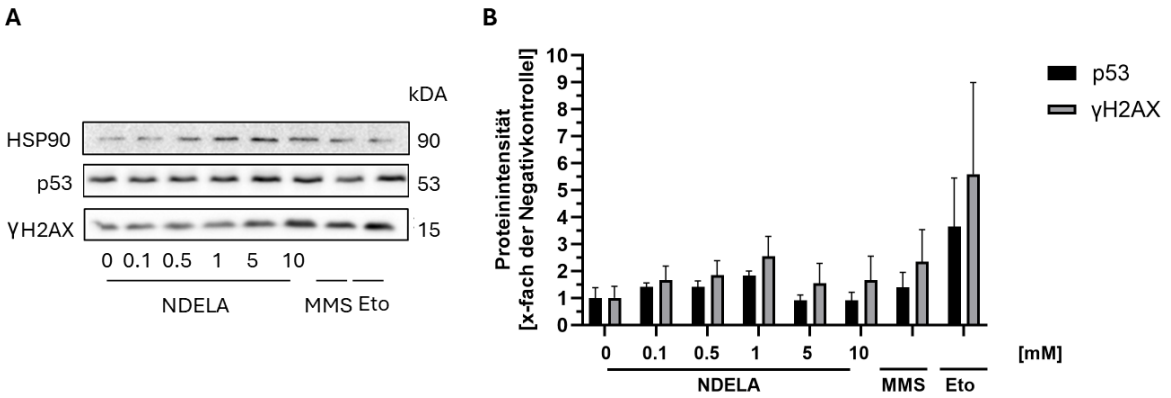

Abbildung 80: Effekt von NDELA auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP1A2 Zellen.
A Repräsentativer Western Blot von HSP90, p53 und γH2AX nach 2 h Inkubation. **B** Densitometrische Auswertung mittels Azure Spot und GraphPad Prism nach 2 h Inkubation. P53 (schwarz), γH2AX (grau). Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.49 mM) und 10 µM Etoposid. Die Proteinintensität der detektierten Proteine wurde auf die Bandenintensität von HSP90 (Ladekontrolle) bezogen. Die Behandlungen wurden auf das korrigierte Verhältnis der negativen Kontrollinkubation (0.5 % DMSO) normalisiert. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten.

Nach Inkubation mit höheren Konzentrationen sank die Menge beider Proteine ab, wobei das Level für γH2AX stets über dem Level der Negativkontrolle blieb (vgl. Abb 80 B). Das Proteinlevel von p53 sank hingegen unterhalb des Levels Negativkontrolle. NDELA hatte größeren Einfluss auf die Konzentration von γH2AX als auf das p53 Proteinlevel (Abb. 80 B). MMS und Etoposid induzierten sowohl die Proteinlevel von p53 als auch von γH2AX, wobei letzteres jeweils deutllicher beeinflusst wurde (Abb. 80 B). Die durch die Positivkontrolle Eto hervorgerufene Induktion beider Proteine war deutlicher ausgeprägt, was auch im repräsentativen Western Blot erkennbar war (s. Abb 80 A).

4.7.8 HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NDELA

Zur Untersuchung des Effektes von NDELA auf die an der DNA-Schadensantwort beteiligten Proteine p53 und γH2AX wurden HepG2-CYP2E1 Zellen mit ansteigenden Konzentrationen (0 - 10 mM) behandelt und nach 2 h mittels Western Blot aufgearbeitet. P53 stieg nach Behandlung mit NDELA an, wobei keine statistisch signifikanten Ergebnisse detektierbar waren (vgl. Abb. 81 B).

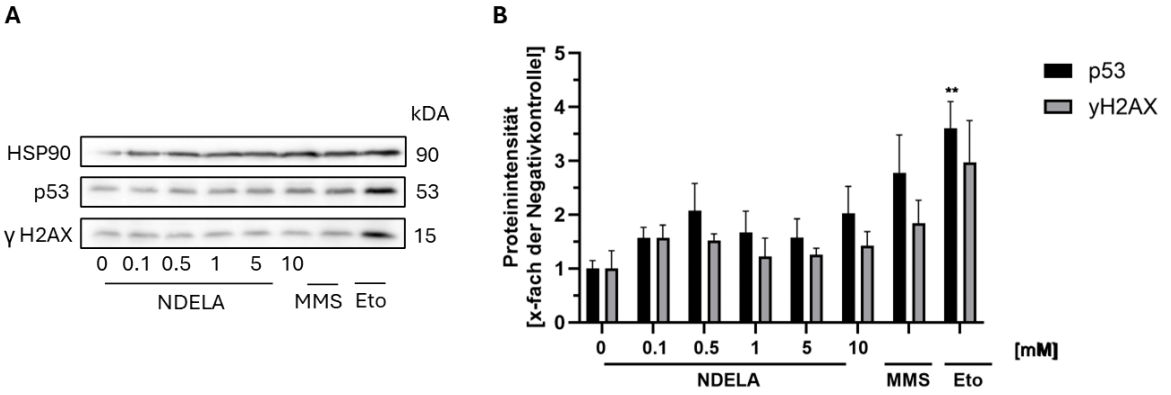

Abbildung 81: Effekt von NDELA auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP2E1 Zellen.
A Repräsentativer Western Blot von HSP90, p53 und γH2AX nach 2 h Inkubation. **B** Densitometrische Auswertung mittels Azure Spot und GraphPad Prism nach 2 h Inkubation. P53 (schwarz), γH2AX (grau). Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.49 mM) und 10 µM Etoposid. Die Proteinintensität der detektierten Proteine wurde auf die Bandenintensität von HSP90 (Ladekontrolle) bezogen. Die Behandlungen wurden auf das korrigierte Verhältnis der negativen Kontrollinkubation (0.5 % DMSO) normalisiert. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten.

Auch das Proteinlevel von γH2AX stieg nach Behandlung an (Abb. 81 B). Für das p53 Signal war bereits nach Behandlung mit 0.5 mM ein 2-facher Anstieg im Vergleich zur Negativkontrolle und damit die maximale Signalintensität detektierbar, während diese für das γH2AX Proteinlevel nach Behandlung mit 0.1 mM erreicht wurde (s. Abb. 81 B). Eine im Vergleich zur Negativkontrolle 1.5-fach erhöhte Proteinmenge wurde hier als maximaler Anstieg detektiert (Abb. 82 B). In HepG2 und in HepG2-CYP2E1 Zellen wurde das p53 Proteinlevel durch NDELA in größerem Ausmaß beeinflusst als das γH2AX Proteinlevel (vgl. Abb. 78, Abb. 81). Hierbei fiel insbesondere die deutliche Zunahme des p53Levels inHepG2 Zellen auf, die einen konzentrationsabhängigen Verlauf aufweist und nach Behandlung mit 0.1 mM und 5 mM signifikant war Abb. 78 B). In HepG2-CYP3A4 und HepG2-CYP1A2 Zellen kam es nach Behandlung mit NDELA zu einem gegenüber dem p53 Proteinanstieg deutlicheren Anstieg des γH2AX-Levels, wobei der Effekt in HepG2-CYP1A2 Zellen intensiver ausgeprägt war (s. Abb. 79, Abb. 80).

4.7.9 HepG2-Zellen nach Behandlung mit S-NNN

HepG2 Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen S-NNN (0 - 10 mM) behandelt. Nach 2 h erfolgten Zellernte und Aufarbeitung. S-NNN führte nach Inkubation bis 5 mM zu einem leichten Anstieg des p53 Proteinlevels im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 82 B).

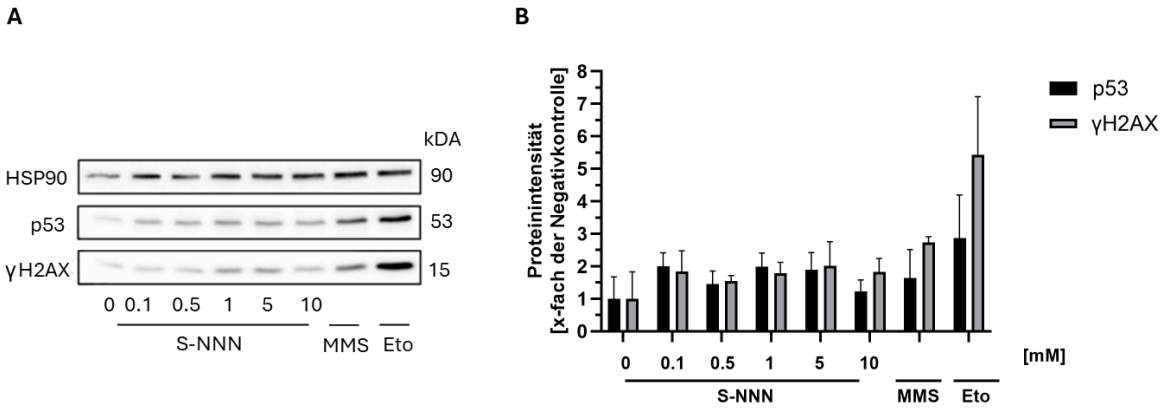

Abbildung 82: Effekt von S-NNN auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2 Zellen.
A Repräsentativer Western Blot von HSP90, p53 und γH2AX nach 2 h Inkubation. **B** Densitometrische Auswertung mittels Azure Spot und GraphPad Prism nach 2 h Inkubation. P53 (schwarz), γH2AX (grau). Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.52 mM) und 10 µM Etoposid. Die Proteinintensität der detektierten Proteine wurde auf die Bandenintensität von HSP90 (Ladekontrolle) bezogen. Die Behandlungen wurden auf das korrigierte Verhältnis der negativen Kontrollinkubation (0. 5% DMSO) normalisiert. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten.

Höhere Konzentrationen führten zu einer Abnahme der Menge des p53 Proteins, die bei 10 mM ungefähr dem Level der Negativkontrolle entsprach (s. Abb. 82 B). Das Proteinlevel von γH2AX erreichte nach Behandlung mit 5 mM ein Maximum. Wie für die p53 Proteinmenge war eine etwa 2-fach erhöhte Menge gegenüber der Negativkontrolle feststellbar (vgl. Abb. 82 B).

4.7.10 HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit S-NNN

Zur Untersuchung des Einflusses von S-NNN auf die an der DNA-Schadensantwort beteiligten Proteine p53 und γH2AX in HepG2-CYP3A4 Zellen wurden diese mit aufsteigenden Konzentrationen des Nitrosamins (0 - 10 mM) behandelt. Nach 2 h erfolgten Zellernte und Aufarbeitung gemäß dem Western Blot Protokoll. Beide Proteine wurden in HepG2-CYP3A4 Zellen durch S-NNN induziert, wobei dieser Effekt bereits nach Behandlung mit 0.1 mM eintrat (Abb. 83 A, B). Der konzentrationsabhängige Anstieg von p53 und γH2AX war in den repräsentativen Western Blot Aufnahmen nach Behandlung mit 0 mM bis 5 mM erkennbar (vgl. Abb. 83 A). 0.1 mM S-NNN führte zu einem Anstieg des γH2AX Proteinlevels, jedoch sollte die hohe Standardabweichung bei der Interpretation berücksichtigt werden.

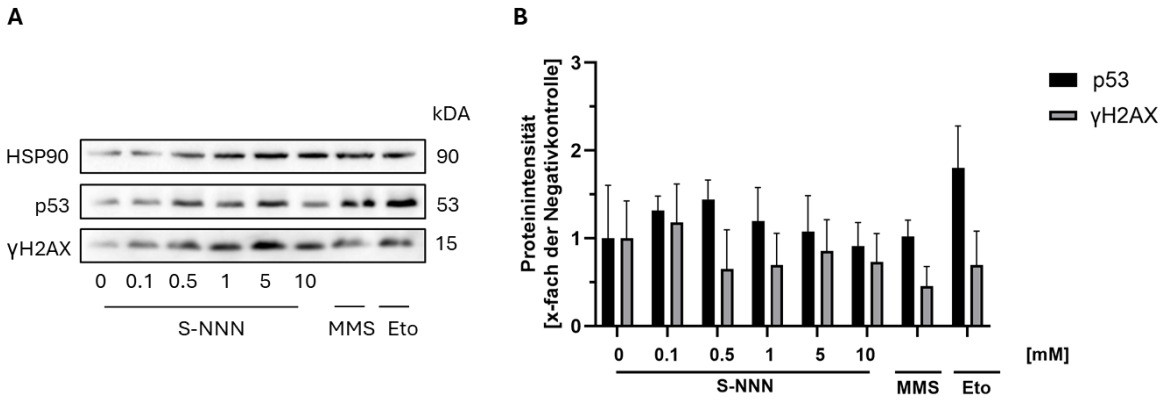

Abbildung 83: Effekt von S-NNN auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP3A4 Zellen.
A Repräsentativer Western Blot von HSP90, p53 und γH2AX nach 2 h Inkubation. **B** Densitometrische Auswertung mittels Azure Spot und GraphPad Prism nach 2 h Inkubation. P53 (schwarz), γH2AX (grau). Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.40 mM) und 10 µM Etoposid. Die Proteinintensität der detektierten Proteine wurde auf die Bandenintensität von HSP90 (Ladekontrolle) bezogen. Die Behandlungen wurden auf das korrigierte Verhältnis der negativen Kontrollinkubation (0.5 % DMSO) normalisiert. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten.

Konzentrationen > 0.1 mM bewirkten keine weitere Zunahme der Proteinintensitäten von p53 und γH2AX (s.Abb. 83 B).S-NNN beeinflusste das p53 Proteinlevel deutlicher als das γH2AX Proteinlevel. Der Effekt war nach Behandlung mit 0.5 mM maximal und äußerte sich in einem 1.4-fachen Anstieg im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 83 B). Behandlung mit S-NNN führte zu keinem Anstieg des γH2AX Levels. Eine Ausnahme stellte der zu beobachtende Anstieg nach Behandlung mit 0.1 mM S-NNN dar. MMS und Eto induzierten in dieser Zelllinie ausschließlich einen Anstieg des p53 Proteinlevels (Abb. 84B). Die Proteinintensität von γH2AX stieg nach Behandlung mit MMS und Eto im Vergleich zur Negativkontrolle nicht an.

4.7.11 HepG2-CYP1A2 Zellen nach Behandlung mit S-NNN

Um den Effekt von S-NNN auf die an der DNA-Schadensantwort beteiligten Proteine p53 und γH2AX in HepG2-CYP1A2 Zellen zu untersuchen, wurden diese mit ansteigenden Konzentrationen der Substanz (0 - 10 mM) behandelt. Nach 2 h erfolgten Zellernte und Aufarbeitung mittels Western Blot. S-NNN führte in HepG2-CYP1A2 Zellen zu einem leicht ausgeprägten Anstieg des γH2AX Signals, der bereits nach Inkubation mit niedrigen Konzentrationen eintrat (s. Abb. 84 B). Das Proteinlevel von p53 hingegen wurde durch S-NNN in konzentrationsabhängiger Weise und in deutlichem Ausmaß induziert (Abb. 84 B). Die p53 Proteinmenge erreichte nach Inkubation mit 10 mM die 8-fache Menge der Negativkontrolle (vgl. Abb. 84 B).

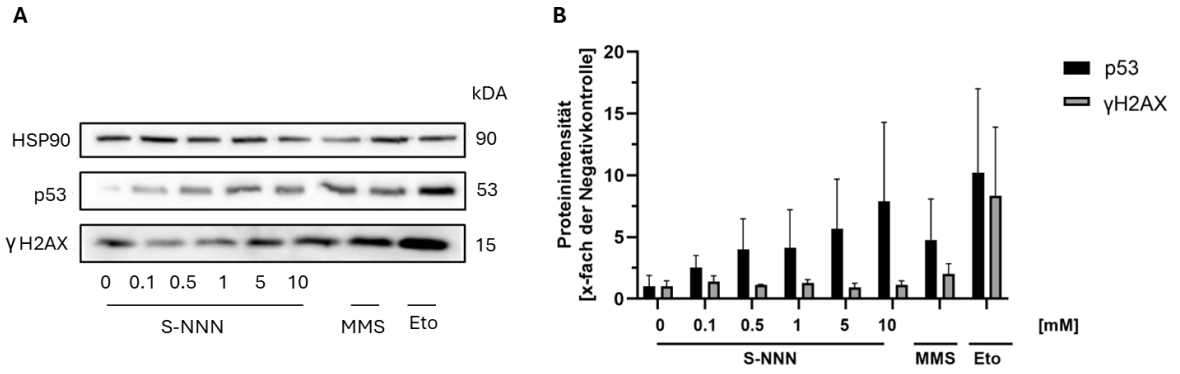

Abbildung 84: Effekt von S-NNN auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP1A2 Zellen.
A Repräsentativer Western Blot von HSP90, p53 und γH2AX nach 2 h Inkubation. **B** Densitometrische Auswertung mittels Azure Spot und GraphPad Prism nach 2 h Inkubation. P53 (schwarz), γH2AX (grau). Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.49 mM) und 10 µM Etoposid. Die Proteinintensität der detektierten Proteine wurde auf die Bandenintensität von HSP90 (Ladekontrolle) bezogen. Die Behandlungen wurden auf das korrigierte Verhältnis der negativen Kontrollinkubation (0.5 % DMSO) normalisiert. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten.

Die Proteinlevel von p53 und γH2AX wurden zudem stark von Etoposid beeinflusst (vgl. Abb. 84 B). Bei der Interpretation der Ergebnisse sind die hohen Standardabweichungen zwischen den einzelnen biologischen Replikaten zu berücksichtigen (vgl. Abb. 84 B).

4.7.12 HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit S-NNN

Zur Untersuchung des Effektes von S-NNN auf die DNA-Schadensmarkerproteine p53 und γH2AX in HepG2-CYP2E1 Zellen wurden diese mit ansteigenden Konzentrationen S-NNN behandelt. Behandlung von HepG2-CYP2E1 Zellen mit S-NNN führte zu einem Anstieg der p53 und γH2AX Proteinlevel, wobei der Anstieg der p53 Proteinintensität deutlicher ausgeprägter war (Abb. 85). In HepG2-CYP2E1 Zellen trat ein im Vergleich zur Negativkontrolle 1.9-fach ausgeprägter Anstieg nach Behandlung mit 1 mM S-NNN auf (Abb. 85 B) Ein im Vergleich zur Negativkontrolle 1.5-facher Anstieg des γH2AX Signals wurde durch Behandlung mit 0.1 mM S-NNN hervorgerufen und beschrieb das maximal detektierbare Proteinlevel (s. Abb. 85 B). In allen Zelllinien hatte S-NNN größeren Einfluss auf das p53 Proteinlevel als auf das γH2AX Proteinlevel (vgl. Abb. 82-85). In HepG2-CYP1A2 Zellen waren nach Behandlung mit S-NNN für das p53 Proteinlevel die deutlichsten Effekte messbar, was sich anhand eines fast 8-fachen Anstiegs gegenüber der Negativkontrolle äußerte (s. Abb. 84 B). Effekte auf das p53 Proteinlevel waren in HepG2 und in HepG2-CYP2E1 Zellen von gleichem Ausmaß und resultierten in einem etwa zweifachen Anstieg des Proteinlevels gegenüber der Negativkontrolle (s. Abb. 82, Abb. 85).

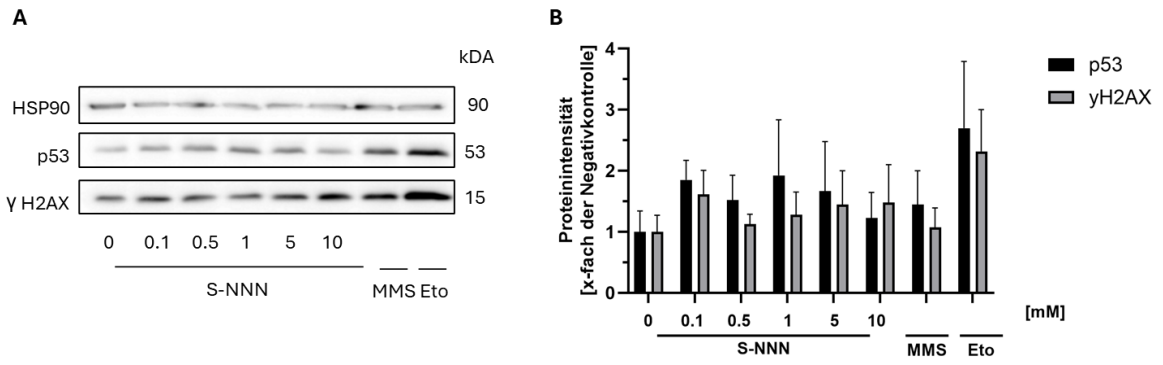

Abbildung 85: Effekt von S-NNN auf das Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP2E1 Zellen. **A** Repräsentativer Western Blot von HSP90, p53 und γH2AX nach 2 h Inkubation. **B** Densitometrische Auswertung mittels Azure Spot und GraphPad Prism nach 2 h Inkubation. P53 (schwarz), γH2AX (grau). Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.49 mM) und 10 µM Etoposid. Die Proteinintensität der detektierten Proteine wurde auf die Bandenintensität von HSP90 (Ladekontrolle) bezogen. Die Behandlungen wurden auf das korrigierte Verhältnis der negativen Kontrollinkubation (0.5 % DMSO) normalisiert. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten.

S-NNN führte zu einem 1.4-fachen Anstieg des p53 Signals in HepG2-CYP3A4 Zellen.

4.7.13 Zusammenfassung der Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 nach Behandlung mit strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen

Die relativen Proteinintensitäten von γH2AX und p53 nach Behandlung von HepG2 Zelllinien mit NDMA, NDELA und S-NNN sind in Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23: Zusammenfassung der mit Western Blot erhobenen Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2 Zellen

Testsubstanz		HepG2	HepG2-CYP3A4	HepG2-CYP1A2	HepG2-CYP2E1
NDMA	**p53**	**2.3**	**3.0 (5 mM)***	**1.25 (0.1 mM)***	**1.8 (5 mM)***
	γH2AX	**1.3 (1mM)***	**1.9 (1 mM)***	**1.1 (5 mM)***	**1.6**
NDELA	**p53**	**4.5**	**1.25**	**1.9 (1 mM)***	**2.0 (0.5 mM)***
	γH2AX	**1.7 (0.1 mM)***	**1.5 (5 mM)**	**2.5 (1 mM)***	**1.5 (0.1 mM)***
S-NNN	**p53**	**1.9 (0.1 mM)***	**1.4 (0.5 mM)***	**8.0**	**1.9 (1 mM)***
	γH2AX	**1.9 (5 mM)***	**1.2 (0.1 mM)***	**1.2 (0.1 mM)***	**1.5 (0.1 mM)***

*: Von maximaler Testkonzentration abweichende Konzentrationen die zu maximalen Unterschieden in der Proteinintensität von p53 und γH2AX im Vergleich zur Negativkontrolle geführt haben, sind in Klammern angegeben

Die stärksten Effekte auf die Proteinintensität von p53 und γH2AX wurden durch NDMA in HepG2-CYP3A4 Zellen induziert (vgl. Tab. 23). In HepG2 Zellen induzierte NDMA ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Proteinintensität von p53 im Vergleich zur Negativkontrolle (vgl. Tab. 23, Abb. 74 B) NDELA hatte mit einem im Vergleich zur Negativkontrolle 4.5-fachen Anstieg den größten Einfluss auf die Proteinintensität von p53 in HepG2 Zellen, während der Effekt auf γH2AX in HepG2-CYP1A2 Zellen am größten war (vgl. Abb. 78 B, Abb. 80 B, s. Tab. 23). Der Effekt von NDMA und S-NNN auf die Proteinintensität von p53 war in allen Zelllinien deutlicher ausgeprägt als auf γH2AX (vgl. Tab. 23, Abb. 74-77, Abb. 82 - 85). NDELA hingegen nahm in zwei der vier Zelllinien, darunter HepG2-CYP3A4 und HepG2-CYP1A2 Zellen größeren Einfluss auf das γH2AX Proteinlevel als auf die Proteinintensität von p53 (s. Abb. 79, Abb. 80). Der Effekt von S-NNN auf p53 war in HepG2-CYP1A2 Zellen am stärksten ausgeprägt, was durch eine 8-fache Steigerung der Proteinintensität im Vergleich zur Negativkontrolle demonstriert werden konnte (s. Abb. 84). Den deutlichsten Effekt auf das γH2AX Proteinlevel hatte S-NNN mit einem 1.9-fachen Anstieg im Vergleich zur Negativkontrolle in HepG2 Zellen (vgl. Tab. 23, Abb. 82). Die durch NDELA in HepG2 Zellen hervorgerufenen Effekte auf die p53 Proteinintensität waren signifikant (s. Abb. 78 B).

4.8 Untersuchung der Genotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 mittels Comet Assay

4.8.1 HepG2 und HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit NDMA

HepG2 und HepG2-CYP3A4 Zellen wurden mit anfsteigenden Konzentrationen NDMA (0 – 10 mM) behandelt. Nach 2 h (MMS 1 h) erfolgten Ernte und Aufarbeitung mittels Comet Assay. NDMA erzeugte in HepG2 Zellen Strangbrüche der DNA, wobei das Ausmaß der Effekte mit zunehmenden Konzentrationen anstieg (Abb. 86 A). NDMA führte in diesem Zusammenhang zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle (vgl. Abb.86 A). Eine Ausnahme stellte die Behandlung mit 0.5 mM NDMA dar (s. Abb. 86 A). Für diese Konzentration konnte keine statistisch signifikante Induktion von Strangbrüchen in HepG2 Zellen festgestellt werden (s. Abb.86 A). Die repräsentativen Aufnahmen nach Datenprozessierung, welche mit der Comet IV

Software erzeugt wurden, reflektieren strangbruchinduzierende Effekte von NDMA in HepG2 Zellen(vgl. Abb. 86 C).

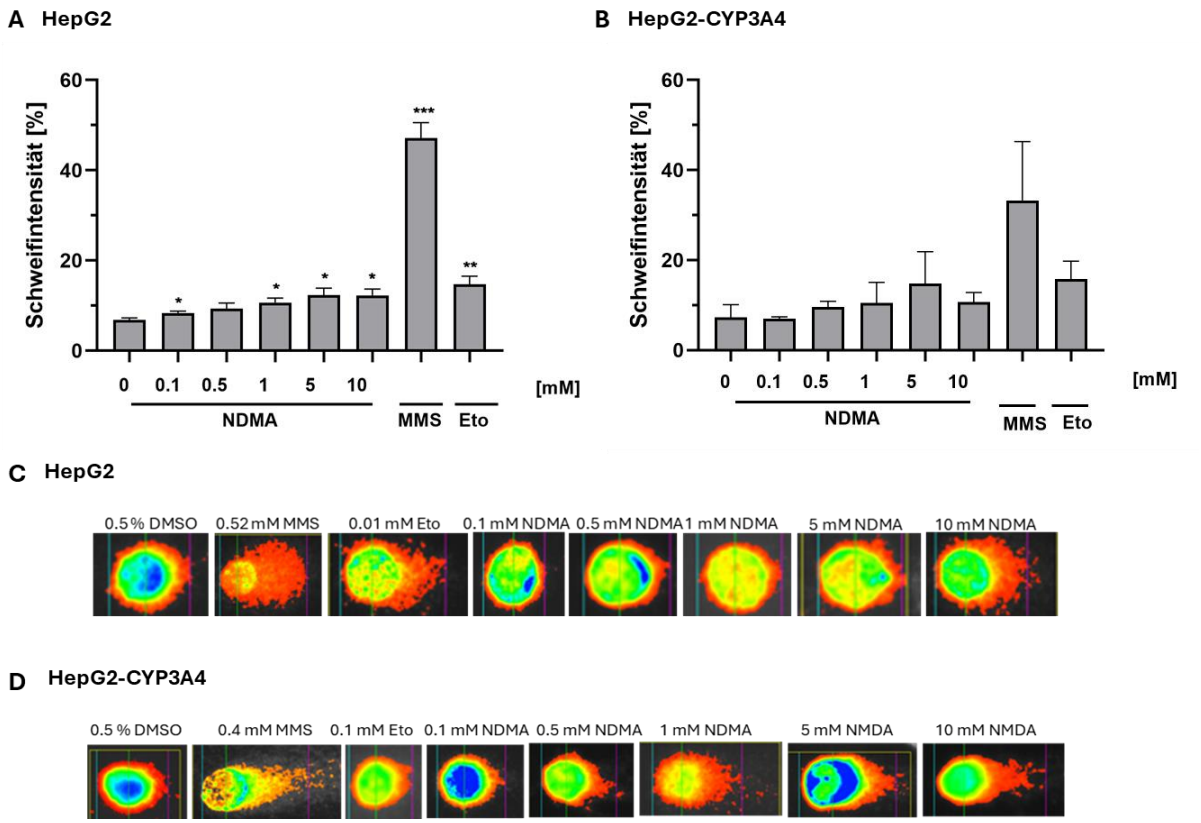

Abbildung 86: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDMA in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP3A4 Zellen. **A** Schweifintensität [%] von NDMA in HepG2 Zellen nach 2 h Inkubation. **B** Schweifintensität [%] von NDMA in HepG2-CYP3A4 Zellen nach 2 h Inkubation. **C** Repräsentative Bilder von HepG2 Zellen nach Behandlung mit NDMA und Datenverarbeitung mit Comet IV nach 2 h Inkubation. **D** Repräsentative Bilder von HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit NDMA und Datenverarbeitung mit Comet IV nach 2 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.52 mM; HepG2 und 0.40; HepG2-CYP3A4) und 10 µM Etoposid. 0.5 % DMSO diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden 1 h lang mit MMS behandelt. Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen pro Experiment. Dargestellt ist der Mittelwert der Mediane aus insgesamt 3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; t-test.

Die verwendete Positivkontrolle MMS, induzierte nach 1 h sichtbare Strangbrüche, was sich in einem signifikanten Anstieg der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle äußerte (s. Abb. 86 A). Etoposid induzierte innerhalb der 2 h einen signifikanten Anstieg der Schweifintensität (vgl. Abb 86 A, C). In HepG2-CYP3A4 Zellen kam es nach Behandlung mit NDMA zu einer Strangbruchformation mit ansteigenden Testkonzentrationen, welche nach Behandlung mit 5 mM das zweifache Ausmaß der Negativkontrolle erreichte (s. Abb. 86 B, D). Die Behandlung mit der höchsten Testkonzentration (10 mM) führte zu keiner weiteren Erhöhung der beiden Parameter (Abb. 86 B, D). Die Effekte waren nicht signifikant (vgl. Abb. 86). MMS induzierte

Strangbrüche, was sich sowohl im Ausmaß des Anstieges der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle als auch anhand der repräsentativen Aufnahmen mit Comet IV widerspiegelte (vgl. Abb. 86 B, D). Die Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle lag bei 2.0 für den medianbasierten Wert (s. Abb. 86 B). Etoposid induzierte ebenfalls einen Anstieg der medianbasierten Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 86 B).

4.8.2 HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NDMA

HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen NDMA (0 - 10 mM) behandelt. Nach 2 h (MMS 1 h) erfolgten Ernte und Aufarbeitung mittels Comet Assay. Das messbare DNA-Strangbruchlevel nach Behandlung mit NDMA stieg mit zunehmenden Konzentrationen bis 1 mM in HepG2-CYP1A2 Zellen minimal an (s. Abb. 87 A).

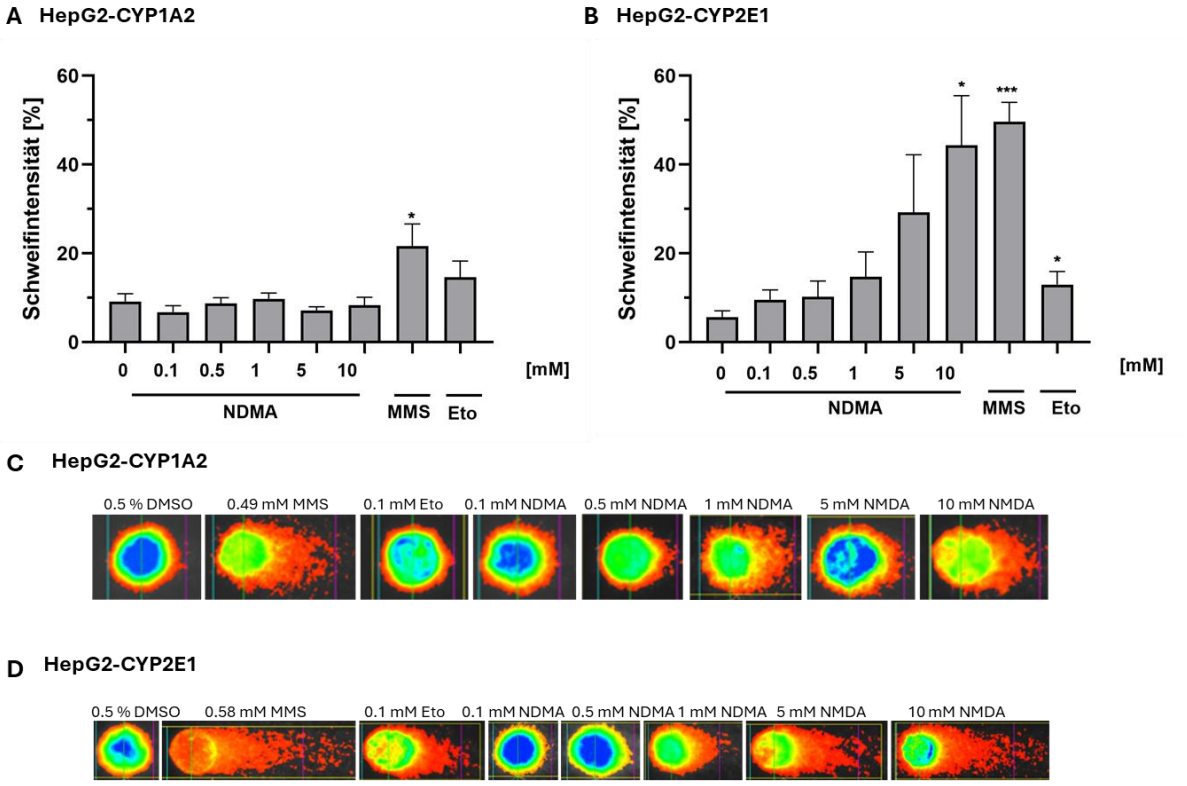

Abbildung 87: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDMA in HepG2-CYP1A2 Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen.

A Schweifintensität [%] von NDMA in HepG2-CYP1A2 Zellen nach 2 h Inkubation. **B** Schweifintensität [%] von NDMA in HepG2-CYP2E1 Zellen nach 2 h Inkubation. **C** Repräsentative Bilder von HepG2-CYP1A2 Zellen nach Behandlung mit NDMA und Datenverarbeitung mit Comet IV nach 2 h Inkubation. **D** Repräsentative Bilder von HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NDMA und Datenverarbeitung mit Comet IV nach 2 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.49 mM; HepG2-CYP1A2 und 0.58; HepG2-CYP2E1) und 10 µM Etoposid. 0.5 % DMSO diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden 1 h lang mit MMS behandelt. Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen pro Experiment. Dargestellt ist der Mittelwert der Mediane aus insgesamt 3 Experimenten.

Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001; t-test.

Dies war auch anhand repräsentativer Aufnahmen von nahezu ungeschädigten Zellen nach Softwareprozessierung erkennbar (s. Abb. 87 C). MMS induzierte hingegen in deutlicherem Ausmaß Strangbrüche, was sich in einem signifikanten Anstieg der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle äußerte (87 A). Etoposid verursachte auch in dieser Zelllinie kaum messbare DNA-Schäden innerhalb des Inkubationszeitraumes (vgl. 87 A). NDMA induzierte in konzentrationsabhängiger Weise Strangbrüche in HepG2-CYP2E1 Zellen, was anhand der im Vergleich zur Negativkontrolle ansteigenden Schweifintensität erkennbar war (vgl. Abb 87 B). Der maximale Effekt trat nach Inkubation mit 10 mM auf, weist statistische Signifikanz auf und führte zu einer im Vergleich zur Negativkontrolle 7.8-fach erhöhten, medianbasierten Schweifintensität (87 B). Zusammenfassend führte NDMA in HepG2-CYP2E1 Zellen zur deutlichen Induktion des DNA-Strangbruchlevels (vgl. Abb. 87 B, D). Vergleichsweise schwach waren die Effekte in HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und in HepG2 Zellen (s. Abb. 86 A, B und Abb. 87 A). In HepG2 und in HepG2-CYP3A4 Zellen induzierte NDMA einen maximalen Anstieg der medianbasierten Schweifintensität von 1.8 - 2 im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 86 A, B). Dennoch bleibt festzuhalten, dass der in HepG2 messbare Anstieg mit ansteigenden Konzentrationen korrellierte und statistisch signifikant war (vgl. Abb. 86 A). In HepG2-CYP1A2 Zellen hingegen wurden durch NDMA keine ausgeprägten DNA-strangbruchinduzierenden Effekte induziert (s. Abb. 87 A, C).

4.8.3 HepG2 und HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit NDELA

Die Zellen wurden für 2 h mit NDELA (0 – 10 mM) und für 1 h mit MMS inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung mittels Comet Assay. NDELA induzierte in HepG2 Zellen keinen signifikanten Anstieg der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle (vgl. Abb. 88 A, C). Die beiden Positivkontrollen MMS und Eto führten im Vergleich zur Negativkontrolle zu statistisch signifikanten DNA-Strangbrüchen (s. Abb. 88 A). Dies ist auch anhand der repräsentativen Comet Aufnahmen erkennbar (s. Abb. 88 C). NDELA führte in HepG2-CYP3A4 Zellen zu keinem signifikanten Anstieg der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb 88 B). Dieses Resultat wird ebenso anhand der repräsentativen Bilder nach Datenprozessierung mit Comet IV deutlich (Abb. 88 D).

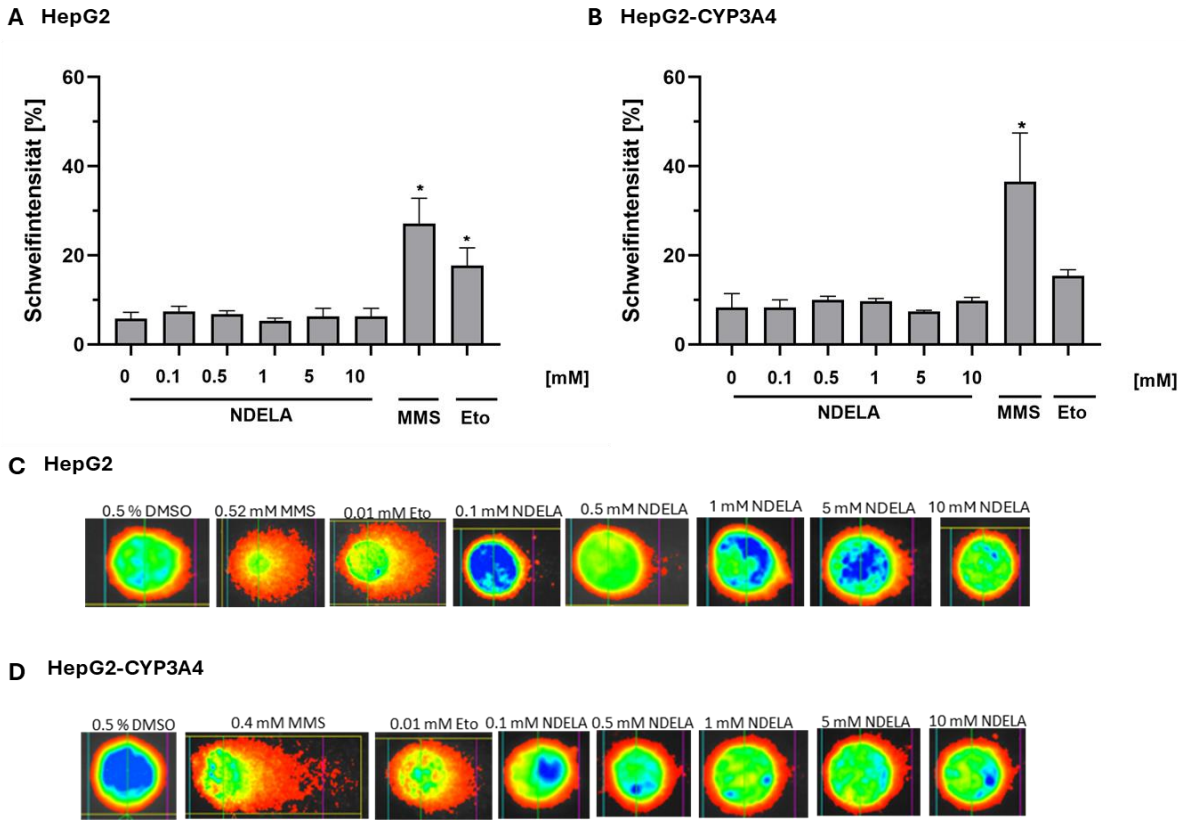

Abbildung 88: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDELA in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP3A4 Zellen. **A** Schweifintensität [%] von NDELA in HepG2 Zellen nach 2 h Inkubation. **B** Schweifintensität [%] von NDELA in HepG2-CYP3A4 Zellen nach 2 h Inkubation. **C** Repräsentative Bilder von HepG2 Zellen nach Behandlung mit NDELA und Datenverarbeitung mit Comet IV nach 2 h Inkubation. **D** Repräsentative Bilder von HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit NDELA und Datenverarbeitung mit Comet IV nach 2 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.52 mM; HepG2 und 0.40; HepG2-CYP3A4) und 10 µM Etoposid. 0.5 % DMSO diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden 1 h lang mit MMS behandelt. Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen pro Experiment. Dargestellt ist der Mittelwert der Mediane aus insgesamt 3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; t-test.

MMS führte zu einem signifikanten Anstieg der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 88 B). Etoposid führte zu einem leichten Anstieg der Schweifintensität in HepG2-CYP3A4 Zellen (vgl. Abb. 88 B). Dieser war im Vergleich zur Negativkontrolle nicht signifikant (s. Abb. 88 B).

4.8.4 HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NDELA

HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen NDELA (0 – 10 mM) behandelt und für 2 h bzw 1 h (MMS) inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet und mittels Comet Assay aufgearbeitet. In HepG2-CYP1A2 konnte kein

signifikanter Anstieg der medianbasierten Schweifintensität nach 2 h Behandlung mit NDELA gemessen werden (Abb. 89 A).

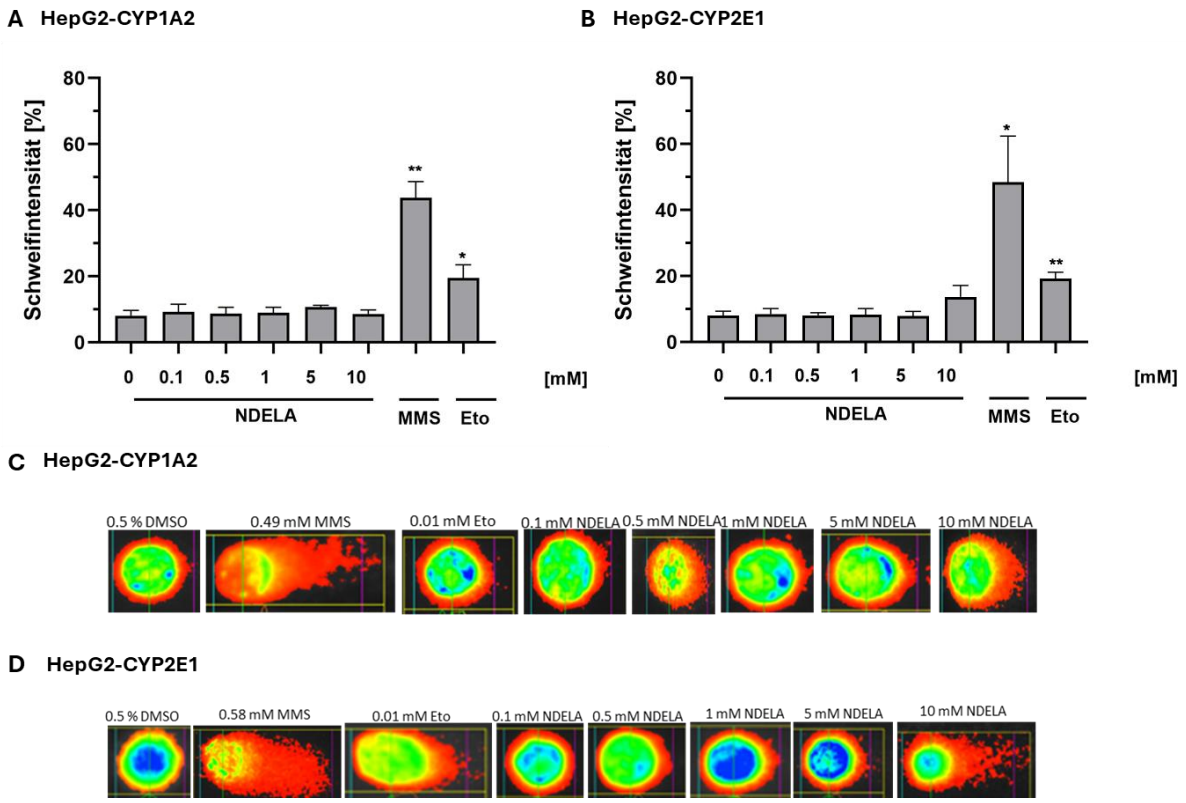

Abbildung 89: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDELA in HepG2-CYP1A2 Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen.
A Schweifintensität [%] von NDELA in HepG2-CYP1A2 Zellen nach 2 h Inkubation. **B** Schweifintensität [%] von NDELA in HepG2-CYP2E1 Zellen nach 2 h Inkubation. **C** Repräsentative Bilder von HepG2-CYP1A2 Zellen nach Behandlung mit NDELA und Datenverarbeitung mit Comet IV nach 2 h Inkubation. **D** Repräsentative Bilder von HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NDELA und Datenverarbeitung mit Comet IV nach 2 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.49 mM; HepG2-CYP1A2 und 0.58; HepG2-CYP2E1) und 10 µM Etoposid. 0.5 % DMSO diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden 1 h lang mit MMS behandelt. Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen pro Experiment. Dargestellt ist der Mittelwert der Mediane aus insgesamt 3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; t-test.

In den repräsentativen Bildern spiegelt sich dieses Ergebnis wider (s. Abb. 89 C). Die Schweifintensität blieb in HepG2-CYP2E1 Zellen bis zu 5 mM nahezu unverändert im Vergleich zur Negativkontrolle (vgl. Abb. 89 B). Im gemessenen Inkubationszeitraum konnte keine statistisch signifikante, strangbruchinduzierende Wirkung in HepG2-CYP2E1 Zellen detektiert werden (s. Abb. 89 B). Die Behandlung mit 10 mM führte zu einem 2.1-fachen Anstieg der medianbasierten Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 89 B). Zusammengefasst hatte NDELA in HepG2-CYP2E1 Zellen den größten Einfluss auf das DNA-Strangbruchlevel, was sich auch anhand der repräsentativen Aufnahmen mit Comet IV widerspiegelt (s. Abb 89 B, D).

4.8.5 HepG2 Zellen und HepG2-CYP3A4 nach Behandlung mit S-NNN

HepG2 und HepG2-CYPA4 Zellen wurden mit zunehmenden Konzentrationen S-NNN (0 – 10 mM) für 2 h und für 1 h mit MMS behandelt. Anschließend erfolgten Zellernte und Aufarbeitung mittels Comet Assay. Die Behandlung von HepG2 Zellen mit 0.5 mM S-NNN führte zu einem leichten Anstieg der Schweifintensität in HepG2 Zellen (Abb. 90 A).

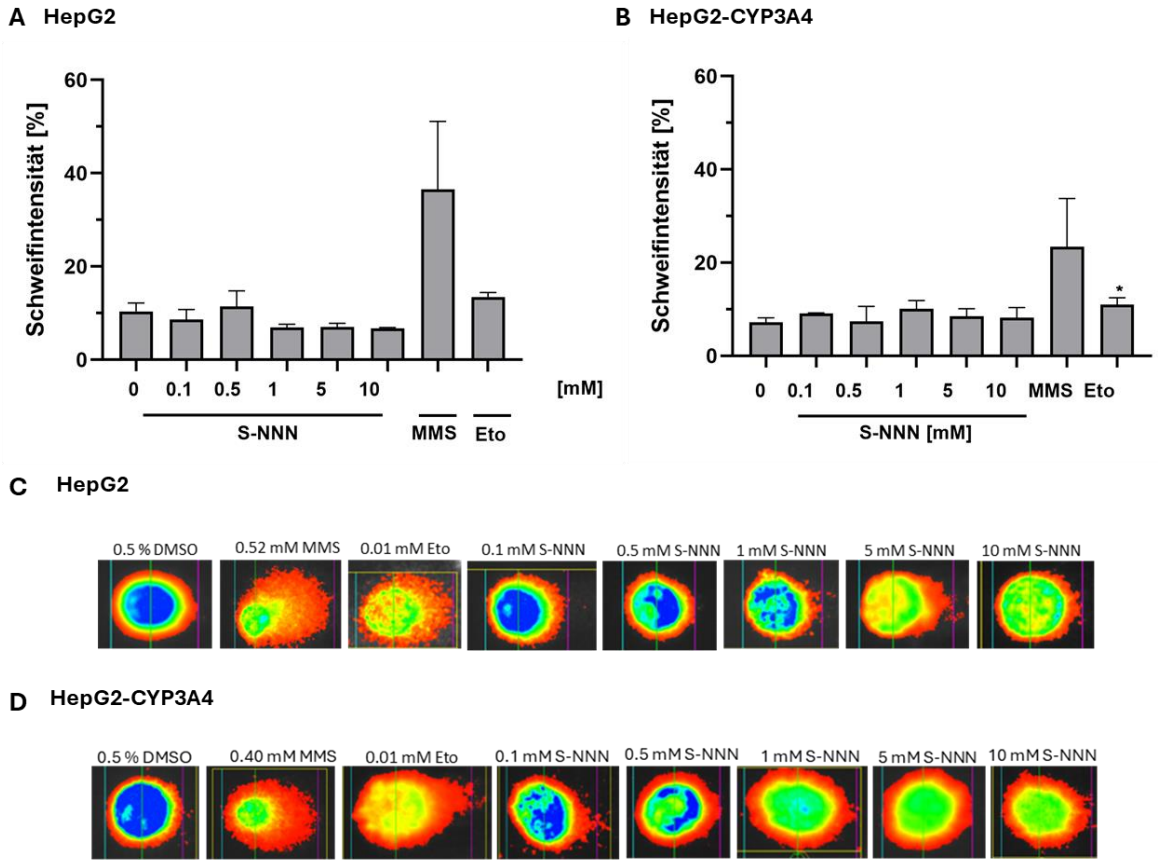

Abbildung 90: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von S-NNN in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP3A4 Zellen. **A** Schweifintensität [%] von S-NNN in HepG2 Zellen nach 2 h Inkubation. **B** Schweifintensität [%] von S-NNN in HepG2-CYP3A4 Zellen nach 2 h Inkubation. **C** Repräsentative Bilder von HepG2 Zellen nach Behandlung mit S-NNN und Datenverarbeitung mit Comet IV nach 2 h Inkubation. **D** Repräsentative Bilder von HepG2-CYP3A4 Zellen nach Behandlung mit S-NNN und Datenverarbeitung mit Comet IV nach 2 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.52 mM; HepG2 und 0.40; HepG2-CYP3A4) und 10 µM Etoposid. 0.5 % DMSO diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden 1 h lang mit MMS behandelt. Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen pro Experiment. Dargestellt ist der Mittelwert der Mediane aus insgesamt 3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; t-test.

Die nahezu unveränderte Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle spiegelt sich auch in den repräsentativen Aufnahmen nach Datenprozessierung mittels Comet IV wider (vgl. Abb. 90 C). Auch in HepG2-CYP3A4 Zellen ließen sich hinsichtlich medianbasierter Schweifintensitätswerte geringe Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen feststellen (s. Abb. 90 B). S-NNN hatte im gewählten Konzen-

trationsbereich nach 2 h keinen Einfluss auf das DNA-Strangbruchlevel in HepG2-CYP3A4 Zellen hat.

4.8.6 HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit S-NNN

HepG2-CYP1A2 Zellen und HepG2-CYP2E1 Zellen wurden für 2 h mit aufsteigenden Konzentrationen S-NNN (0 – 10 mM) behandelt. Behandlung der HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 Zellen mit S-NNN hatte im untersuchten Inkubationszeitraum keinen Einfluss auf das DNA-Strangbruchlevel (vgl. Abb. 91 A, B).

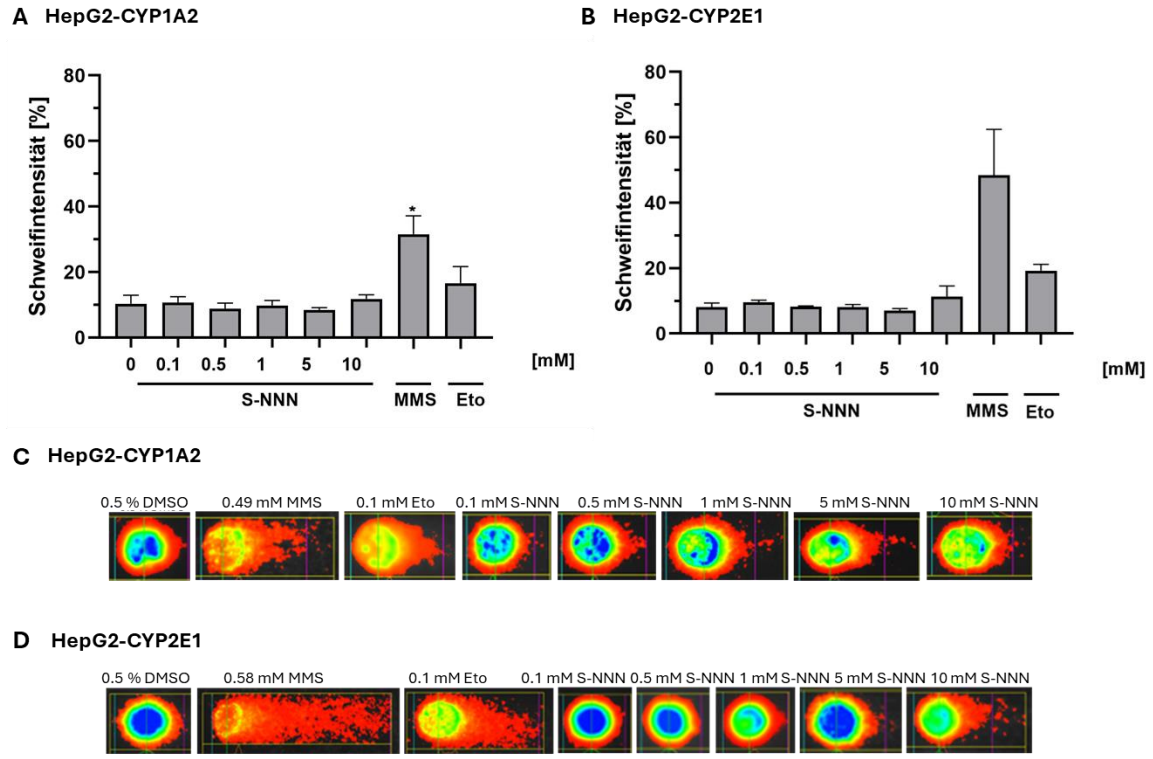

Abbildung 91: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von S-NNN in HepG2-CYP1A2 Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen.
A Schweifintensität [%] von S-NNN in HepG2-CYP1A2 Zellen nach 2 h Inkubation. **B** Schweifintensität [%] von S-NNN in HepG2-CYP2E1 Zellen nach 2 h Inkubation. **C** Repräsentative Bilder von HepG2-CYP1A2 Zellen nach Behandlung mit S-NNN und Datenverarbeitung mit Comet IV nach 2 h Inkubation. **D** Repräsentative Bilder von HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit S-NNN und Datenverarbeitung mit Comet IV nach 2 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente der zuvor ermittelte EC_{50}-Wert von MMS (0.49 mM; HepG2-CYP1A2 und 0.58; HepG2-CYP2E1) und 10 µM Etoposid. 0.5 % DMSO diente als Negativkontrolle. Die Zellen wurden 1 h lang mit MMS behandelt. Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen pro Experiment. Dargestellt ist der Mittelwert der Mediane aus insgesamt 3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; t-test.

In Korrelation zum gemessenen geringen Schadenslevel wiesen HepG2-CYP1A2 Zellen einen gering ausgeprägten Schweif auf, was anhand der mittels Comet IV Software erzeugten Aufnahmen deutlich wurde (s. Abb. 91 C). Auch die maximale

Testkonzentration S-NNN führte nach 2 h zu keinem signifikanten Anstieg der Schweifintensität in HepG2-CYP2E1 Zellen im gewählten Konzentrationsbereich (vgl. Abb 91 B). Dementsprechend gering fiel der Schweif, welcher Maß für den Grad des induzierten DNA-Schadens ist, aus (s. Abb. 91 D). Der Effekt der Positivkontrolle Etoposid war in beiden Zelllinien ähnlich, während MMS eine deutlichere Wirkung in HepG2-CYP2E1 Zellen entfaltete (s. Abb. 91 A, B). Zusammenfassend lässt sich eine schwach ausgeprägte, nicht signifikante Induktion des DNA-Strangbruchlevels in HepG2, HepG2-CYP1A2, HepG2-CYP3A4 und in HepG2-CYP2E1 durch S-NNN feststellen (s. Abb. 90 A, B, Abb. 91 A, B). Ferner ließ sich kein eindeutig konzentrationsabhängiger Verlauf feststellen, was bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen ist.

4.8.7 HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NMA und H_2O_2 Nachbehandlung

Um zu untersuchen, ob es nach Behandlung mit NMA zur Induktion von DNA-crosslinks kommt, wurden HepG2-CYP2E1 Zellen für 2 h mit aufsteigenden Konzentrationen NMA (1 – 2.5 mM) inkubiert. Um die Testsensitivität durch Erhöhung des DNA-Strangbruchlevels zu steigern erfolgte eine Nachbehandlung mit 0.1 mM Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in PBS für 30 Minuten. Dann wurden die Zellen geerntet und mittels Comet Assay aufgearbeitet.

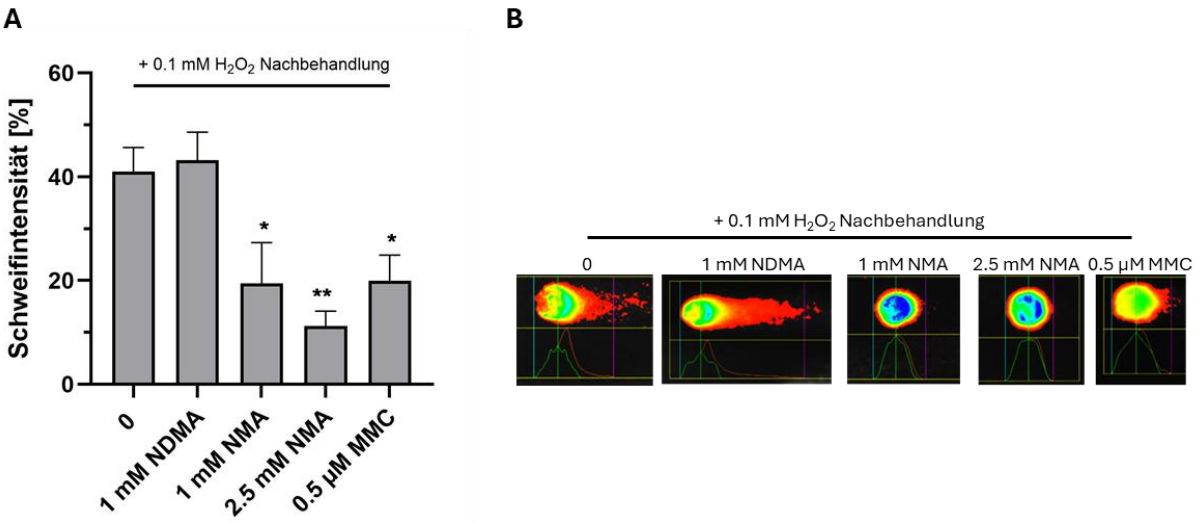

Abbildung 92: DNA-quervernetzende Wirkung von NMA in HepG2-CYP2E1 Zellen.
A Schweifintensität [%] in HepG2-CYP2E1 Zellen nach 2 h Inkubation. **B** Repräsentative Bilder von HepG2-CYP2E1 Zellen nach der Datenverarbeitung mit Comet IV nach 2 h Inkubation. 0.5 µM MMC diente als Positivkontrolle, 0.1 mM H_2O_2 und 1 mM NDMA dienten als Negativkontrollen. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit 0.1 mM H_2O_2 nachbehandelt. Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen pro Experiment. Dargestellt ist der Mittelwert der Mediane aus insgesamt 3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.1 mM H_2O_2) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; t-test.

NMA führte mit ansteigender Konzentration zu einer statistisch signifikanten Reduktion der medianbasierten Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Abb. 92 A). Der Effekt war nach Inkubation mit 2.5 mM maximal und lag bei -3.65 (s. Abb. 92 A). Die repräsentativen Aufnahmen mittels Comet IV Software spiegeln diese Effekte wider (s. Abb. 92 B) Auch die im Testassay verwendete Positivkontrolle (MMC) führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle um – 2.05 (vgl. Abb. 92 A).

4.8.8 HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NDELA und H_2O_2 Nachbehandlung

Um strangbruchinduzierende Effekte von NDELA zu untersuchen, wurden HepG2-CYP2E1 Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen 5 - 20 mM behandelt und für 2 h inkubiert. Dann erfolgte eine 30-minütige Nachbehandlung mit 0.1 mM Wasserstoffperoxid in PBS, bevor die Zellen geernet und mittels Comet Assay aufgearbeitet wurden. 5 mM NDELA führte zu einer Reduktion der Schweifintensität um -1.4 im Vergleich zur Negativkontrolle H_2O_2 ohne Zunahme dieses Effektes bei höheren Konzentrationen (Abb. 93 A).

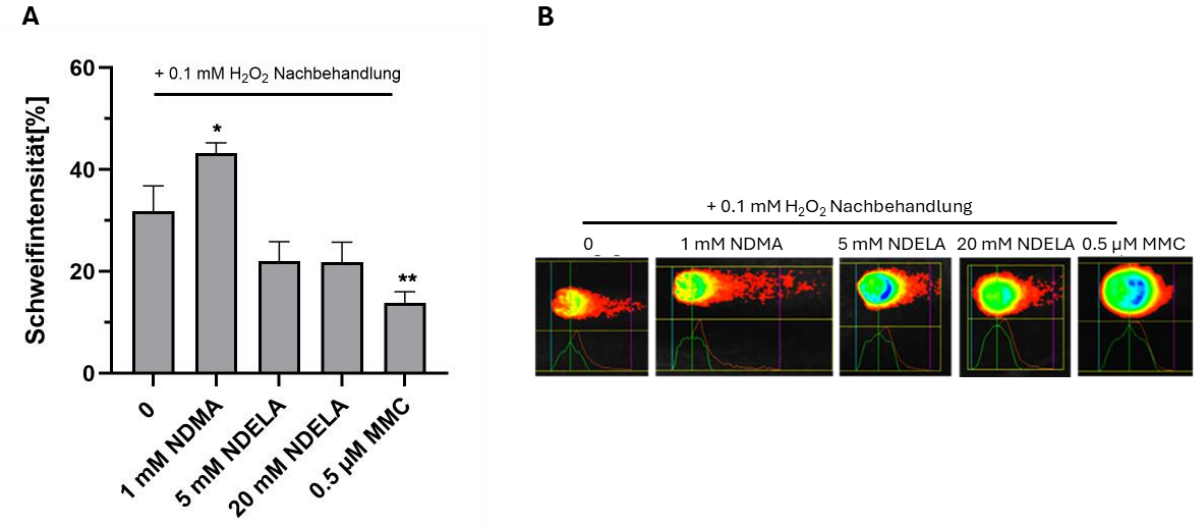

Abbildung 93: DNA-quervernetzende Wirkung von NDELA in HepG2-CYP2E1 Zellen.
A Schweifintensität [%] in HepG2-CYP2E1 Zellen nach 2 h Inkubation. **B** Repräsentative Bilder von HepG2-CYP2E1 Zellen nach der Datenverarbeitung mit Comet IV nach 2 h Inkubation. 0.5 µM MMC diente als Positivkontrolle, 0.1 mM H_2O_2 und 1 mM NDMA dienten als Negativkontrollen. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit 0.1 mM H_2O_2 nachbehandelt. Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen pro Experiment. Dargestellt ist der Mittelwert der Mediane aus insgesamt 3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.1 mM H_2O_2) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; t-test.

Für den gewählten Konzentrationsbereich ließen sich keine statistisch signifikanten Effekte nachweisen (vgl. Abb. 93 A). MMC führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Schweifintensität um - 2.3 im Vergleich zur Negativkontrolle H_2O_2 (s. Abb. 93 A). NDMA verstärkte den strangbruchinduzierenden Effekt von H_2O_2, wobei eine Zunahme der Schweifintensität um 1.4 im Vergleich zu H_2O_2 messbar war (Abb. 93 A). Diese Ergebnisse spiegeln sich in den repräsentativen Comet IV Aufnahmen wider (s. Abb. 93 B). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf quervernetzende Eigenschaften von NDELA hin, die jedoch deutlich geringer ausgeprägt waren als die durch NMA induzierten Effekte (vgl. Abb. 92 A, B und Abb. 93 A, B).

4.8.9 Zusammenfassung der Comet Assay Daten in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 nach Behandlung mit strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen

Tabelle 24: Maximale medianbasierte Schweifintensitätsunterschiede in HepG2 Zellen

Testsubstanz	HepG2	HepG2-CYP3A4	HepG2-CYP1A2	HepG2-CYP2E1
NDMA	**1.8 (5 mM)***	**2.0 (5 mM)***	**1.1 (1 mM)***	**7.8**
NDELA	**1.3 (0.1 mM)***	**1.2 (0.5 mM)***	**1.3 (5 mM)***	**2.1, -1.4*² (5 mM)**
S-NNN	**1.1 (0.5 mM)***	**1.4 (1 mM)***	**1.1**	**1.4**
NMA	**n.d.**	**n.d.**	**n.d**	**- 3.65*²**

*: Von maximaler Testkonzentration abweichende Konzentrationen die zu maximalen medianbasierten Schweifintensitätsunterschieden im Vergleich zur Negativkontrolle geführt haben, sind in Klammern angegeben.
*²: Modifizierter Comet Assay mit H_2O_2

Die stärksten Effekte auf die Schweifintensität wurden durch NDMA in HepG2-CYP2E1 Zellen induziert, was anhand eines 7.8-fachen Anstieges im Vergleich zur Negativkontrolle demonstriert werden konnte (vgl. Abb. 87, Tab 24). Dieser Effekt war nach Inkubation mit der höchsten Testkonzentration messbar (Abb. 87 B). Auch in HepG2-CYP3A4 Zellen war der durch NDMA induzierte strangbruchinduzierende Effekt von deutlichem Ausmaß, was sich anhand einer zweifachen Steigerung der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle äußerte (Abb. 86 B, s. Tab. 24). Das Ausmaß des DNA-Strangbruchlevels war in HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit

10 mM NDELA am stärksten ausgeprägt, wobei der messbare Schweifintensitätsunterschied im Vergleich zur Negativkontrolle 5.7-fach schwächer als nach Behandlung mit NDMA war (Abb. 89 B, s. Tab. 24). Für die übrigen Zelllinien war der Effekt von NDELA von ähnlicher Intensität (Abb. 88 A, B, 89 A, Tab. 24). Das durch S-NNN hervorgerufene Ausmaß an DNA-Strangbrüchen war in HepG2-CYP3A4 und in HepG2-CYP2E1 Zellen am stärksten ausgeprägt, was sich anhand eines 1.4-fachen Anstiegs der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle äußerte (vgl. Abb. 90 B, 91 B, s. Tab. 24). NMA führte in HepG2-CYP2E1 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der medianbasierten Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 92).

4.9 Vergleichende Untersuchung der Genotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in HepG2 und in HepG2-CYP2E1 und Einfluss der MGMT mittels Comet Assay

4.9.1 Effekt von NDMA

HepG2 Zellen und HepG2-CYP2E1 Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen NDMA (0 - 1 mM) behandelt. Zusätzlich erfolgte für die Hälfte der Zellen eine Vorbehandlung mit O^6-BG für 2 h, um den Einfluss der MGMT auf das DNA-Strangbruchlevel zu untersuchen. Nach 2 h + 24 h wurden die Zellen mittels Comet Assay aufgearbeitet. In HepG2-CYP2E1 Zellen führte NDMA zu einem statistisch signifikanten Anstieg der medianbasierten Schweifintensität ab einer Konzentration von 0.1 mM (Abb. 94 A). Nach Vorinkubation mit dem MGMT Inhibitor O^6-BG war dieser Anstieg nach Behandlung mit 0.1 mM ebenfalls statistisch signifikant (Abb. 94 A). Der maximale Effekt konnte nach Behandlung mit 1 mM + O^6-BeG erreicht werden und lag bei einem im Vergleich zur Negativkontrolle 3.8-fachen Anstieg der medianbasierten Schweifintensität (vgl. Abb. 94 A).

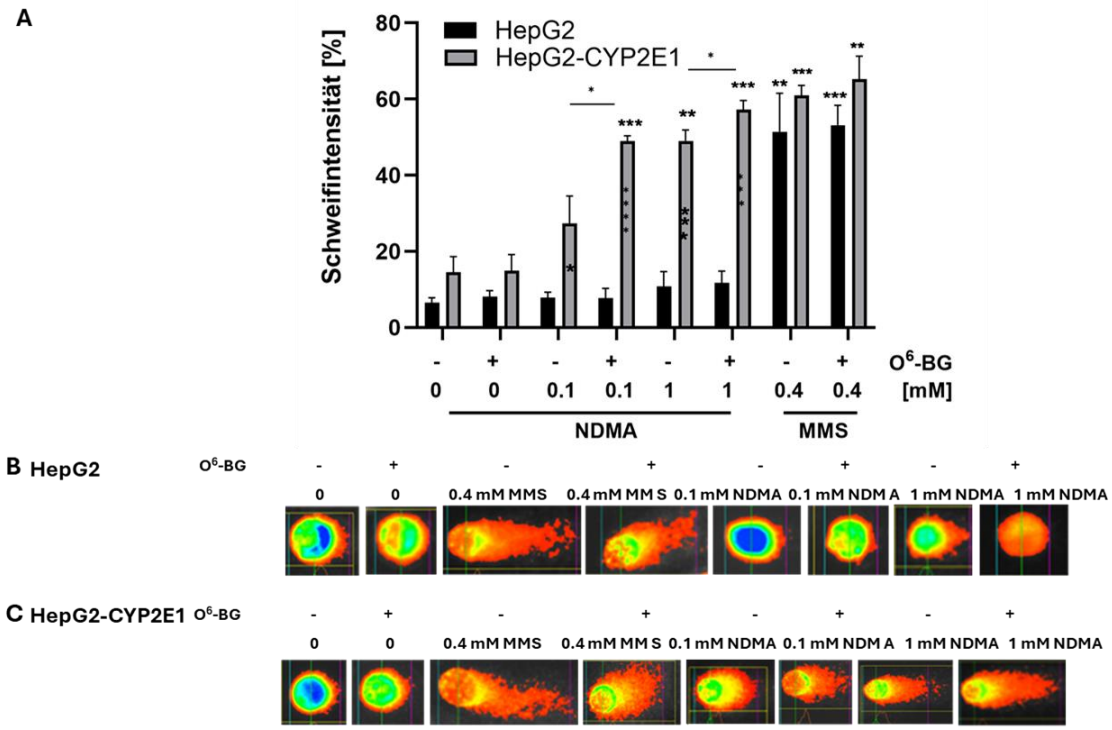

Abbildung 94: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDMA in HepG2-Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen und Einfluss der MGMT.
A Schweifintensität [%] in HepG2 Zellen nach 24 h Inkubation. **B** Repräsentative Bilder von HepG2 Zellen nach der Datenverarbeitung mit Comet IV nach 24 h Inkubation. C Repräsentative Bilder von HepG2-CYP2E1 Zellen nach der Datenverarbeitung mit Comet IV nach 24 h Inkubation. 0.4 mM MMS diente als Positivkontrolle, 0.5 % DMSO diente als Negativkontrolle. Die Konzentration des MGMT Inhibitors lag bei 20 µM (Vorinkubation für 120 min). Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen pro Experiment. Dargestellt ist der Mittelwert der Mediane aus insgesamt 3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; t-test.

Die DNA-strangbruchinduzierenden Effekte waren auch anhand der repräsentativen Comet Bilder deutlich zu erkennen (s. Abb. 94 C). In Zellen, die mit 0.1 mM und 1 mM NDMA behandelt wurden war die DNA-Strangbruchverstärkende Wirkung durch den MGMT Inhibitor O^6-BG statistisch signifikant (Abb. 94 A). In HepG2 Zellen fiel der durch NDMA erzielte, strangbruchinduzierende Effekt deutlich geringer aus (vgl. Abb. 94 A). Dieser war nach Behandlung mit 1 mM NDMA und O^6-BG Vorinkubation maximal, wobei sich ein 1.4-facher Anstieg der medianbasierten Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle messen ließ (94 A). Die im Vergleich zu HepG2-CYP2E1 Zellen geringer ausfallende Schweifintensität ist in repräsentativen Comet Aufnahmen der mit NDMA behandelten HepG2 Zellen zu erkennen (s. Abb 94 B). Für alle Behandlungen traten statistisch signifikante Unterschiede zwischen beiden Zelllinien im Hinblick auf die medianbasierte Schweifintensität auf (s. Abb. 94 A).

4.9.2 Effekte von NDELA und NMA

HepG2 und in HepG2-CYP2E1 Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen NDELA 0 - 20 mM behandelt. Die Aufarbeitung und Messung erfolgte mittels Zellviabilitätstest. NDELA führte in HepG2-CYP2E1 Zellen nach 24 h zu einer konzentrationsabhängigen, signifikanten Reduktion der Zellviabilität um 47 % nach Behandlung mit 20 mM im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 95 A).

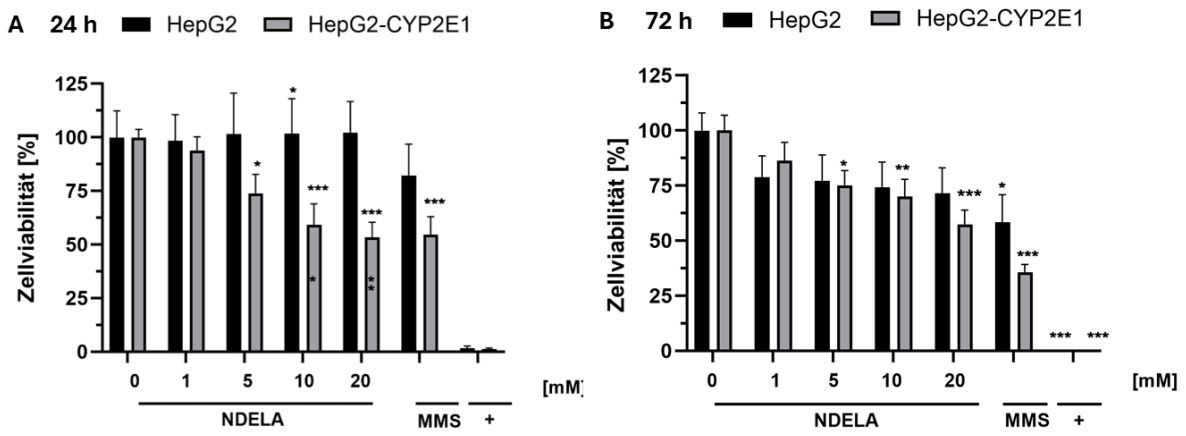

Abbildung 95: Effekt von NDELA auf die Zellviabilität in HepG2 und in HepG2-CYP2E1 Zellen.
A Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation. **B** Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 72 h Inkubation. Als Positivkontrollen diente 0.4 mm MMS und 0.1 % Saponin (+). Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; t-test.

Nach 72 h war dieser Effektvon ähnlichem Ausmaß, wobei die Reduktion ebenfalls bei knapp unter 50 % lag (vgl. Abb. 95 B). In HepG2 Zellen traten zytotoxische Effekte erst nach 72 h Behandlung auf (s. Abb. 95 B). Hierbei führte NDELA zu einer nicht signifikanten Reduktion der Zellviabilität um 29 % im Vergleich zur Negativkonrolle (s. Abb. 95 B). Die durch NDELA hervorgerufene Zytotoxizität war damit deutlich schwächer ausgeprägt als in HepG2-CYP2E1 Zellen (vgl. Abb. 95 A, B). Im nächsten Schritt erfolgte die Untersuchung strangbruchinduzierender Effekte von NDELA und NMA in HepG2 und in HepG2-CYP2E1 Zellen. HepG2 und HepG2-CYP2E1 Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen NDELA (0 – 20 mM) und NMA (1 – 2.5 mM) behandelt. Nach 2 h erfolgten Aufarbeitung und Ernte mittels Comet Assay. In HepG2-CYP2E1 Zellen führte NDELA zu einer nicht signifikanten Zunahme der medianbasierten Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle. Maximale Effekte ließen sich nach Inkubation mit 20 mM detektieren (Abb. 96 A).

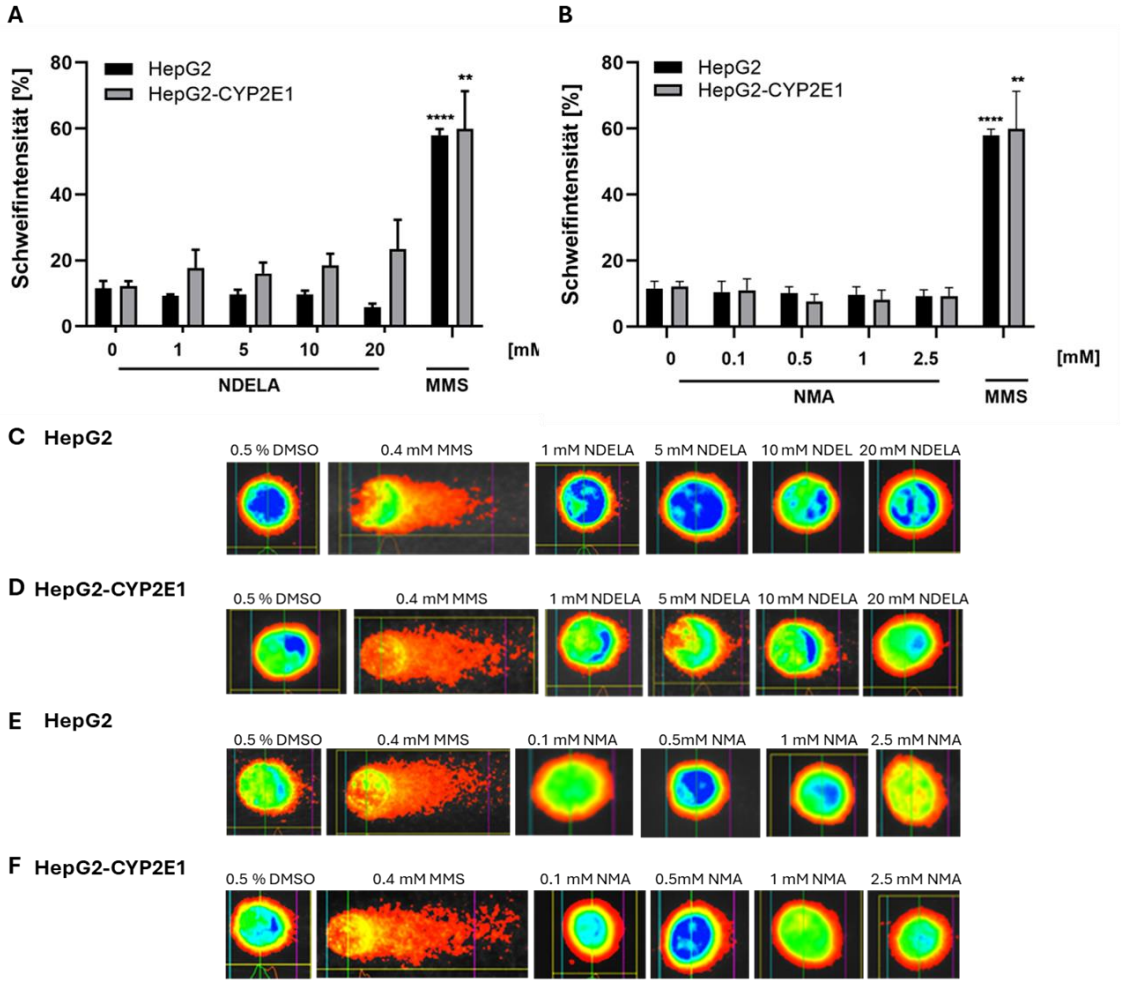

Abbildung 96: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDELA und NMA in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen.
A Schweifintensität [%] nach 2 h Inkubation mit NDELA. **B** Schweifintensität [%] nach 2 h Inkubation mit NMA. **C-F** Repräsentative Bilder von HepG2 Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen nach 2 h Inkubation mit NDELA und NMA nach Datenverarbeitung mit Comet IV. 0.4 mM MMS diente als Positivkontrolle, 0.5 % DMSO diente als Negativkontrolle. Die Konzentration des MGMT-Inhibitors lag bei 20 µM
(Vorinkubation für 120 min). Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen pro Experiment. Dargestellt ist der Mittelwert der Mediane aus insgesamt 3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; t-test.

In HepG2 Zellen trat keine signifikante DNA-Strangbruchinduktion nach Inkubation mit NDELA auf (s. Abb. 96 A). Nach Behandlung mit NMA trat weder in HepG2 Zellen noch in HepG2-CYP2E1 Zellen eine Zunahme der Schweifintensität ein (s. Abb. 96 B). Vielmehr kam es in beiden Zelllinien zu einer leichten Abnahme der gemessenen Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle (vgl. Abb. 96 B). Für die medianbasierte Schweifintensität war diese Abnahme in HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit 0.5 mM maximal und lag im Vergleich zur Negativkontrolle bei - 0.63. Die Effekte waren nicht signifikant (s. Abb. 96 B) Die geringe Schweifintensität ist auch anhand der repräsentati

ven Comet Aufnahmen erkennbar (vgl. Abb. 96 D). In HepG2 Zellen kam es nach Behandlung mit 2.5 mM zur stärksten Abnahme der medianbasierten Schweifintensität, wobei eine nicht signifikante Reduktion um - 0.8 im Vergleich zur Negativkontrolle messbar war (96 B). Zur Überprüfung, ob die von NDELA und NMA hervorgerufenen Effekte aus der Bildung von O^6-MeG-Addukten resultieren wurden HepG2 und HepG2-CYP2E1 Zellen vergleichend mit und ohne MGMT-Inhibitor O^6-BG behandelt (s. Abb. 97 A, B).

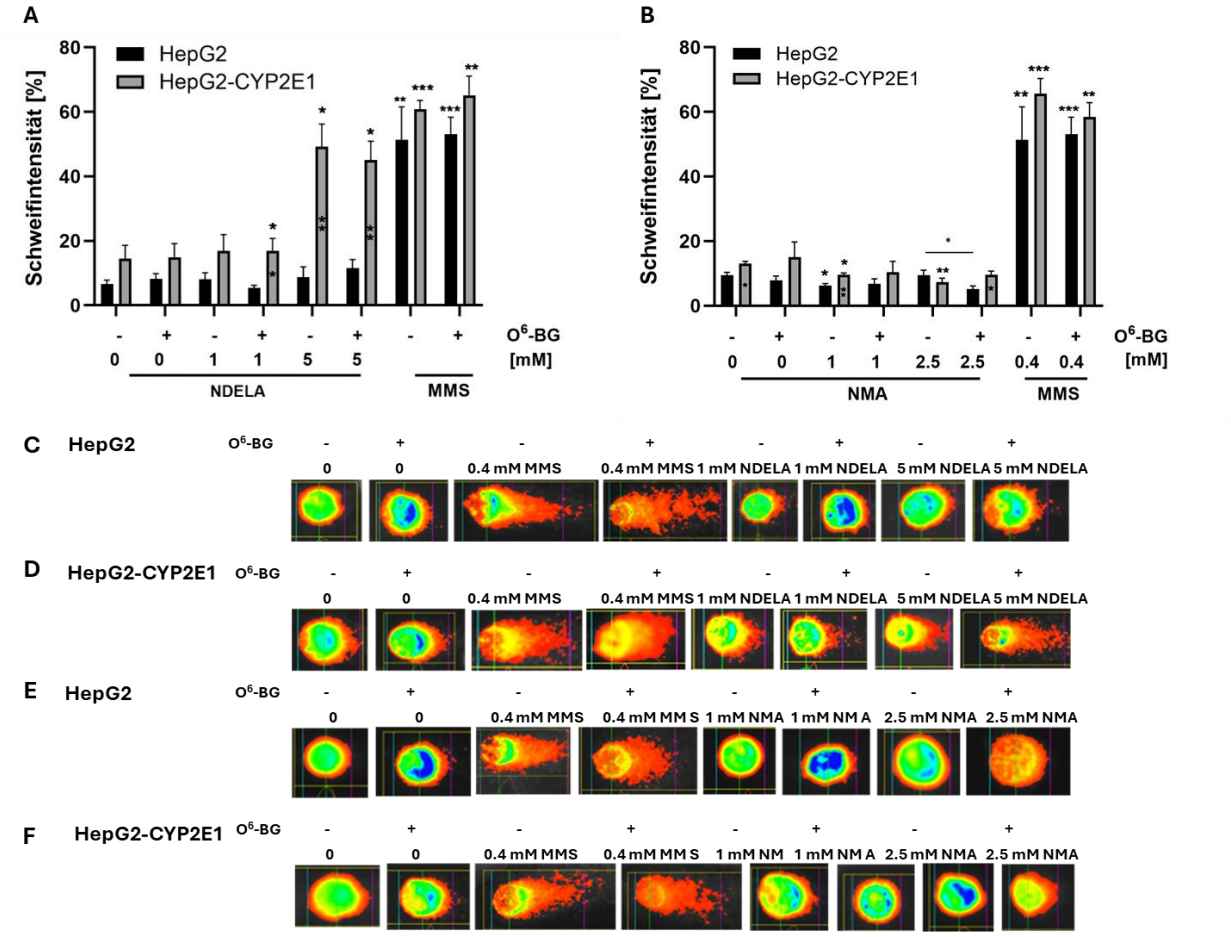

Abbildung 97: DNA-strangbruchinduzierende Wirkung von NDELA und NMA in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen und Einfluss der MGMT.
A Schweifintensität [%] nach 24 h Inkubation mit NDELA in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen. B Schweifintensität [%] nach 24 h Inkubation mit NMA in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen. C-F Repräsentative Bilder von HepG2 Zellen nach 24 h Inkubation mit NDELA und NMA und Datenverarbeitung mit Comet IV. 0.4 mM MMS diente als Positivkontrolle, 0.5 % DMSO diente als Negativkontrolle. Die Konzentration des MGMT-Inhibitors lag bei 20 µM (Vorinkubation für 120 min). Mittelwert und ± SEM basieren auf der Zählung von je 50 Zellen pro Experiment. Dargestellt ist der Mittelwert der Mediane aus insgesamt 3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *,$p < 0.05$;**,$p < 0.01$; t-test.

Die Hälfte der ausplattierten HepG2 und HepG2-CYP2E1 Zellen wurden hierfür zunächst für 2 h mit dem O^6-BG für 2 h präinkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen NDELA (1, 5 mM) und NMA (0, 2.5 mM) für 24 h. NDELA

führte in HepG2-CYP2E1 Zellen zu einem statistisch signifikanten Anstieg der medianbasierten Schweifintensität nach Behandlung mit 5 mM (Abb. 97 A). Die maximale Schweifintensität wurde nach Behandlung mit 5 mM ohne O^6-BG gemessen und lag bei 49 % (s. Abb. 97 A). Dies entspricht einem 3.4-fachen Anstieg im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 97 A). Für O^6-BG war in dieser Zelllinie kein signifikant strangbruchverstärkender Effekt detektierbar (Abb. 97 A). In HepG2 Zellen trat ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der medianbasierten Schweifintensität nach Behandlung mit 5 mM + O^6-BG im Vergleich zur Negativkontrolle auf (s. Abb. 97 A). Mit einer Schweifintensität von 11.3 % lag dieser Wert 1.7-fach über dem der Negativkontrolle (Abb. 97 A). In HepG2-CYP2E1 Zellen führten alle gewählten Konzentrationen zu einem im Vergleich zu HepG2 Zellen statistisch signifikantem Anstieg der medianbasierten Schweifintensität mit Ausnahme der Zellen, die mit 1 mM ohne O^6-BG behandelt wurden (vgl. Abb. 97 A). Der MGMT Inhibitor O^6-BG induzierte keine signifikanten, strangbruchverstärkenden Effekte in HepG2 Zellen (Abb. 97 A). Für NMA war weder in HepG2-CYP2E1 Zellen noch in HepG2 Zellen ein strangbruchinduzierendes Potential nachweisbar (s. Abb. 97 B). Der Schweifintensitätsunterschied in HepG2-CYP2E1 Zellen war signifikant höher als in HepG2 Zellen (97 B). Dieser Effekt war auch in der Negativkontrolle feststellbar (Abb. 97 B). 1 mM NMA führte in HepG2 Zellen zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle (vgl. Abb. 97 B). Der Effekt war mit einer im Vergleich zur Negativkontrolle um - 0.66 reduzierten Schweifintensität maximal (Abb. 97 B). In HepG2-CYP2E1 Zellen trat eine statistisch signifikante Reduktion der Schweifintensität nach Behandlung mit 1 mM NMA (- 0.8) im Vergleich zur Negativkontrolle auf (vgl. Abb. 97 B). Der Rückgang der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle war auch nach Behandlung mit 2.5 mM statistisch signifikant (vgl. Abb. 97 B). Der Rückgang der Schweifintensität könnte auf einen crosslink-induzierenden Mechanismus deuten. In HepG2-CYP2E1 Zellen, in welchen der Rückgang des medianbasierten Schweifintensitätsunterschied im Vergleich zur Negativjkontrolle deutlicher ausgeprägt war als in HepG2 Zellen, ließ sich kein Effekt durch O^6-BG feststellen.

4.9.3 Zusammenfassung der Comet Assay Daten in HepG2 und HepG2-CYP2E1 nach Behandlung mit strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen

Tabelle 25: Maximale medianbasierte Schweifintensitätsunterschiede in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen

Testsubstanz	HepG2		HepG2-CYP2E1	
Inkubationszeit [h]	**2**	**24**	**2**	**24**
NDELA	**< 1**	**1.7 (5 mM + O^6-BG)**	**1.9 (20 mM)**	**3.4 (5 mM)**
NDMA	**1.8 (5 mM)**	**1.4 (1 mM, + O^6-BG)**	**7.8 (10 mM)**	**3.8 (1 mM + O^6-BG)**
NMA	**< 1**	**1.0 (2.5 mM)**	**< 1**	**< 1**

( ): (Kombinations-) Behandlungen, bei denen maximale Schweifintensitätsunterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen wurden, einschließlich der höchsten Teskonzentration, sind in Klammern angegeben.

Unter den untersuchten *N*-Nitrosaminen NDMA, NDELA und NMA wies NDMA das stärkste strangbruchinduzierende Potential in beiden Zelllinien auf (vgl. Abb. 94 A). In diesen Zusammenhang ließ sich demonstrieren, dass die strangbruchinduzierende Wirkung von NDMA in HepG2-CYP2E1 Zellen deutlicher ausgeprägt ist als in HepG2 Zellen (s. Abb. 94 A, s. Tab. 25). Der stärkste strangbruchinduzierende Effekt wurde in HepG2-CYP2E1 nach 2 h induziert (s. Abb. 87 B, D, s. Abb. 94 A, C, vgl. Tab. 25). NDMA führte auch in HepG2 Zellen nach 2 h Inkubation zu größeren Schweifintensitätsunterschieden im Vergleich zur Negativkontrolle als nach 24 h Inkubation (s. Abb. 86 A, C, s. Abb. 94 A, B, vgl. Tab. 25). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des an der Reparatur von O^6-MeG Addukten beteiligten MGMT-Enzyms zur Verstärkung der NDMA getriggerten Strangbrüchen in HepG2-CYP2E1 Zellen führt (s. Abb. 94 A, B, C). NDELA induzierte nach 2 h DNA-Strangbrüche in HepG2-CYP2E1 Zellen, während in HepG2 Zellen keine Effekte detektierbar waren (vgl Abb. 96 A, Tab. 25). Nach 24 h ließen sich auch in HepG2 Zellen strangbruchinduzierende Effekte nach Behandlung mit NDELA messen (vgl. Abb. 97 A, Tab. 25). In HepG2-CYP2E1 Zellen war das Ausmaß der durch NDELA induzierten Strangbruchformation nach beiden Zeitpunkten deutlicher ausgeprägt als in HepG2 Zellen (s. Tab. 25, Abb. 97 A, Abb.98 A).

Für NMA konnte in HepG2 und in HepG2-CYP2E1 Zellen keine Strangbruchinduktion nachgewiesen werden

(Abb. 96 B, E, F, Abb. 97 B, E, F, Tab. 25). O^6-BG hatte im Vergleich zu NDMA keine strangbruchverstärkenden Effekte in HepG2 und in HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NMA und NDELA (s. Abb. 97 A, B). Erkennbar ist dies auch anhand der repräsentativen Comet Aufnahmen beider Zelllinien (vgl. Abb. 97 C, D, E, F).

4.10 Vergleichende Untersuchung der Genotoxizität von NDMA in HepG2 und in HepG2-CYP2E1 mittels Mikrokern Assay

Um zu untersuchen, ob die zuvor in HepG2-CYP2E1 Zellen detektierten DNA-Strangbrüche zur Mikrokernentstehung führen, wurde der Mikrokern Assay durchgeführt. HepG2 und HepG2-CYP2E1 Zellen wurden hierfür mit ansteigenden Konzentrationen NDMA im Bereich von 0 – 10 mM behandelt. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und neues Medium hinzugefügt. Dann folgte die Behandlung mit je 6 µg/mL des Cytokineseinhibitors CytoB für 72 h. Zum Ausschluss unspezifischer Effekte wurde ein Zellviabilitätstest durchgeführt. Hierfür wurden HepG2 Zellen und HepG2-CYP2E1 Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen NDMA (0 - 10 mM) behandelt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel. Nach 72 h Nacherholungszeit wurden die Zellen mittels Zellviabilitätstest aufgearbeitet. NDMA führte zu keiner Reduktion der Zellviabilität in HepG2 und HepG2-CYP2E1 Zellen, während die Positivkontrollen MMC und Etoposid zur statistisch signifikanten Reduktion im Vergleich zur Negativkontrolle führten (Abb. 98 A). NDMA führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Mikrokernrate bezogen auf jeweils 1000 Zellkerne in HepG2-CYP2E1 Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (vgl. Abb. 98 B). Dieser Effekt war für die beiden höchsten Konzentrationen statistisch signifikant (98 B). Der maximale Effekt konnte nach Behandlung mit 10 mM gemessen werden und lag 2.5-fach über der Mikrokernrate der Negativkontrolle (Abb. 98 B). Auch für die beiden Positivkontrollen war der Effekt in HepG2-CYP2E1 statistisch signifikant (Abb. 98 B). Repräsentative Aufnahmen von HepG2 und HepG2-CYP2E1 Zellen zeigen Mikrokerne nach Behandlung mit 0.5 mM und 10 mM NDMA (s. Abb. 98 C).

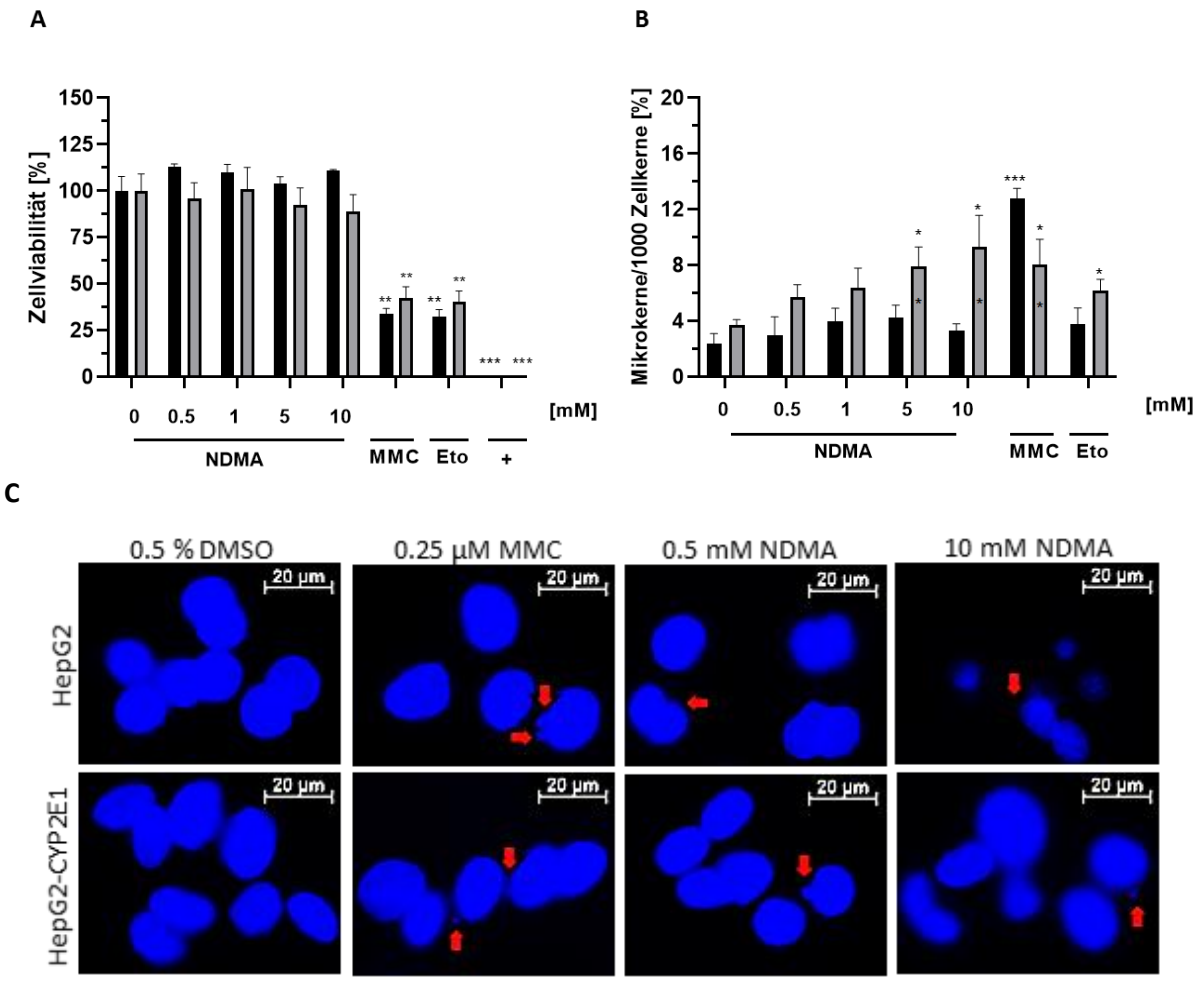

Abbildung 98: Mikrokern-induzierender Effekt von NDMA in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP2E1 Zellen.
A Zellviabilität (y-Achse), graphisch aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation + 72 h Nacherholungszeit in substanzfreiem Medium. **B** Mikrokernrate in % bezogen auf 1000 Kerne (y-Achse) aufgetragen gegen die Konzentration (x-Achse) nach 24 h Inkubation + 72 h Nachinkubation mit CytoB. **C** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HepG2 und HepG2-CYP2E1 Zellen nach 24 h Inkubation + 72 h Nachinkubation mit CytoB. Die Zellkernfärbung erfolgte mittels DAPI. Als Positivkontrollen dienten 0.25 µM MMC, 5 µM Etoposid und für den Zellviabilitätstest zusätzlich 0.1 % Saponin (+). Für die Nachinkubationszeit wurde für den Mikrokernassay 6 µg/ml CytoB verwendet. Mittelwert und ± SEM basieren auf n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz ist mit einem Stern markiert und wurde jeweils auf die Negativkontrolle (0.5 % DMSO) bezogen. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$;***, $p < 0.001$; t-test.

In HepG2 Zellen konnte ein statistisch signifikanter Anstieg der Mikrokernrate im Vergleich zur Negativkontrolle nach Behandlung mit der Positivkontrolle MMC festgestellt werden (s. Abb. 98 B). NDMA hatte keinen ausgeprägten Mikrokern induzierenden Effekt in dieser Zelllinie (Abb. 98 B). Zwischen beiden Zelllinien traten signifikante Unterschiede der Mikrokernrate nach Behandlung mit 5 mM und 10 mM auf (vgl. Abb. 98 B). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass NDMA zu einem signifikanten Anstieg der Mikrokernrate in HepG2-CYP2E1 Zellen führt, der mit der eingesetzten Konzentration korrellierte (Abb. 98 B). In HepG2 Zellen dagegen trat ein leichter Anstieg derMikrokernrate im Vergleich zur Negativkontrolle auf, der jedoch nicht signifikant war (Abb. 98 B).

5. Diskussion

5.1 Untersuchungen der Metabolischen Kompetenz in frisch isolierten PRH und in kryokonservierten PRH mittels LC-MS

Zur Ermittlung der metabolischen Kompetenz von PRH erfolgte die Messung der Stoffwechselverhältnisse der für die metabolische Aktivierung von Nitrosaminen relevanten CYP Enzyme, darunter CYP2E1, CYP2A6, CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C9 und CYP2C19 in frischen PRH und in aufgetauten PRH nach Inkubation mit humanen CYP Substraten (vgl. Abschnitt 4.1, Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Zwischen aufgetauten und frisch ausplattierten PRH ließen sich mit Ausnahme von CYP2C9 nur geringe Unterschiede hinsichtlich des ermittelten Stoffwechselverhältnisses, welches Aufschluss über das Vorhandensein der Enzymaktivität gibt, feststellen (vgl. Abb. 34). Die Proteinaktivität war in frisch ausplattierten PRH höher als in aufgetauten PRH (vgl. Abb. 34). Eine Ausnahme stellt CYP 2D6 dar (vgl. Abb. 34). Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass sich kryokonservierte PRH zur Untersuchung genotoxischer Effekte von Nitrosaminen grundsätzlich eignen. Zusammenfassend konnte mit Ausnahme von CYP2C19 und CYP2A6 für alle getesteten Cytochrom-P450-Enzyme mithilfe etablierter humaner CYP Substrate ausreichend Proteinaktivität in frisch ausplattierten und in aufgetauten PRH ermittelt werden (s. Abschnitt 4.1, Abb. 34). Für CYP2E1 ließ sich ein Stoffwechselverhältnis von knapp 0.2 mM für frisch ausplattierte PRH und ein Stoffwechselverhältnis von 0.05 für aufgetaute PRH ermitteln, was die Aussage zulässt, dass PRH geeignet sind zur Untersuchung von *N*-Nitrosaminen, an deren metabolischen Aktivierung die Isoform CYP2E1 beteiligt ist. Unter den in dieser Arbeit getesteten Verbindungen existieren für NDMA, NDELA und NMA Daten, die die Beteiligung von CYP2E1 an der metabolischen Umsetzung belegen (Carlsson *et al.*, 2025). Kleine bis mittlere dialkylierte Verbindungen zählen zu den von CYP2E1 katalysierten Substraten (Nedelcheva *et al.*, 1994; Yamazaki *et al.* 1992). Darüberhinaus haben auch die Isoformen CYP3A4, CYP2A6, CYP2D6, CYP2C9 und CYP2C19 Anteil an der metabolischen Umsetzung von verschiedenen Nitrosaminen zum jeweiligen reaktiven Intermediat (Cross *et al.*, 2021; Bringezu *et al.*, 2022). Für CYP3A4 wurde in frisch ausplattierten PRH eine Proteinaktivität von 0.05 ermittelt, während für aufgetaute PRH ein Stoffwechselverhältnis von 0.04 gemessen wurde (s. Abb. 34). CYP3A4 kann die

Aktivierung von großen Substraten katalysieren (Lewis *et al.*, 2010). Für NNN existieren Daten von Patten *et al*. die eine metabolische Aktivierung mit humanen Lebermikrosomen nach 2‘-Hydroxylierung durch CYP3A4 beschreiben (Patten *et al.*, 1997). Darüberhinaus erfolgt die Umsetzung von NNN nach 5‘ Hydroxylierung durch CYP2A6 (Patten *et al.*, 1997). Für diese Isoform ließ sich aufgrund der Abwesenheit des Substrates Nikotin keine Proteinaktivität in frischen PRH und in aufgetauten PRH ermitteln (vgl. Abschnitt 4.1, Abb. 34). Daten belegen, dass der 5‘-Hydroxylierungsweg in menschlichen Enzymsystemen Hauptaktivierungsweg zu sein scheint (Zarth *et al.*, 2016). CYP2E1 und CYP2D6 können ebenso die 5‘ Hydroxylierung von NNN katalysieren, allerdings in wesentlich geringerem Ausmaß (Patten *et al.*, 1997). Zu den bevorzugten Substraten von CYP2D6 zählen Verbindungen, die teilweise positiv geladen sind (Lewis *et al.*, 2010). Aktivität von CYP2D6 ließ sich nachweisen (vgl. Abb. 34). In frisch ausplattierten PRH konnte ein Stoffwechselverhältnis von knapp 1.25 gemessen werden, während die Isoform in aufgetauten PRH ein Stoffwechselverhältnis von fast 1.57 aufwies (Abb. 34). Neben CYP2E1 vermag auch CYP2A6 die metabolische Umsetzung von kleinen Nitrosaminen zu katalysieren (Yamazaki *et al.*, 1992, Camus *et al.*, 1993, Chowdhury *et al*., 2010). Für NDMA ließ sich eine Beteiligung von CYP2A6 an der metabolischen Umsetzung nachweisen (Yamazaki *et al*., 1992). Für CYP2C9 existieren Daten, die die bevorzugte metabolische Umsetzung von Substraten mit negativer Ladung sowie spezieller Orientierung beschreiben (Lewis *et al.*, 2010; Lonsdale *et al.*, 2013). Für diese Isoform ließ sich in frisch isolierten PRH ein Stoffwechselverhältnis von 1.63 messen, während das Stoffwechselverhältnis in aufgetauten Zellen bei 0.64 lag (Abb. 34). Weiterhin wurde das Stoffwechselverhältnis für CYP2B6 ermittelt. Dieses lag in frisch ausplattierten PRH bei 0.44 und damit etwas höher als in aufgetauten PRH, für welche ein Stoffwechselverhältnis von knapp 0.27 bestimmbar war (s. Abb. 34). Zu den bevorzugten Substraten von CYP2C19 zählen zwitterionische Substanzen (Lewis *et al.*, 2010). Für diese Isoform ließ weder in aufgetauten, noch in frisch isolierten PRH aufgrund der Abwesenheit des entsprechenden Metaboliten Hydroxymephenytoin Proteinaktivität bestimmen (s. Abschnitt 4.1). Letztlich wurde die Proteinaktivität von CYP1A2 ermittelt. Für dieses wurde in frisch isolierten PRH ein Stoffwechselverhältnis von 0.26 bestimmt, während für aufgetaute PRH ein Stoffwechselverhältnis von knapp 0.18 ermittelt werden konnte (s. Abb. 34). Das Stoffwechselverhältnis von CYP2A6 konnte zwar aufgrund der

Abwesenheit des Substrates Nikotin nicht evaluiert werden (Abb. 34). Da der Metabolit ausschließlich in behandelten PRH auftrat ließ sich sich dennoch Proteinaktivität dieser Isoform bestätigen (vgl. Abb. 34, Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Zusammenfassend war die Proteinaktivität in aufgetauten PRH für die Mehrheit der untersuchten CYP Enzyme geringer als in frischen PRH (vgl. Abschnitt 4.1). Für die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse bleibt zu berücksichtigen, dass das ermittelte Stoffwechselverhältnis frisch ausplattierter und aufgetauter PRH relative Aktivitäten anstelle von absoluten Aktivitäten beschreibt, welche in der Literatur oftmals in der Umsetzungseinheit pmol/min/Menge Protein angegeben sind (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Zudem wurde bei der Substratauswahl die Spezifität hinsichtlich humaner CYP Enzyme berücksichtigt, während keine Selektion anhand der Affinität erfolgte (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Darüberhinaus existieren in den primären Hepatozyten Phase-II-Enzyme, die in der Lage sind, die metabolische Umsetzung von Phase-I-Metaboliten zu katalysieren und damit eine exakte Messung der vorliegenden Proteinaktivität beeinträchtigen können (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Aus den genannten Gründen liefern die erhobenen Daten nur qualitative Ergebnisse hinsichtlich untersuchter Proteinaktivitäten (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In Studien von Gómez-Lechón und Coautoren wurden hingegen die absolute Proteinaktivität aufgetauter und frisch ausplattierter PRH in pmol/min/Menge Protein mithilfe des 7-ethoxycoumarin O-deethylation (ECOD) Assays, der zur Aktivitätsmessung verschiedener CYP Enzyme geeignet ist, bestimmt (Gómez-Lechón *et al.*, 2006). Die Autoren verwendeten darüberhinaus CYP Isoformspezifische Substrate der Ratte (Gómez-Lechón *et al.*, 2006). Hierbei lag die Aktivität der an der Metabolisierung von Fremdstoffen beteiligten CYP Enzyme im Bereich von 55 % – 75 % (Gómez-Lechón *et al.*, 2006). Die prozentuale Aktivität von CYP2C9 in aufgetauten PRH lag in dieser Arbeit bei 39 %, während sie für CYP3A4 bei knapp 81 % im Vergleich zu frisch ausplattierten PRH lag (s. Abschnitt 4.1). Mit Ausnahme des Enzyms CYP2D6, für welches in dieser Arbeit aufgetaute PRH höhere Aktivität als frisch isolierte PRH aufwiesen, und den Aktivitäten von CYP3A4 sowie CYP2C9 lag die Aktivität übriger CYP Enzyme in aufgetauten PRH innerhalb dieses von Gómez-Lechón publizierten Bereiches von 55 % – 75 % der CYP Enzym Aktivität frisch isolierter PRH (s. Abschnitt 4.1, Abb. 34). In Studien von Hengstler *et al.* wurde die

absolute Proteinaktivität frischer humaner Hepatozyten mit der Proteinaktivität kryokonservierter humaner Hepatozyten durch Analyse der 7-Ethoxy-Resorufin-O-De-ethylase (EROD), welche insbesondere Maß für die CYP1A Aktivität ist, sowie durch Analyse der ECOD Aktivität verglichen (Hengstler *et al.*, 2000). Hierbei wiesen kryokonservierte Hepatozyten bis zu zwei Stunden nach Auftauen eine Proteinaktivität > oder = 60 % im Vergleich zu frisch ausplattierten Hepatozyten auf (Hengstler *et al.*, 2000). Für CYP3A4, CYP2B6 und CYP1A2 sind diese Daten mit 80 %, 61.4 % und 69.3 % ähnlich wie in den Studien von Hengstler und Coautoren (vgl. Abschnitt 4.1). Für CYP2E1 und CYP2C9 lag die Proteinaktivität aufgetauter PRH mit 25 % und 39.3 % deutlich unter der Proteinaktivität frischer PRHs, während sich für CYP2D6 mit 126 % eine deutlich höhere relative Aktivität gegenüber frischen PRH feststellen ließ (vgl. Abschnitt 4.1). Eine alternative Methode zur genauen Quantifizierung der Enzymaktivität wird durch Burczynsky und Coautoren beschrieben, in welcher die Proteinaktivität der am Fremdstoffmetabolismus beteiligten CYP Enzyme CYP1A1, CYP2B1/2 und CYP3A1 nach Enzyminduktion untersucht wurde (Burczynski *et al.*, 2001). Dabei erfolgte die Inkubation von PRH in Medium, welches die Enzyminduktoren von CYP1A1, CYP2B1/2 und CYP3A1 β-Naphtoflavon, Phenobarbital und Hydrocortison enthielt (Burczynski *et al.*, 2001). Nach der Inkubationszeit erfolgte ein Mediumwechsel und eine zweite Inkubationsphase für 2 h mit den CYP450 enzymspezifischen Substraten der Ratte, wobei für CYP1A1 Phenacetin und für CYP2B1/2 und CYP3A1 Testosteron verwendet wurde (Burczynski *et al.*, 2001). Nach Zellernte erfolgte die Messung mittels LC-MS/MS, um durch Quantifizierung der Metaboliten die Proteinaktivität in pmol Metabolit/10^6 Zellen/Minute zu bestimmen (Burczynski *et al.*, 2001). Relative Metabolitenaktivität erfolgte durch Normierung auf die Standardkalibrationsgerade nicht behandelter Kontrollzellen (Burczynski *et al.*, 2001). Die Untersuchung der absoluten Proteinaktivität von CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP2B6 und CYP3A4 in pmol/min/mg Protein erfolgte in HepG2 und in HepaRG Zellen durch Seo und Coautoren (Seo *et al.,* 2019). Für alle CYP Enzyme konnten in HepaRG über einen Kultivierungsdauer von 24 Tagen höhere Aktivitäten gemessen werden als in HepG2 Zellen (Seo *et al.,* 2019). Hierbei lagen die Aktivitäten von CYP3A4 und CYP2C9 zwischen 22 pmol/min/mg Protein und 58 pmol/min/mg Protein, während die Umsetzungsraten von CYP1A2 und CYP2B6 zwischen 2.1 und 6.4 pmol/min/mg Protein lagen (Seo *et al.,* 2019). Die metabolische Aktivität von CYP2D6 war mit < 3

pmol/min/mg Protein am niedrigsten (Seo *et al.,* 2019). Alle Aktivitäten waren über den Zeitraum von 24 h konstant oder etwas höher als zu Beginn der Kultivierung (Seo *et al.,* 2019). Auch in frisch ausplattierten PRH konnte für CYP2C9 die höchste Enzymaktivität gemessen werden (vgl. Abschnitt 4.1, Abb. 34). Die relative Aktivität von CYP3A4 in PRH hingegen war wesentlich geringer ausgeprägt als in HepaRG Zellen (vgl. Abschnitt 4.1, Abb. 34). Die relativen Aktivitäten von CYP1A2 und CYP2B6 im Vergleich zu CYP2C9 waren wie in HepaRG Zellen geringer (vgl. Abschnitt 4.1). Allerdings ließen sich in HepaRG Zellen für CYP2B6 und CYP1A2 eine im Vergleich zu CYP2C9 9.4-fach geringere Proteinaktivität nachweisen, während diese in PRH für beide Isoformen nur 4.7-fach geringer war als die Aktivität von CYP2C9 (vgl. Abschnitt 4.1). Dagegen war die relative Enzymaktivität von CYP2D6 wesentlich höher ausgeprägt als in HepaRG Zellen (vgl. Abschnitt 4.1). Die Unterschiede zwischen den in PRH ermittelten Proteinaktivitäten und den von Seo *et al.* in menschlichen Leberzelllinien erhobenen Daten lassen sich vermutlich auf speziespezifische Differenzen zurückführen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In diesem Zusammenhang ist bekannt dass es zwischen Mensch und Nager Unterschiede im Hinblick auf Expression, Aktivitätslevel und Isoform Komposition gibt, was die Unterschiede im Hinblick auf die Aktivitäten von CYP2D6 und CYP3A4 zwischen PRH und HepaRG Zellen erklären könnte (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). So kann die wesentlich höhere Proteinaktivität von CYP3A4 in HepaRG Zellen auf die Verwendung eines humanspezifischen Substrates in den Studien von Seo *et al.* sowie den in PRH durchgeführten Metabolismusuntersuchungen innerhalb dieser Arbeit zurückgeführt werden (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Humanes CYP3A4 entspricht den CYP3A1/-3A2 Orthologen der Ratte, welche ausschließlich in der Leber exprimiert werden (Cross *et al.*, 2021; Martignoni *et al.*, 2006). Es existieren Studien, die mithilfe prototypischer Substrate wie Nifedipin belegen, dass Unterschiede in katalytischer Aktivität und Substratspezifität zwischen menschlichem CYP3A4 und CYP3A1/-3A2 der Ratte bestehen (Carr *et al.*, 2006). Speziesspezifische Unterschiede im Hinblick auf Proteinaktivität zwischen PRH und PHH werden in einer weiteren Studie von Seo *et al.*, demonstriert (Seo *et al.*, 2020), In diesem Zusammenhang ließ sich ausreichende Proteinaktivität von CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6 und CYP3A4 in PHHs dreier unterschiedlicher Spender PHH 1085, PHH 1090 und PHH 1054 nachweisen (Seo *et al.*, 2020). Seo konnte in diesem Zusammenhang für CYP3A4 die höchste absolute

Proteinaktivität in pmol/min/mg Protein messen, gefolgt von CYP2D6 für PHH 1085 und PHH 1090, CYP2C9 für PHH 1085 und PHH 1090, CYP1A2 gefolgt von CYP2B6 für alle drei Spender, während die in frisch ausplattierten PRH gemessene relative Stoffwechselaktivitäten zu einer abweichenden Reihenfolge in Form von CYP2C9 > CYP2D6 > CYP2B6 > CYP1A2 > CYP3A4 führte (vgl. Abschnitt 4.1, Abb. 34, *Seo et al*, 2020). Seo und Coautoren demonstrierten durch Messung von CYP Enzymen unterschiedlicher Spender interindividuelle Unterschiede im Hinblick auf enzymatische Aktivitäten. (Seo *et al.*, 2020; Seo *et al.*, 2025).

5.2 Untersuchung der Zytotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in PRH mittels Zellviabilitätstest

5.2.1 Effekt von CPA

CPA weist infolge von metabolischer Aktivierung zytotoxische und genotoxische Effekte auf und lieferte in diesem Rahmen Hinweise auf die metabolische Kompetenz von PRH (De Jonge *et al.*, 2005). In aufgetauten und in frischen PRH führten Konzentrationen > 500 µM zu zytotoxischen Effekten nach 24 h Inkubation (vgl. Abb. 35). Behandlung mit 8 mM CPA führten zu einer Reduktion der Zellviabilität um mindestens 90 % im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 35). Die generierten Daten korrellieren mit Studien von Acosta *et al.*, in welchen die metabolische Aktivierung von CPA sowie die mit den resultierenden Metaboliten einhergehenden, zytotoxischen Effekten in primären, postnatalen PRH demonstriert wurde (Acosta *et al.*, 1981). Es ließ sich eine Reduktion der Zellviabilität von Fibroblasten feststellen, die mit PRH ko-kultiviert wurden (Acosta *et al.*, 1981). In Studien von Seo und Coautoren konnten zytotoxische Effekte von CPA in PHHs nachgewiesen werden (Seo *et al.*, 2020). Die mittels MTS Assay festgestellte Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle lag nach 24 h Inkubation mit 10 mM CPA bei knapp 10 % und war damit vergleichsweise schwach ausgeprägt (Seo *et al.*, 2020). In HepaRG Zellen lag die mithilfe des ATP Assays gemessene Abnahme der Zellviabilität nach 24 h Inkubation mit 10 mM CPA bei knapp 30 %, während in HepG2 Zellen eine Abnahme um knapp 10 % demonstriert werden konnte (Seo *et al.*, 2019). Studien von Struck *et al.* konnten erstmals die Bildung des zytotoxischen Phosphoramidmustards nach zellulärer Aufnahme von CPA im Blut von Mäusen nachweisen (Struck *et al.*, 1975). Dieses entsteht nach Zerfall des ringoffenen Tautomers des nach Hydroxylierung von CPA gebildeten 4-

Hydroxycyclophosphamid (4-OH-CPA), Aldophosphamid, nach β-Eliminierung (Fenselau *et al.*, 1977; Friedman *et al.*, 1976; Connors *et al.*, 1974; Völker *et al.*, 1974; Alarcon *et al.*, 1971). Gleichzeitig wird durch β-Eliminierung Acrolein freigesetzt, das ebenfalls zytotoxisch ist (Fenselau *et al.*, 1977; Friedman *et al.*,1976; Connors *et al.*, 1974; Völker *et al.*, 1974; Alarcon *et al.*, 1971). Die an der metabolischen Aktivierung sowie Detoxifizierung von CPA beteiligten CYP Enzyme konnten unter anderem in Studien von Huang *et al.* aufgeklärt werden (Huang *et al.*, 2000). Hieran sind veschiedene CYP Enzyme involviert, darunter CYP2A6, CYP2B6, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9, CYP2C18 und CYP2C19, wobei CYP2B6 hauptsächlich an der nach α-Hydroxylierung enstehenden Bildung von 4-OH-CPA beteiligt ist (Connors *et al.*, 1974; Chang *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1997; Ren *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000; ; Griskevicius *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2003; De Jonge *et al.*, 2005). Die in PRH aufgetretenen zytotoxischen Effekte lassen sich mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Proteinaktivitäten der an der Bioaktivierung zu 4-OH-CPA hauptsächlich beteiligten Enzyme CYP3A4 und CYP2B6 erklären, welche basierend auf dem gemessenen Stoffwechselverhältnis von Metabolit und Substrat ausreichend Proteinaktivität in PRH aufweisen (vgl. Abb. 34, Abb. 35, Roy *et al.*, 1999). Sowohl Acrolein als auch Phosphoramidmustard können als Begründung für die Abnahme der gemessenen Zellviabilität in PRH herangezogen werden (s. Abschnitt 4.2.1). Diese basiert für die jeweiligen Metaboliten auf unterschiedlichen Mechanismen. Acrolein trägt durch Depletion von zellulärem Glutathion zur Zytotoxizität von CPA bei (Crook *et al.*, 1986; Gurtoo *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1991). Die durch Phosphoramidlost induzierte Bildung von DNA-, und RNA-cross-links führt in der Folge zur Inhibierung der Proteinsynthese und in diesem Zusammenhang zur Auslösung zytotoxischer Effekte (Ogino *et al.*, 2023; Mills *et al.*, 2019; Korkmaz *et al.*, 2007). Cross-links werden sowohl innerhalb als auch zwischen benachbarten DNA-Strängen an der N7 Position von Guanin gebildet (Ogino *et al.*, 2023). Für das CPA Analogon Maphosphamid konnte in Lymphoblastoid Zellen (p53 wt) ein Apoptose initiierender Mechanismus aufgeklärt werden (Goldstein *et al.*, 2008). So führte diese Substanz nach Aktivierung von ATM/ATR zur nachfolgenden Phosphorylierung von CHK1/CHK2, welche die Phosphorylierung von p53 an Ser15, Ser20 und Ser37 katalysierten (Goldstein *et al.*, 2008). Damit induzierte Maphosphamid durch Stabilisierung von p53 den Caspase abhängigen Zelltod (Goldstein *et al.*, 2008). Es

konnte beobachtet werden, dass hohe Konzentrationen zu einer Aktivierung der Caspasen in allen Zellzyklen führt, während für geringe Konzentrationen die Aktivierung der Caspasen ausschließlich in der S-Phase festgestellt werden konnte (Goldstein *et al.*, 2008). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit geht man davon aus, dass die Auslösung des programmierten Zelltodes durch CPA auf ähnlichen Mechanismen beruht (Goldstein *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang besteht die Annahme, dass hohe CPA Konzentrationen zu einer transkriptionsassoziierten Zelltodauslösung führen, während die Blockierung der DNA-Replikation bei geringen Konzentrationen hauptsächlich an der Auslösung der Apoptose beteiligt zu sein scheint (Goldstein *et al.*, 2008).

5.2.2 Effekt von MMS

MMS ist ein direkt wirkendes S_N2-Alkylanz, das zur Entfaltung zytotoxischer und genotoxischer Effekte keiner metabolischen Aktivierung bedarf (Lundin *et al.*, 2005). Diese Substanz wurde als Positivkontrolle im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt. In PRH induzierte MMS in konzentrationsabhängiger Weise eine Abnahme der Zellviabilität nach 24 h Inkubation (s. Abb. 36). Dies korreliert mit durch MMS hervorgerufenen, zytotoxischen Effekten in isolierten Hepatozyten (Mizumoto *et al.*, 1993; Reitmann *et al.*, 1988). Auch in Studien von Seo *et al.* ließen sich zytotoxische Effekte nach 24 h Inkubation in PHHs mittels MTS Assay nachweisen, die im Vergleich zu den in PRH erhobenen Effekten jedoch sehr schwach ausgeprägt waren (vgl. Abschnitt 4.2.2, Abb. 36, Seo *et al.*, 2020). So kam es nach Inkubation mit 500 µM MMS zu einer Abnahme der Zellviabilität um knapp 15 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Seo *et al.*, 2020). Die mittels ATP gemessene Abnahme der Zellviabilität nach Behandlung mit 500 µM MMS lag in HepaRG Zellen nach 24 h Inkubation bei knapp 20 % und bei etwa 25 % in HepG2 Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (Seo *et al.*, 2019). Zytotoxische Effekte waren damit im Vergleich zu Effekten in PRH von deutlich geringerem Ausmaß (vgl. Abb. 36, Seo *et al.*, 2019). Für diese Substanz wurde die Entstehung von N7-MeG und N3-MeA nachgewiesen, welche aufgrund der gebildeten Menge als Hauptaddukte gelten (Glaab *et al.*, 1999). Das Auftreten zytotoxischer Effekte nach der kurzen Inkubationszeit ist auf die Bildung dieser beiden Addukte, die hauptsächlich durch Basenexzision (BER) repariert werden, zurückzuführen (Lundin *et al.*, 2005). Die rasche Akkumulation dieser Addukte führt infolge der Aktivierung der BER zur Bildung von Einzelstrangbruchintermediaten, welche durch Proteine der BER generiert werden

(Fahrer *et al.*, 2023; Langelier *et al.*, 2011; Eustermann *et al.*, 2015). Nicht reparierte Einzelstrangbruchintermediate führen zum Zelltod (Sobol *et al.*, 2003). Dies ließ sich in der vorliegenden Arbeit anhand des konzentrationsabhängigen Anstiegs zytotoxischer Effekte nach Behandlung von PRH mit MMS demonstrieren, welche nach Inkubation mit 1.6 mM zu einer Reduktion der Zellviabilität von 90 % im Vergleich zur Negativkontrolle führte (s. Abb. 36). Unter den durch MMS induzierten DNA-Addukten ist N7-MeG aufgrund der spontanen Depurinierung als weniger kritisch zu betrachten (Fahrer *et al.*, 2023). Für N3-MeA konnte hingegen in Studien von Kay *et al.* in Mäusen, die AAG überexprimieren sowie in AAG knockout Mäusen ($AAG^{-/-}$) nach Behandlung mit NDMA gezeigt werden, dass die Akkumulierung von N3-MeA in $AAG^{-/-}$ starken mutagenen Effekten führt, während AAG Überexpression die Letalität der Tiere stark erhöhte (Kay *et al.*, 2021). Diese Ergebnisse weisen auf die Bedeutung eines ausgewogenen zellulären AAG-Levels hin (Kay *et al.*, 2021). Durch alkylierende Agenzien wie MMS hervorgerufene Einzelstrangbrüche können zur Aktivierung von PARP-1 führen, welches die Entstehung von Poly(ADP-ribose) (PAR) unter NAD+ Verbrauch katalysiert (Mizumoto *et al.*, 1993; Mangerich *et al.*, 2012). Das Biopolymer erleichtert durch Veränderung der Chromatinstruktur die BER Reparatur und bindet an XRCC1, das an der BER und Reparatur von Einzelstrangbrüchen beteiligt ist (De Vos *et al.*, 2012; Breslin *et al.*, 2015). Dies demonstriert, dass PARP-1 zur Beschleunigung des BER Reparaturweges führt (Ström *et al.*, 2011; De Vos *et al.*, 2012). Eine *in vivo* Studie von Murcia et al konnte den zellprotektiven Einfluss von PARP-1 demonstrieren (Murcia *et al.*, 1997). PARP-1 defiziente Mäuse beispielsweise zeigten eine höhere Sensitivität gegenüber MMS mit einhergehender Bildung von N3-MeA und N7-MeG Addukten (Murcia *et al.*, 1997). Dies äußerte sich in erhöhten, unreparierten Alkylierungsschäden, die letztlich den Zelltod auslösten (Trucco *et al.*, 1998) PARP-1 kann auch an Zelltodwegen beteiligt sein (Liu *et al.*, 2022). So kann PAR welches von PARP-1 synthetisiert wird, durch die induzierte Translokation des Apoptose Inducing Factors (AIF) aus den Mitochondrien eine Form des programmierten Zelltodes, PARthanatos, auslösen (Liu *et al.*, 2022). Ein ausgeprägter DNA-Schaden kann in der Folge zu einer Akkumulation von ADP-Riboseketten und einer verstärkten NAD-Depletion führen (Mizumoto *et al.*, 1993). Mizumoto *et al.* konnte zudem zytotoxische Effekte nach Auslösung oxidativer Schäden infolge einer durch MMS induzierten Depletion von Glutathion nachweisen (Mizumoto *et al.*, 1993).

5.2.3 Effekte von NDMA und NDELA

Für NDMA sind in der Literatur einige Daten hinsichtlich Genotoxizität dokumentiert (Cross *et al.*, 2021; Fahrer *et al.*, 2023). Die Verbindung weist Studien zufolge genotoxisches und karzinogenes Potential auf, weshalb sie von der IARC in Kategorie 2A eingestuft wird (IARC, 1978). 1978 NDMA wird durch CYP2E1 metabolisch aktiviert. Für dieses CYP Enzym ist in PRH ausreichend Aktivität vorhanden (Abb. 34, Yamazaki *et al.*, 1992). Hauptaddukte die nach Behandlung mit NDMA auftreten sind neben O^6-MeG N7-MeG und N3-MeA (Fahrer *et al.*, 2023). Geradkettige Alkylläsionen an N3-A, N7-G und N3-G werden hauptsächlich durch BER behoben (Fahrer *et al.*, 2023). Da es nach Bildung von N7-MeG oft zu einer spontanen Depurinierung kommt, sind zytotoxische Effekte größtenteils auf N3-MeA zurückzuführen (Fahrer *et al.*, 2023). Dieses triggert die BER, was bei einer Überexpression von AAG in einer Akkumulation von Einzelstrangbruchintermediaten resultiert und in der Folge zum Zusammenbruch der Replikationsgabel und zu Doppelstrangbrüchen führen kann (Ensminger *et al.*, 2014). Die Behandlung von PRH mit 10 mM NDMA führten nach 24 h zu maximalen zytotoxischen Effekten, wobei die mittels Zellviabilitätstest gemessene Reduktion der Viabilität im Vergleich zur Negativkontrolle bei 12 % lag (vgl. Abschnitt 4.2.1 und Abb. 37). Die Abnahme der Zellviabilität in PRH korrelliert hinsichtlich der Ausprägung mit Studien in HepG2-CYP2E1 Zellen, in welchen Konzentrationen ≥ 1 mM zu zytotoxischen Effekten führten (Carlsson *et al.*, 2025). 10 mM NDMA führte nach 72 h zu einer Abnahme der Zellviabilität um mehr als 12 % (Carlsson *et al.*, 2025). Die durch NDMA hervorgerufenen Effekte waren damit in Abhängigkeit des Endpunktes von ähnlich oder von geringerer Ausprägung als in HepaRG Zellen, in welchen neben der Zellviabilität mit dem CellTiter-Blue Assay weitere Endpunkte zur Messung zytotoxischer Effekte herangezogen wurden, darunter die Bestimmung der Zellproliferation mithilfe des MTS-Assays sowie die Ermittlung der metabolischen Funktionalität mittels ATP-Assay (Seo *et al.*, 2019). Hierbei induzierten 10 mM NDMA nach 24 h zytotoxische Effekte zwischen 11 % und 30 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Seo *et al.*, 2019). An dieser Stelle werden die Zytotoxizitätsdaten von NDMA, die innerhalb des EMA Projektes in anderen Leberzellmodellen erhoben wurden, für vergleichende Gegenüberstellungen erläutert. Die nach Behandlung mit 10 mM aufgetretene Reduktion lebender Zellen um 12 % im Vergleich zur Negativkontrolle war in PRH etwas deutlicher ausgeprägt als der in PHH

gemessene Zellviabilitätsverlust, der bei 8.5 % lag (vgl. Abb. 37, Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In den mit S9 Mix behandelten HepG2 Zelllinien war der Effekt deutlich schwächer mit einer Reduktion der Zellviabilität um 0 - 3 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Dies korrelliert mit Studien von Seo *et al.*, in welchen 10 mM NDMA nach 24 h keine zytotoxischen Effekte in HepG2 Zellen induzierte (Seo *et al.*, 2019). Kürzere Inkubationszeiten für PHH (4 h) und HepG2 Zellen (4 h) im Vergleich zu PRH (24 h) sind bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Unterschiedliche Proteinaktivitäten in den getesteten *in vitro* Modellen des an der metabolischen Aktivierung beteiligten Hauptenzyms CYP2E1 könnten diese inhomogenen Zytotoxizitätsdaten zu den in mit S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen begründen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Auch Variabilitäten in der zellulären Aufnahme von NDMA zwischen den Zellmodellen könnten Ursache für die Unterschiede in der gemessenen Zytotoxizität sein (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Für NDELA existieren, ähnlich wie für NDMA und NNN, einige Daten hinsichtlich des mutagenen und kanzerogenen Potentials (Liu *et al.*, 2008; Lijinsky *et al.*, 1980). Nach IARC wird NDELA in Gruppe 2B eingestuft (IARC, 1978). Die Abhängigkeit zytotoxischer und mutagener Effekte von CYP2E1 konnte durch die Inhibition des CYP2E1 Enzyms durch 1-Aminobenzotriazol (ABT) demonstriert werden (Liu *et al.*, 2008). Auch in Studien von Carlsson *et al.* konnte die CYP2E1 vermittelte Zytotoxizität von NDELA in der genetisch modifizierten HepG2-CYP2E1 Zelllinie bestätigt werden (Carlsson *et al.*, 2025). Hier führten 20 mM zu einer Abnahme der Zellviabilität > 40 % nach 72 h (Carlsson *et al.*, 2025). NDELA kann nach CYP2E1 vermittelter metabolischer Aktivierung zur Entstehung von OHEdG und gdG führen (Dennehy *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008). Über die an der Reparatur dieser Addukte beteiligten Enzyme ist bisher nichts bekannt (Fahrer *et al.*, 2023; Carlsson *et al.*, 2025). 10 mM NDELA führten in PRH zu einer Abnahme der Zellviabilität um 15.5 % im Vergleich zur Negativkontrolle (vgl. Abschnitt 4.2.3, Abb. 37). In einer Studie von Liu und Coautoren ließen sich zytotoxische Effekte anhand einer konzentrationsabhängigen Zellzahlabnahme in mit CYP2E1 transfizierten V79 Zellen feststellen (Liu *et al.*, 2008). Dabei trat bis 8 mM eine um weniger als 15 % verringerten Zellzahl im Vergleich zur Negativkontrolle nach 72 h auf (Liu *et al.*, 2008). 16 mM führten zu eine im Vergleich zur Negativkontrolle um 18 % verringerte Zellviabilität (Liu *et al.*, 2008). Die Abhängigkeit zytotoxischer und mutagener Effekte von CYP2E1 konnte durch

die Inhibition des CYP2E1 Enzyms durch 1-Aminobenzotriazol (ABT) demonstriert werden (Liu *et al.*, 2008). In HepG2-CYP2E1 Zellen führten 20 mM zu einer Abnahme der Zellviabilität um > 40 % nach 72 h (Carlsson *et al.*, 2025). In PHH war die Abnahme deutlicher ausgeprägt und lag bei 22.7 % (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In HepG2 Zellen war die gemessene Zytotoxizität im Allgemeinen deutlich schwächer ausgeprägt (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). So konnte keine Reduktion viabler Zellen in mit Hamster S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen gemessen werden (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Ebenso war das Ausmaß der Zytotoxizität in mit Ratten S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen schwächer. In diesem Zellmodell konnte eine Reduktion der Zellviabilität um 4.4 % im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen werden (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Mögliche Ursachen für die Unterschiede zwischen den getesten Zellmodellen sind auf Variabilitäten in der Proteinaktivität, der Substrataufnahme in die Zelle sowie der Bindungsaffinität zur biologischen Targetstruktur, der DNA, zurückzuführen. Zudem müssen die im Vergleich zu PRH kürzeren Inkubationszeiten von HepG2 Zellen und PRH bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

5.2.4 Effekte von NMtBu und NMIPA

Mutagene Effekte von NMtBu konnten bisher nicht nachgewiesen werden (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Kuroki *et al.*, 1977). Im in V79 Zellen durchgeführten Mutagenitätstest war die Substanz negativ (Kuroki *et al.*, 1977). In Tierstudien konnte bisher kein karzinogenes Potential von NMtBu nachgewiesen werden (Gold *et al.*, 1981; Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die Substanz ist bisher nicht von der IARC klassifiziert. Für NMtBu existieren vergleichsweise wenige Daten im Hinblick auf an der metabolischen Aktivierung beteiligten CYP Enzymen und gebildeten Addukten (Fahrer *et al.*, 2023; Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In PRH lag die Reduktion der Zellviabilität nach Behandlung mit der höchsten Konzentration NMtBu für 24 h bei 16.7 % im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 38). Damit waren die Effekte deutlich intensiver ausgeprägt als in PHH und HepG2 Zellen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Hierbei lag das Ausmaß zytotoxischer Effekte nach 2 h bei 0 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). NMtBu ist ein strukturell einfaches Nitrosamin, das eine Methylgruppe aufweist (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die tert-butylgruppe kann einerseits die enzymatisch katalysierte Metabolisierung aufgrund der sterischen Hinderung des aktiven Zentrums erschweren, andererseits kann der Grad der Bindung an

die DNA aus Gründen sterischer Eigenschaften abgeschwächt sein. Für NMtBu konnte die Entstehung des tert-butyldiazoniumions nachgewiesen werden (Gold *et al.*, 1981). Nach Gold *et al.* ist für das tert-butyldiazoniumion aufgrund sterischer Hinderung keine Bindung an die zelluläre Targetstruktur möglich, was das Ausbleiben mutagener und karzinogener Effekte begründet (Gold *et al.*, 1981). Weiterhin zu beachten ist eine möglicherweise eingeschränkte zelluläre Aufnahme, die ebenfalls zum zeitlich verzögerten Eintritt potentiell messbarer Effekte führen kann. Unterschiede in den gemessenen Zellviabilitätsdaten zwischen PHHs und HepG2 Zellen können auf Variabilität in zellulärer Substrataufnahme, Metabolisierung und Bindungsaffinität zum biologischen Target zwischen den Zellmodellen zurückzuführen sein (vgl. Abb. 38, Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Zudem sind unterschiedliche Inkubationszeiten für PHHs (4 h), HepG2 Zellen (4 h) und PRHs (24 h) bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023, Abschnitt 4.2.4). NMIPA weist eine Methylgruppe auf und ist strukturell einfach aufgebaut (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Bisher existieren keine Daten zu kanzerogenen Effekten (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Im Ames Test wurde die Substanz negativ getestet (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). 2.5 mM NMIPA führte mit einer um 26.5 % reduzierten Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle zu maximalen zytotoxischen Effekten in PRH (Abb. 38). In PHH induzierte NMIPA vergleichsweise geringere Effekte, was nach 2 h anhand einer um 14.6 % reduzierten Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle feststellbar war (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In HepG2 + Ratten S9 Mix wurde nach Behandlung eine um 6 % reduzierte Zellviabilität detektiert (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Nach Behandlung in mit Hamster S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen traten keine zytotoxischen Effekte auf (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die Isopropylgruppe könnte die metabolische Aktivierung und die Bindung an die biologische Targetstruktur beeinträchtigen. Die Unterschiede zu den in PHH und HepG2 Zellen gemessenen Effekten könnten in Variabilitäten hinsichtlich der zellulären Substrataufnahme, des Vorkommens und der Affinität der an der metabolischen Aktivierung beteiligter CYP Enzyme und der Reaktivität zur biologischen Zielstruktur begründet liegen. Die im Vergleich zu PRH (24 h) kürzere Inkubationsdauer von PHHs (4 h) und HepG2 Zellen (4 h) muss bei der Interpretation der erhobenen Daten berücksichtigt werden.

5.2.5 Effekte von NNN und S-NNN

Hinsichtlich mutagener und karzinogener Effekte von NNN und S-NNN sind einige Daten in der Literatur verfügbar (Hecht *et al.*, 1980, Padma *et al.*, 1989, Balbo *et al.*, 2013). Die Verbindung wird von der IARC aufgrund nachgewiesener Kanzerogenität in verschiedenen Tierstudien sowie aufgrund nachgewiesener epidemiologischer Studien in Gruppe 1 eingestuft (IARC, 2012). An der metabolischen Aktivierung dieses tabakspezifischen Nitrosamins sind sowohl CYP2A6 als auch CYP3A4 beteiligt (Patten *et al.*, 1997). Für letztere Isoform konnte die metabolische Aktivität in PRH anhand des ermittelten Stoffwechselverhältnisses bestätigt werden (vgl. Abb. 34). Für CYP2A6 war dies aufgrund mangelnder Detektion der Ausgangsverbindung nur indirekt möglich (vgl. Abschnitt 4.1). NNN führt zur Entstehung von Pyridyloxobutyladdukten, darunter N^6-pobdAdo und O^6-pobdG (Li *et al.*, 2022; Hecht *et al.*, 1999; Hecht, Hecht *et al.*, 1986). Für letzteres Addukt konnte eine Reparatur durch die MGMT nachgewiesen werden (Mijal *et al.*, 2004). Ebenso konnte gezeigt werden, dass sowohl die NER, als auch die TLS eine Rolle bei der Behebung des durch O^6-pobdG induzierten DNA-Schadens spielen (Fahrer *et al.*, 2023; Choi *et al.*, 2006). Während der GGR kann es bei sehr starken Schäden zur Bildung langer, einzelsträngiger Reparaturintermediate durch EXO1 kommen, die die DNA-Schadensantwort und die Apoptose einleiten können (Giannattasio *et al.*, 2010). NNN führt nach CYP2A6 vermittelter 5‘-Hydroxylierung zur Bildung weiterer komplexer Addukte, die zur Aktivierung der NER führen können, darunter N^6-OPB-dAdo, N^6-HPB-dAdo, Py-Py-OH-dN, Py-Py-dN und Py-Py-dI (Li *et al.*, 2022). Einen Hinweis auf die Beteiligung der NER an durch Pyridyloxobutylierung der DNA hervorgehenden Addukten konnte in Studien von XPA und XPC defizienten Lymphoblastoidzellen gezeigt werden, die eine höhere Sensitivität gegenüber Pyridyloxobutyladdukten aufwiesen als Reparatur profiziente Zellen (Brown *et al.*, 2008). Wie in Abbildung 39 dargestellt kam es nach 24 h Behandlung mit der racemischen Form in PRH zu einer etwas deutlicheren Abnahme der Zellviabilität als nach Behandlung mit dem S-Enantiomer. So wurde nach Behandlung mit der racemischen Form eine Abnahme der Zellviabilität um 44 % im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen, während nach Behandlung mit dem S-Enantiomer keine Reduktion feststellbar war (vgl. Abb. 39). Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte die Organspezifität der von NNN induzierten Effekte berücksichtigt werden, welche demonstriert, dass die Affinität der in der Leber vorkommenden und an der

metabolischen Aktivierung von NNN beteiligten CYP Enzyme geringer als im Ösophagus ist (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023, Li *et al.*, 2022). Die in PRH erhobenen Ergebnisse deuten eine enzymatische Bevorzugung der racemische Form an (vgl. Abb. 39). In Studien von Li *et al*. konnte gezeigt werden, dass S-NNN im Vergleich zur racemischen Form nicht durch CYP2A Formen der Spezies Ratte über den 2'-Hydroxylierungsweg metabolisiert wird, was die unterschiedliche Zytotoxizität für die beiden Enantiomere, die innerhalb dieser Arbeit in PRH ermittelt wurde, begründen kann (Li *et al.*, 2022; Wong *et al.*, 2005). Eine weitere Ursache für vergleichsweise geringere zytotoxische zytotoxische Effekte könnte die langsamere, zelluläre Aufnahme des S-Enantiomers sein. Darüberhinaus können Unterschiede in der Stereochemie zu verschieden starker Bindungsaffinität an die biologische Targetstruktur, der DNA, führen. In PHH kam es nach 2 h zu keiner messbaren Reduktion der Zellviabilität nach Behandlung mit der höchsten Konzentration NNN (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). S-NNN führte hingegen zu einer Abnahme um 13.4 % im Vergleich zur Negativkontrolle. Eine höhere Affinität des S-Enantiomers zu den an der metabolischen Umsetzung beteiligten CYP Enzymen in PHH könnten Ursache für diese Differenz im Hinblick auf die gemessene Zellviabilität sein. In mit Ratten S9 Mix behandelten HepG2 Zellen kam es nach Behandlung mit der racemischen Form zu einer Abnahme der Zellviabilität um 40 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Djuari & Londenberg *et al.,* 2023*).* Das S-Enantiomer führte zu einer etwas geringer ausgeprägten Reduktion der Zellviabilität um 32.7 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). In mit Hamster S9 Mix behandelten HepG2 Zellen führten weder NNN noch S-NNN zu einer starken Abnahme der Zellviabilität (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). Die Unterschiede, die zwischen den im Rahmen des EMA Projektes verwendeten Zellmodellen aufgetreten sind, könnten einerseits auf Differenzen der Proteinaktivität-, und affinitäten von an der Metabolisierung von NNN und S-NNN beteiligten CYP Enzymen zurückzuführen sein, andererseits auf Unterschieden in der zellulären Substrataufnahme sowie Bindung gebildeter Addukte an die biologische Targetstruktur beruhen (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). Zwischen den Zellmodellen gibt es für CYP2D6 Proteinaktivität die größten Unterschiede zwischen PHHs, PRHs und HepG2 Zellen (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). Eine Beteiligung dieser Isoform an der metabolischen Aktivierung von S-NNN und NNN könnte die Unterschiede zwischen den Zellmodellen erklären (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen zudem die im

Vergleich zu PRHs kürzeren Inkubationszeiten in PHHs und HepG2 Zellen berücksichtigt werden (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023).

5.2.6 Effekt von NPro

Ferner tritt NPro in Tabakrauch auf (Brunnemann *et al.*, 1983). Das nicht kanzerogene Nitrosamin entsteht endogen im Magen unter saurem pH-Wert, was in verschiedenen Studien beschrieben ist (Liinsky *et al.*, 1970, Ishibashi *et al.*, 1981, Lijinsky *et al.*, 1987). In diesem Zusammenhang konnte in einer Studie von Ishibashi *et al.* demonstriert werden, dass die Aminosäuren L-Citrullin und L-Arginin nach Reaktion mit Nitrit unter sauren Bedingungen zur Entstehung von NPro führen (Ishibashi *et al.*, 1981). Im Ames Test ist diese Verbindung negativ (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Dieses *N*-Nitrosamin wurde in Tierstudien untersucht ohne Hinweis auf kanzerogene Effekte und wird nach IARC daher in Klasse 3 eingestuft (IARC, 1978). NPro kann jedoch als Vorläufermolekül zur Entstehung karzinogener Nitrosoverbindungen beitragen (Ishibashi *et al.*, 1981). So wurde bereits die Bildung von N-Nitrosopyrrolidin (NPYR) nach Decarboxylierung unter dem Einfluss hoher Temperaturen aus NPro festgestellt (Ishibashi *et al.*, 1981). In der Literatur existieren keine Daten hinsichtlich der an der metabolischen Aktivierung beteiligten CYP Enzyme und in der Folge gebildeter Addukte (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Nach 24 h Behandlung von PRH mit NPro trat eine Abnahme der Zellviabilität um 73.3 % im Vergleich zur Negativkontrolle auf (vgl. Abschnitt 4.2.6, Abb. 40). Die zweistündige Inkubation hatte bis 5 mM keine vergleichbaren Effekte auf die Zellviabilität (vgl. Abb. 40). Nach Behandlung mit 10 mM kam es sowohl nach 24 h als auch nach 2 h zu einer starken Reduktion der Zellviabilität (vgl. Abb. 40). Aufgrund struktureller Ähnlichkeit zur Aminosäure Prolin, die endogen vorkommt, könnte die Ursache für zytotoxische Effekte in einer Interaktion mit zellulären Prozessen wie beispielsweise dem Energiestoffwechsel oder dem Redox Signaling, an welchem Prolin beteiligt ist, liegen ((Ahn *et al.*, 2015; Phang *et al.* 2019). Behandlung mit 5 mM führten in PHH zu einer deutlich schwächer ausgeprägten Reduktion der Zellviabilität um 13.5 % (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023) In mit S9 Mix behandelten HepG2 Zellen hatte NPro keinen Einfluss auf die Zellviabilität (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Speziesunterschiede im Hinblick auf die enzymatische Ausstattung könnten als Ursache für die feststellbaren Unterschiede herangezogen werden. Denkbar sind auch unterschiedliche zelluläre Aufnahmegeschwindigkeiten von NPro.

5.2.7 Effekt von NMA

Kanzerogene Effekte von NMA konnten in Tierstudien nachgewiesen werden (Schmähl *et al.*, 1976). Zudem demonstrieren verschiedene Studien mutagene Effekte dieses *N*-Nitrosamins (Zielenska *et al.*, 1988). Die Denitrosierung von NMA führt zur Detoxifizierung und wird sowohl durch CYP2B1 als auch durch CYP2B2 katalysiert (Stiborová *et al.*, 1996). In Studien von Quan *et al.* konnte die CYP2E1 vermittelte metabolische Aktivierung demonstriert werden (Quan *et al.*, 1992; Kroeger-Koepke *et al.*, 1981). Die Beteiligung von CYP2E1 an der metabolischen Aktivierung von NMA konnte zudem in Studien von Carlsson *et al.* demonstriert werden (Carlsson *et al.*, 2025). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass nach metabolischer Aktivierung von NMA BDI entsteht, dass nach Reaktion mit der DNA zur Bildung von N^6-Adenin führt (Koepke *et al.*,1990). Gleichzeitig entsteht Formaldehyd (Kroeger-Koepke et al., 1981). Zu den an der Reparatur von N^6-Adenin beteiligten Mechanismen und damit einhergehenden zytotoxischen Effekten ist bisher wenig bekannt (Fahrer *et al.*, 2023). In Tierstudien konnte Organspezifität von NMA festgestellt werden (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die Tumorinzidenz im oberen Verdauungstrakt ist gegenüber der Tumorinzidenz in der Leber erhöht, was auf Unterschiede in Vorkommen und Affinität der an der metabolischen Aktivierung von NMA beteiligten CYP Enzyme hindeutet (Napalkov *et al.*, 1969; Goodall *et al.*, 1970; Druckrey *et al.*, 1967). In PRH führte NMA nach 24 h zu einer Abnahme der Zellviabilität um 41 % nach Behandlung mit der höchsten Konzentration (s. Abb. 41). In HepG2-CYP2E1 Zellen führten 1 mM NMA zu einer im Vergleich zur Negativkontrolle um 12.5 % reduzierten Zellviabilität nach 72 h (Carlsson *et al.*, 2025). Die zytotoxischen Effekte von NMA könnten auf die Enstehung von Formaldehyd zurückzuführen sein. So wurde in PRH gezeigt, dass Formaldehyd durch Reaktion mit zellulären antioxidativen Molekülen wie Glutahion oxidativen Stress auslöst, welcher zur reduzierten mitochondrialen Energiestoffwechsel und in höheren Konzentrationen zu Lipidperoxidation führen kann (Teng *et al.*, 2001). Ähnlich stark ausgeprägt wie in PRH war die Abnahme nach 2 h in PHH mit 33.5 % (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In beiden HepG2 Zellmodellen induzierte NMA keine vergleichbaren zytotoxischen Effekte (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Mögliche Ursachen für die feststellbaren Differenzen zwischen PHHs, HepG2 Zellen und PRHs sind auf Unterschiede in der Proteinaktivität der an Toxifizierungs-, und Detoxifizierungsreaktionen beteiligten CYP Enzyme, Ausmaß der zellulären Aufnahme

sowie Bindungsaffinität zur biologischen Targetstruktur zurückzuführen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen zudem die unterschiedlichen Inkubationszeiten in PRHs (24 h) im Vergleich zu PHHs (4 h) und HepG2 Zellen (4 h) berücksichtigt werden (vgl. Abschnitt 4.2.7; Djuari & Londenberg *et al.*, 2023).

5.2.8 Effekt von NFA

NFA weist eine sperrige Struktur auf und kommt als Verunreinigung in Arzneimitteln vor (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Mutagene Effekte konnten für NFA bisher nicht nachgewiesen werden (Heflich *et al.*, 2024). Aufgrund fehlender Evidenz kanzerogener Effekte in Tierstudien wird diese Substanz nach IARC in Klasse 3 eingestuft (IARC, 1978). In PRH führte NFA nach 24 h zu einer Reduktion der Zellviabilität um 85.2 % im Vergleich zur Ne-gativkontrolle (s. Abb. 42). Nach 2 h inkubation trat keine vergleichbare Abnahme der Zellviabilität ein (vgl. Abb. 42). Für NFA existieren keine Daten hinsichtlich der an der metabolischen Aktivierung beteiligten Enzyme und gebildete DNA-Addukte (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die Substanz weist eine komplexe Struktur auf, weshalb die Bildung sperriger Addukte wahrscheinlich ist. Die Auslösung zytotoxischer Effekte könnten einerseits durch sperrige Addukte induziert worden sein, andererseits duch direkte Interaktion von NFA oder des enstandenen Metaboliten mit zellulären Prozessen. Folsäure tritt endogen auf und ist an der Zellteilung, der Zellsynthese und der Bildung der Aminosäure Methionin beteiligt (Reynolds *et al.*, 2006; Mahmood *et al.*, 2014). Eine Interaktion von NFA mit an den für die Folsäuresynthese beteiligten Enzymen ist aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit denkbar und könnte durch resultierenden Folsäuremangel zu einer Beeinträchtigung genannter Prozesse führen. Der leichte Farbumschlag nach Behandlung mit Konzentrationen > 5 mM weist auf pH-Wert begründete zytoxische Effekte hin (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Zudem kam es nach Anwendung von Konzentrationen > 5 mM zur leichten Präzipitation, was ebenfalls eine Beeinträchtigung der Zellviabilität zur Folge haben könnte (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In PHH waren zytotoxische Effekte nach 2 h wesentlich geringer ausgeprägt (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023) Nach Behandlung mit 2 mM trat eine Abnahme der Zellviabilität um 10.8 % im Vergleich zur Negativkontrolle auf (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In den mit S9 Mix behandelten HepG2 Zelllinien induzierte NFA keine zytotoxischen Effekte (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die in PHH und HepG2 Zellen erhobenen Daten korrellieren mit

Studien in HepaRG Zellmodellen, in welchen 4 mM NFA zu einer Reduktion der ATP-Konzentration um maximal 13 % im 3D Zellmodell und um 10 % im 2D Zellmodel nach 24 h führte (Seo *et al.*, 2025). Auch im Rahmen weiterer von Seo *et al.* durchgeführter Zellviabilitätsmessungen waren die nach 24 h messbaren zytotoxischen Effekte noch gering ausgeprägt, wobei 4 mM NFA in 2D HepaRG Zellen zu einer Abnahme des relativen Zellüberlebens um 2 % im Vergleich zur Negativkontrolle führte (Seo *et al.*, 2025). Im 3D Zellmodell blieben zytotoxische Effekte gänzlich aus, was durch ein relative Zellüberleben sowie einer ATP-Konzentration von 100 % demonstriert werden konnte (Seo *et al.*, 2025). Dies verweist auf Ähnlichkeiten in Art und Aktivität der an Detoxifizierungs-, und Toxifizierungsreaktionen beteiligten Proteine in HepaRG Zellmodellen und PHH sowie HepG2 Zellen. Zudem könnte eine höhere Konzentration und Affinität detoxifizierender Enzyme in PHH, HepG2 Zellen und HepaRG Zellmodellen im Vergleich zu PRH die Unterschiede im Hinblick auf das Ausmaß zytotoxischer Effekte begründen. Auch eine schnellere Substrataufnahme in PRH könnte die Unterschiede erklären, ebenso eine höhere Bindungsaffinität zum zellulären Targetmolekül. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss zudem die im Vergleich zu PHH (4 h) und HepG2 Zellen (4 h) längere Inkubationszeit in PRH (24 h) berücksichtigt werden.

5.2.9 Effekt von NND

NND kommt als Verunreinigung in Arzneimitteln vor (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Derzeit gibt es keine Hinweise auf mutagene und kanzerogene Effekte der Substanz (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die nicht nitrosierte Verbindung Desloratadin ist negativ im Ames Test (Brambilla *et al.*, 2011). In Langzeitkarzinogenitätsstudien in weiblichen und männlichen Mäusen traten keine tumorinduzierenden Effekte nach Exposition gegenüber Desloratadin auf (Brambilla *et al.*, 2011). In PRH führten 250 µM und 500 µM NND nach 24 h zu einer Reduktion der Zellviabilität um 100 % im Vergleich zur Negativkontrolle (vgl. Abb. 43). Nach 2 h traten ebenfalls starke zytotoxische Effekte nach Behandlung auf (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). 250 µM führten zu einer Abnahme der Zellviabilität um 93.3 % im Vergleich zur Negativkontrolle (vgl. Abb. 43). Dieses Nitrosamin wirkte nach 24 h unter allen getesteten Verbindungen mit Ausnahme von NFluo am stärksten zytotoxisch in PRH, was einerseits durch messbare Effekte nach Behandlung mit Konzentrationen im µM Bereich, andererseits durch den ermittelten EC_{50}, der bereits nach 2 h bei 139 µM lag, verdeutlicht werden konnte (vgl. Abb. 43). Für

NND gibt es keine Daten im Hinblick auf den an der metabolischen Aktivierung beteiligten Enzymen und entstehenden Addukten (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Eine Interaktion mit überlebenswichtigen zellulären Prozessen, darunter Apoptose und Autophagie, konnte für die nicht nitrosierte Form Desloratadin in Studien von Vidicevic-Novakovic in menschlichen Glioblastomzellen gezeigt werden (Vidicevic-Novakovic *et al.*, 2023). In einer weiteren Studie wurde die Initiierung der Apoptose in kutanen T-Lymphomazellen nach Reduktion von Transkriptionsfaktoren wie c-Myc und STAT3 festgestellt (Döbbeling *et al.*, 2013). Für Desloratadin wurde Zytotoxizität außerdem in verschiedenen Zelllinien, darunter EJ, SW780, U252 untersucht und bestätigt. Für die U251 Glioblastom Zelllinie sowie für humane primäre Glioblastomzellen wird die Abnahme der Zellviabilität einerseits durch die Initiierung der Apoptose, anderersits durch zytotoxische Autophagie nach Aktivierung des mTOR/AMPK Signalweges ausgelöst. Die Apoptose wurde hierbei durch eine Überproduktion an ROS, einer Externalisierung von Phosphatidylserin der Zellmembran sowie die Aktivierung der Caspase nach Behandlung mit Desloratadin in Konzentrationen von bis zu 50 µM induziert (Vidicevic-Novakovic *et al.*, 2023). Die gewählten Konzentrationen liegen zwar im Bereich der in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen NND , allerdings ist eine Übertragbarkeit nur eingeschränkt möglich, da in dieser Arbeit die nitrosierte Verbindung getestet wurde. Erklärbar wäre die starke zytotoxische Wirkung von NND in PRH durch eine Denitrosierung, welche zur Freisetzung des Desloratadin geführt haben könnte. In PHH führte NND nach Behandlung mit 5 µM zu vergleichsweise gering ausgeprägten Effekten (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). So konnte nach 2 h eine Reduktion der Zellviabilität um 17.3 % im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen werden (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In mit Hamster S9 supplementierten HepG2 Zellen hatte NND keinen Einfluss auf die Zellviabilität (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). 0.1 mM NND hatte in HepG2 Zellen, die mit Ratten S9 Mix supplementiert waren, eine Abnahme der Zellviabilität um 10 % im Vergleich zur Negativkontrolle zur Folge (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Unterschiede zwischen den Zellmodellen könnten auf Differenzen in der zellulären Aufnahme von NND, den an der metabolischen Umsetzung beteiligten Enzymen sowie an unterschiedliche Bindungsaffinitäten der Ausgangsverbindung sowie der Metaboliten an biologische Targetmoleküle wie Proteine oder DNA liegen.

5.2.10 Effekt von NFluo

NFluo weist eine komplexe Struktur auf und kommt als Verunreinigung in Arzneimitteln vor (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die Substanz ist positiv im Ames Test (Heflich *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2024; Jolly *et al.*, 2024). Es existiert keine Evidenz für karzinogene Effekte in Tierstudien (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Bisher ist NFluo von der IARC nicht klassifiziert. Inkubationen mit humanen rekombinanten CYP Enzymen demonstrierten, dass CYP2B6 hauptsächlich an der metabolischen Aktivierung von NFluo beteiligt ist (Vogel *et al.*, 2025). Eine Beteiligung von CYP2C19 und CYP3A4 konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Vogel *et al.*, 2025). Für CYP2B6 und CYP3A4 konnte in PRH ausreichend Proteinaktivität nachgewiesen werden (vgl. Abb. 34). In TK6 Zellen wurde gezeigt, dass CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4 und CYP2A6 an der metabolischen Aktivierung von NFluo beteiligt sind (Li *et al*. 2024). Für CYP2A6 konnte durch Detektion des Metaboliten indirekt metabolische Aktivität nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 4.1). Die Bildung von O^{6}-MeG und N7-MeG Methyladdukten *in vitro* konnte von Vogel *et al.* gezeigt werden. In PRH führten 500 µM NFluo nach 24 h zu einer Reduktion der Zellviabilität um 96 % im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 44). Zytotoxische Effekte waren nach 2 h deutlich geringer ausgeprägt und anhand einer um 18.4 % reduzierten Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle nach Behandlung mit 125 µM feststellbar (s. Abb. 44). Die Unterschiede im Hinblick auf das Ausmaß zytotoxischer Effekte zwischen beiden Zeitpunkten könnte auf eine Denitrosierungsreaktion von NFluo hindeuten, die zur Bildung des stark zytotoxischen Fluo führt (vgl Abschnitt 4.10, Abb. 44). Darüberhinaus könnten zytoxische Effekte aus der Bildung sperriger Addukte resultieren, die bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden konnten (Vogel *et al.*, 2025). Die im Rahmen dieser Arbeit nach 24 h erhobenen Daten korrellieren mit Studien von Seo *et al.*, in welchen NFluo insbesondere in 3D HepaRG Zellen nach 24 h zu einer starken Reduktion der Zellviabilität führte (Seo et al., 2025). Nach Behandlung mit 50 µM NFluo lag die ATP-Konzentration in HepaRG Zellen nach 24 h bei 43.1 % und das relative Zellüberleben bei 43.6 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Seo *et al.*, 2025). Auch in 2D HepaRG Zellen führten 100 µM zu einer Abnahme des relativen Zellüberlebens um 45.9 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Seo *et al.*, 2025). Ferner belegen Studien zytotoxische Eigenschaften von NFluo in Säugetierzellmodellen (Geijer *et al.*, 2025). In PHH führte NFluo zu einer Reduktion der Zellviabilität um 10.4 % im Vergleich zur

Negativkontrolle (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In HepG2 Zellen + Hamster S9 Mix trat nach Behandlung mit NFluo eine Reduktion der Zellviabilität um 14.9 % im Vergleich zur Negativkontrolle auf (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). NFluo hatte keinen Einfluss auf die Zellviabilität in mit Ratten S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Unterschiede zwischen den Zellmodellen im Hinblick auf zytotoxische Effekte von NFluo könnten auf Variabilitäten in der zellulären Substrataufnahme zurückzuführen sein. Ferner könnten Abweichungen in Vorkommen und Affinität der an der metabolischen Aktivierung beteiligten CYP Enzyme die Unterschiede erklären. Denkbar sind zudem unterschiedliche Bindungsaffinitäten zum biologischen Targetmolekül. Bei der Interpretation der Ergebnisse müssen zudem die unterschiedlichen Inkubationszeiten in PRH (24 h, 2 h) im Vergleich zu PHH (4 h) und HepG2 Zellen (4 h) berücksichtigt werden.

5.2.11 Effekt von Fluo

Fluo ist ein selektiver Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitor (SSRI), der zur Behandlung von Depressionen zugelassen ist (Brambilla *et al.*, 2005). Die Untersuchung zytotoxischer Effekte von Fluo in PRH diente der Interpretation der durch NFluo hervorgerufenen Effekte. Behandlung mit der höchsten Konzentration führten in PRH zu einer Reduktion der Zellviabilität um 98.74 % nach 24 h, während Fluo nach 2 h Inkubation die Zellviabilität um 98.25 % im Vergleich zur Negativkontrolle reduzierte (Abb. 45). Für Fluoxetin waren damit sowohl nach 24 h als auch nach 2 h sehr starke zytotoxische Effekte messbar (Abb. 45). Das zytotoxische Potential ist von größerem Ausmaß als das von NND, was anhand eines EC_{50}-Wertes von 38 µM nach 2 h Inkubation demonstriert werden konnte (vgl. Abschnitt 4.2.9, Abschnitt 4.2.11). Im Hinblick auf Zytotoxizität wurde insbesondere die Energiesynthese mit einer damit einhergehenden Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion in der Vergangenheit genauer untersucht (Souza *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2016). Zytotoxizität wurde in aus der Spezies Ratte isolierten hepatischen Mitochondrien nachgewiesen, in welchen unter anderem Proteine der Atmungskette sowie die membrangebundene Form der F1F0-ATPase durch Konzentrationen im Bereich 0.24 - 0.32 mM gehemmt wurde (Souza *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2016). In diesem Zusammenhang wurde eine reduzierte ATP-Synthese verbunden mit einem reduzierten Sauerstoffverbrauch beobachtet (Souza *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2016). An der Hemmung war zudem Norfluoxetin, des aus Fluoxetin nach CYP2D6, CYP2C9 und

CYP2C19 katalysierter Metabolisierung entstehenden Metaboliten beteiligt (Souza *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2016; Scordo *et al.*, 2005). In PRH konnte ausreichend Proteinaktivität von CYP2D6 und CYP2C9 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 34). PRH weisen aufgrund der Proteinaktivität von CYP2D6 und CYP2C9 die zur Bildung von Norfluoxetin enzymatischen Vorraussetzungen auf (vgl. Abschnitt 4.1). Daher können gemessene zytotoxische Effekte in PRH auch von der nach Demethylierung entstehenden Verbindung Norfluoxetin verursacht worden sein. Ein weiteres Targetmolekül nach Inkubation mit 50 µM Fluoxetin ist das in der mitochondrialen Membran lokalisierte spannungsabhängige Kanalprotein VDAC hepatischer Mitochondrien der Ratte, dessen Leitfähigkeit nach Bindung des SSRIs vermindert wurde (Nahon *et al.*, 2005). In der Folge führte dies zur Freisetzung von Cytochrom C (Nahon *et al.*, 2005). Weiterhin konnte in Untersuchungen an PC12-Zellen der Ratte gezeigt werden, dass 15 µM Fluoxetin die mitochondrienvermittelte Apoptose aktiviert. Darüberhinaus wurde diese Form der Apoptose durch Fluoxetin in Kombination mit 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) verstärkt induziert, was sich anhand von Cytochrom-C Freisetzung, verminderte BCl-2 Level, verstärkter Gehalt an Bax und einer erhöhten Aktivität der Caspase-3 messen ließ (Han *et al.*, 2009). Zusammenfassend kann die Beeinträchtigung der Mitochondrien durch Fluoxetin eine Dyshomöostase des Ca^{2+}-Gehaltes, bioenergetische Defizite aufgrund der Hemmung der ATP-Synthese, Beeinträchtigung von redoxaktiven Prozessen aufgrund einer ROS Überproduktion und schließlich Zelltod zur Folge haben (Oliveira *et al.*, 2016). Eine metabolische Umsetzung von NFluo zu Fluo innerhalb von 24 h wäre denkbar und würde die zytotoxischen Effekte von NFluo erklären (vgl. Abschnitt 4.2.10, Abb. 44).

5.3 Untersuchung der Genotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in PRH mittels Comet Assay

5.3.1 Effekte von NDMA und NDELA

In PRH kam es nach Behandlung mit der höchsten Testkonzentration NDMA zu einem Anstieg der medianbasierten Schweifintensität um 3.7 im Vergleich zur Negativkontrolle (Kap. 4.3.1, Abb. 46 A, Tab. 20). In Studien von Seo *et al.* ließ sich mittels CometChip Assay in HepaRG Zellen eine im Vergleich zur Negativkontrolle 5-fach erhöhte Schweifintensität nach 24 h Behandlung mit 10 mM NDMA messen (Seo *et al.*, 2019).

Konzentrationen ab 4 mM führten zu signifikanten Effekten (Seo *et al.*, 2019). Damit waren die strangbruchinduzierenden Effekte in HepaRG Zellen deutlicher ausgeprägt als in PRH (vgl. Abschnitt 4.3.1, Abb. 46 A, Tab. 20). Eine Ursache hierfür könnte in speziesspezifischen Unterschieden in Vorkommen und Aktivität der an der metabolischen Aktivierung beteiligten CYP Enzyme liegen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In HepG2 Zellen führte 10 mM NDMA im CometChip Assay nach 24 h zu einem Schweifintensitätsunterschied von 1.2, was geringe CYP2E1 Proteinaktivität vermuten lässt (Seo *et al.*, 2019). In einer weiteren Studie von Seo und Coautoren konnten strangbruchinduzierende Effekte in 3D HepaRG Spheroiden festgestellt werden (Seo *et al.*, 2023). Hierbei führte 625 µM NDMA nach 24 h zu einem maximalen Anstieg der Schweifintensität um 6.1 im Vergleich zur Negativkontrolle (Seo *et al.*, 2023). Vergleichsweise hohe Sensitivitäten gegnüber dem strangbruchinduzierenden Potential von NDMA weisen PHHs und primäre Makaken Hepatozyten (PMHs) auf (Seo *et al.*, 2025). In PHHs war der mittels CometChip Assay ermittelte Schweifintensitätsunterschied nach 24 h Inkubation mit NDMA fast viermal so hoch und in PMHs knapp dreimal so hoch wie der im Rahmen dieser Arbeit in PRHs ermittelte (Seo *et al.*, 2025). In mit Hamster S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen führte NDMA in ähnlich starker Ausprägung wie in PRH zu DNA-Strangbrüchen, was sich anhand eines medianbasierten Schweifintensitätsunterschied von 3.6 im Vergleich zur Negativkontrolle äußerte (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In PHH hingegen führten 10 mM NDMA zu einem deutlicheren Anstieg der Schweifintensität, welcher sich in einer 12-fachen Steigerung im Vergleich zur Negativkontrolle äußerte (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In mit Ratten S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen wurde nach 2 h Inkubation mit NDMA eine 4.7-facher Anstieg der Schweifintensität gemessen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die geringen Schweifintensitäten in HepG2 Zellen verweisen auf die Bedeutung von CYP2E1 für die metabolische Aktivierung und strangbruchinduzierende Wirkung von NDMA, welche auch in Studien von Carlsson *et al*. mit genetisch veränderten HepG2 Zellen demonstriert werden konnte (Carlsson *et al*., 2025). In diesem Zusammenhang ließ sich anhand von DNA-Produktprofilen feststellen, dass die durch NDMA induzierten Strangbrüche auf Induktion von N7-MeG und N3-MeA zurückzuführen sind (Carlsson *et al*, 2025). Mechanistisch führen spontane Depurinierung von N7-MeG sowie die Exzision von N7-MeG und N3-MeA im Verlauf der BER durch das Enzym AAG zu Strangbrüchen, die im

Comet Assay nach 2 h detektierbar sind (Carlsson *et al.*, 2025, Fahrer *et al.*, 2023). Unterschiede im Hinblick auf strangbruchinduzierende Effekte zwischen PHHs, HepG2 Zellen und HepaRG Zellmodellen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Konzentration, Proteinaktivität-, sowie affinität von CYP2E1 zurückzuführen. NDELA führte in PRH zu einem maximalen Schweifintensitätsunterschied von 2.2 im Vergleich zur Negativkontrolle, was verdeutlicht, dass diese Substanz im gewählten Zellmodell weniger strangbruchinduzierend als NDMA wirkt (s. Abb. 46 B, Tab. 20). Die Effekte waren signifikant (Abb. 46). In PHH konnte ein maximaler, medianbasierter Schweifintensitätsunterschied von 5 im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In mit Ratten S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen lag der maximale, medianbasierte Schweifintensitätsunterschied bei 2.2 im Vergleich zur Negativkontrolle (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Dies entspricht dem in PRH gemessenen Schweifintensitätsunterschied (vgl. Abb. 46). In mit Hamster S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen ließ sich ein maximaler, medianbasierter Schweifintensitätsunterschied von 4.7 feststellen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). NDELA induziert die Bildung von (OHEdG) nach α- Hydroxylierung und gdG nach β-Hydroxylierung (Dennehy *et al.*, 2005). Bei letzterem handelt es sich um eine α-Dicarbonylverbindung, die wie OHEdG erwiesenermaßen DNA-Monoaddukte induzieren kann (Dennehy *et al.*, 2005). Zudem kann gdG zur Quervernetzung der DNA führen (Chen *et al.*, 2009). Dieses gemischte Muster an induzierten Schäden könnte erklären, weshalb das Ausmaß der durch NDELA induzierten Strangbrüche im Vergleich zu NDMA geringer ausgeprägt ist (Carlsson *et al.*, 2025). Eine Ursache für die Unterschiede zwischen PRH, PHH und HepG2 Zellen im Hinblick auf strangbruchinduzierende Effekte von NDELA sind möglicherweise Variabilitäten in Aktivität, Affinität und Konzentration von CYP2E1. Der medianbasierte Schweifintensitätsunterschied von 2.2 in PRH und in mit Ratten S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen deutet auf speziesspezifische Proteinaktivität-, und affinität von CYP2E1 hin.

5.3.2 Effekte von NMtBu und NMIPA

NMtBu führte in PRH nach Behandlung mit der höchsten Testkonzentration zu einem Anstieg der Schweifintensität von 1.9 im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 47 A). Die 2-fache Steigerung des medianbasierten Schweifintensitätsunterschiedes im Vergleich zur Negativkontrolle, welche vorraussetzendes Kriterium für die Einordnung als

biologisch relevanter Effekt ist, wurde nur knapp verfehlt (vgl. Abb. 47 A, Tab.20). In PHH trat nach Behandlung mit NMtBu keine Strangbruchinduktion auf (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). In HepG2 Zellen + Hamster S9 Mix führten 10 mM NMtBu zu einem 2.3-fachen Anstieg der Schweifintensitätsunterschiedes im Vergleich zur Negativkontrolle (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). NMtBu führte in mit Ratten S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen zu einem maximalen Anstieg der medianbasierten Schweifintensität von 2.1 (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). NMtBu ist bekanntermaßen nicht karzinogen in Tierstudien (Druckrey *et al*.,1967; Gold *et al*., 1981). Dies wird mit strukturellen Eigenschaften von NMtBu begründet. So vermag das tert-butyldiazoniumion einerseits aufgrund der sterischen Hinderung mit geringerer Wahrscheinlichkeit einen Alkylierungsschaden zu induzieren (Gold *et al*., 1981). Andererseits ist die Entstehung von Alkylierungsschäden aufgrund der raschen Verstoffwechslung zum tert-Butanol weniger wahrscheinlich (Gold *et al*., 1981). Nach Salam *et al*. kann es jedoch auch zur Alkylierung durch das tert-butyldiazoniumion und damit zur Enstehung von genotoxischen Schäden kommen (Salam *et al*., 2021). Eine wesentliche Vorraussetzung für die Induktion von mutagenen und kanzerogenen Effekten besteht in der Erzeugung von Punktmutationen nach erfolgter Alkylierung von DNA- Basen (Salam *et al*., 2021). Dies ist für NmtBu ausgeschlossen , da tert-butyl-Basenpaare nicht fehlpaaren können (Salam *et al*., 2021). Unter für die metabolische Aktivierung geeigneten Vorraussetzungen kann es zur tert-Butylierung der DNA kommen (Salam *et al*., 2021). Dies könnte die in PRH sowie die in mit S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen detektierte Steigerung der medianbasierten Schweifintensitäten erklären (vgl. Abb. 47 A, Djuari & Londenberg *et al*., 2023). Da diese jedoch nicht in Mutationen konvertiert werden, führen Comet Assay Ergebnisse zur falsch positiven Vorhersage in Bezug auf mutagene und kanzerogene Effekte (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). Die Differenzen im Hinblick auf strangbruchinduzierende Effekte zwischen PRH, PHH und HepG2 Zellen könnten in Unterschieden im Hinblick auf zelluläre Substrataufnahme, Aktivität und Affinität der an der metabolischen Aktivierung beteiligten CYP Enzyme sowie an der Reaktivität zur biologischen Zielstruktur liegen. NMIPA hatte deutlich strangbruchinduzierende Effekte in PRH, was sich anhand einer 3.1-fach Steigerung der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle äußerte (Abb. 47 B). NMIPA führte in PHH zu einem 3.5-fachen Anstieg des maximalen Schweifintensitätsunterschiedes im Vergleich zur Negativkontrolle (Djuari & Londenberg

et al., 2023). Auch NMIPA induzierte in mit Hamster S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen Strangbrüche, die mit einem maximalen Schweifintensitätsunterschied von 3.2 noch intensiver ausgeprägt waren (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). NMIPA war in mit Ratten S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen im Vergleich zu allen übrigen Zellmodellen negativ, was sich anhand eines Schweifintensitätsunterschiedes von 1.2 äußerte (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Dies korrelliert mit Studien von Thomas *et al.*, in welchen NMIPA in einer modifizierten Ames Test Variante nach OECD konformen Standards, die sich durch erhöhte Sensitivität auszeichnet, ebenfalls negativ war (Thomas *et al.,* 2024). Hierbei induzierte NMIPA innerhalb des Preinkubationstest in den Salmonella Thyphimurium Stämmen TA100 ab Konzentrationen ≥ 1500 µg/Platte und in TA1535 ab Konzentrationen ≥ 500 µg/Platte ausschließlich Revertanten unter Verwendung von Hamster S9 Mix, während mit Ratten S9 Mix keine vergleichbaren Effekte messbar waren. Auch in Studien von Rao *et al.* wurde NMIPA im Preinkubationstest sowie im Platteninkorporationstest unter Verwendung von induziertem Ratten S9 Mix negativ getestet (Rao *et al.*, 1979). Für NMIPA deuten diese Daten Unterschiede in Vorkommen sowie in der Aktivität der im S9 Mix enthaltenen Enzyme zwischen der Spezies Hamster und der Spezies Ratte an, welche die Detektion mutagener Effekte mittels Ames Test sowie strangbruchinduzierender Effekte mittels Comet Assay maßgeblich beeinflussen (vgl. Abschnitt 4.3.2, Thomas *et al.*, 2024; Rao *et al.*, 1979). Die Unterschiede zwischen PRH und PHH im Hinblick auf strangbruchinduzierende Effekte können auf Varianzen in der Substrataufnahme, der Aktivität und Affinität der an der metabolischen Aktivierung beteiligten CYP Enzyme und auf die Reaktivität zum biologischen Targetmolekül zurückzuführen sein.

5.3.3 Effekte von NNN und S-NNN

In PRH hatte racemisches NNN kein strangbruchinduzierendes Potential (s. Abschnitt 4.3.3, Abb. 48 A). S-NNN führte zu einem maximalen medianbasierten Anstieg der Schweifintensität um 1.2 nach Behandlung mit 5 mM (Abb. 48 A). Das Racemat und das S-Isomer waren damit im gewählten Zellmodell negativ, da die Vorraussetzung zur Klassifizierung auf Basis des biologisch relevanten Effektes nicht erreicht wurde. In PHH entfalteten weder für NNN noch S-NNN strangbruchinduzierende Effekte (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In mit Hamster S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen war das S-Enantiomer positiv, was sich anhand eines 3.1-fachen Anstiegs nach Behandlung mit

2 mM im Vergleich zur Negativkontrolle feststellen ließ (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In HepG2 Zellen + Ratten S9 Mix kam es nach Behandlung mit 2 mM NNN zu einem Schweifintensitätsunterschied von 1.6 im Vergleich zur Negativkontrolle (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). S-NNN führte zu einem etwas geringer ausgeprägten Effekt, der sich in einem maximalen Schweifintensitätsunterschied von 1.13 äußerte (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Zusammenfassend konnte das genotoxische Potential des bekannten Nagerkarzinogens nur von mit Hamster S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen nach Behandlung mit S-NNN erfasst werden (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Patten *et al.* konnte in humanen Lebermikrosomen zeigen, dass die metabolische Aktivierung von NNN hauptsächlich durch CYP2A6 und CYP3A4 katalysiert wird (Patten *et al.*, 1997, Fahrer *et al.*, 2023). Hierbei konnte CYP2A6 ausschließlich die 5‘-Hydroxylierung katalysieren, während an der 2‘-Hydroxylierung sowohl CYP3A4 als auch CYP2A6 beteiligt sein können (Patten *et al.*, 1997). Die Organspezifität von NNN könnte das Ausbleiben des strangbruchinduzierenden Potentials in PRH erklären (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2022). So ist für dieses Nitrosamin bekannt, dass metabolische Aktivierung und karzinogene Effekte hautptsächlich im Ösophagus sowie in Mund-, und Nasenhöhle auftreten, was die Leber als primäres Targetorgan in Frage stellt (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2022; Balbo *et al.*, 2013). Mit Unterschieden in der Aktivität und Konzentration von den an der metabolischen Aktivierung beteiligten Hauptenzymen CYP2A6 und CYP3A4 wären auch die in mit Hamster S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen intensiveren,strangbruchinduzierenden Effekte von S-NNN erklärbar. In diesem Zusammenhang waren zwischen Ratten und Hamster S9 Mix deutliche Unterschiede für das Stoffwechselverhältnis von CYP2A6 messbar (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Dieses lag bei 94 % in Hamster S9 Mix, während das in Ratten S9 Mix detektierte Stoffwechselverhältnis bei 53.5 % lag (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Für das Stoffwechselverhältnis von CYP3A4 ließen sich mit 6 % in Hamster S9 Mix sowie mit 24.2 % in Ratten S9 Mix hingegen geringere Unterschiede zwischen beiden S9 Mix Arten feststellen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In PHH lag das Stoffwechselverhältnis von CYP2A6 bei 12.6 % und damit deutlich niedriger als in Ratten und Hamster S9 Mix. Das Stoffwechselverhältnis von CYP3A4 lag bei 0.9 % in PHH. (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Da in PRH kein Metabolit identifiziert werden konnte, lassen sich in diesem Zusammenhang keine Rückschlüsse auf die Proteinaktivität von CYP2A6

ziehen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Für CYP3A4 lag das Stoffwechselverhältnis in PRH bei 0.7 %, was eine Proteinaktivität von ähnlichem Ausmaß wie in PHH demonstriert (vgl. Abb. 34, Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Neben der Proteinaktivität von CYP2A6 in HepG2 + Hamster S9 Mix könnten Unterschiede hinsichtlich zellulärer Substrataufnahme und Reaktivität an die biologische Targetstruktur die höhere Sensitivität hinsichtlich der Detektion strangbruchinduzierender Effekte von S-NNN in diesem Zellmodell erklären. Nach 2'-Hydroxylierung entstehen Pyridyloxobutyl DNA-Addukte wie O^6-pobG, welche Substrat der MGMT sind (Fahrer *et al.*, 2023). Nicht reparierte O^6-pobG Addukte können im Rahmen der MMR zu replikationsassoziierten Mutationen (Fahrer *et al.*, 2023; Thomson *et al.*, 2003). Sperrige Addukte wie O^6-pobG können zudem Substrat der NER sein. Die im Zuge der NER gebildeten DNA-Einzelstrangbruchintermediate sind instabil, was erklären könnte, weshalb DNA-Strangbrüche von NNN in PRH nicht erfasst werden konnten (Ngo *et al.*, 2020). Zur Detektion von temporären Strangbruchintermediaten ist eine Anpassung der Comet Assay Methode unter Verwendung von NER Inhibitoren empfehlenswert (Ngo *et al.*, 2020).

5.3.4 Effekte von NPro und NMA

Nach Behandlung mit NPro ließ sich keine ausgeprägte strangbruchinduzierende Wirkung in PRH feststellen (vgl. Abschnitt 4.3.4, Abb. 49 A). Der maximale Schweifintensitätsunterschied lag bei 1.5 im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 49). NPro hatte in PHH einen maximal messbaren Anstieg des Schweifintensitätsunterschiedes von 1.8 im Vergleich zur Negativkontrolle zur Folge (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In HepG2 Zellen + Hamster S9 Mix führte NPro zu einem Schweifintensitätsunterschied von 1.5 im Vergleich zur Negativkontrolle (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In mit Ratten S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen führten 5 mM NPro zu einer maximalen Zunahme der Schweifintensität um 1.7 im Vergleich zur Negativkontrolle (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Da das Kriterium eines biologisch relevanten Effektes, der einem Schweifintensitätsunterschied von 2 und höher im Vergleich zur Negativkontrolle entspricht, in keinem Zellmodell erreicht wurde, konnte die nicht mutagene und nicht karzinogene Substanz in PRH, PHH und in mit S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen als solche erkannt werden (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die höchste Testkonzentration NMA hatte in PRH einen strangbruchinduzierenden Effekt, welcher zu einer 1.9-fachen

Steigerung des Schweifintensitätsunterschiedes im Vergleich zur Negativkontrolle führte, womit das Kriterium als biologisch relevanter Effekt knapp verfehlt wurde (vgl. Abb. 49 B, Tab. 20, Djuari & Londenberg *et al*., 2023). Der strangbruchinduzierende Effekt von NMA hatte in PHH einen Anstieg der Schweifintensität von 1.7 im Vergleich zur Negativkontrolle zur Folge (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). NMA induzierte in mit Hamster S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen deutliche, strangbruchinduzierende Effekte, was anhand einer maximalen Zunahme der Schweifintensität von 2.5 im Vergleich zur Negativkontrolle erkennbar war (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). 5 mM NMA hatten in mit Ratten S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen eine Zunahme der Schweifintensität von 1.1 im Vergleich zur Negativkontrolle zur Folge (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). Zusammenfassend ließ sich nur in mit Hamster S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen strangbruchinduzierende Effekte der in Nagern bekanntermaßen karzinogen wirkenden Substanz NMA erfassen (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). NMA wird über CYP2E1 nach α-Hydroxylierung metabolisch aktiviert (Kroeger-Koepke *et al*., 1981; Quan *et al.*, 1992; Carlsson *et al*., 2025). Zudem konnte in isolierten Mikrosomen der Ratte gezeigt werden, dass über CYP2B1/CYP2B2 die Denitrosierung erfolgt (Appel *et al*. 1985; Stiborová *et al*., 1996). NMA wurde in den verschiedenen Leberzellmodellen mehrheitlich negativ getestet, was an der Organspezifität dieser Substanz liegen könnte (Druckrey *et al*., 1967). So existieren Studien, die die karzinogene Wirkung im oberen Verdauungstrakt demonstrieren (Druckrey *et al*., 1967; Napalkov *et al*. 1969; Goodall *et al*.,1970). Höhere Konzentrationen, Affinität sowie Aktivität des an der metabolischen Aktivierung von NMA beteiligten CYP2E1 in diesem Organ bei gleichzeitig niedrigerer Aktivität, Affinität und Konzentration von CYP2B1/CYP2B2 im Vergleich zu Lebergewebe wäre denkbare Ursache für die Negativtestung in PRH, PHH und HepG2 + Ratten S9 Mix Zellen erhobenen Ergebnissen. In mit Hamster S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen findet möglicherweise die Hydroxylierungsreaktion zugunsten der Demethylierungsreaktion statt, was Begründung für die Positivtestung in diesem Zellmodell sein könnte. Variabilität im Hinblick auf Menge und Geschwindigkeit der zellulären Substrataufnahme sowie in der Reaktivität zum biologischen Targetmolekül können zudem die unterschiedlichen strangbruchinduzierenden Effekte zwischen den Zellmodellen begründen. Für NMA konnte die Entstehung von BDI infolge der metabolischen Aktivierung nachgewiesen werden, das instabile N^6-Adenin und 8-

(Phenylazo)guaninaddukte bildet (Koepke *et al.*, 1990; Stiborová *et al.*, 1995; Stiborová *et al.*, 1999). Die metabolische Konvertierung von Benzen zu Muconaldehyd konnte in Lebermikrosomen der Maus nachgewiesen werden (Latriano *et al.*, 1986). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen BDI und Benzen wäre die Konvertierung von BDI in Muconandelhyd, das ein α, β-ungesättigtes Dien Dialdehyd darstellt, denkbar (Carlsson *et al.*, 2025). DNA-quervernetzende Eigenschaften dieser Substanz könnte die schwach ausgeprägten Schweifintensitäten in PRH, PHH und HepG2 + Ratten S9 Mix erklären. Zur Bestätigung dieser Hypothese sind weitere Studien erforderlich (Carlsson *et al.*, 2025).

5.3.5 Effekte von NFA und NND

In PRH führten die höchsten Testkonzentrationen NFA zu einem leichten Anstieg des Schweifintensitätsunterschiedes um 1.2 im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abschnitt 4.3.5, Abb. 50). Die in PRH ermittelten Daten für NFA korrelieren mit Studien von Seo *et al.*, in welchen die genotoxischen Effekte dieses *N*-Nitrosamins mittels CometChip Assay in HepaRG Zellen untersucht wurden (Seo *et al.*, 2025). Im CometChip Assay war der Schweifintensitätsunterschied nach 24 h Behandlung mit 4 mM NFA < 1.5 im Vergleich zur Negativkontrolle (Seo *et al.*, 2025). In PHH führte NFA analog wie PRH zu einer Zunahme des maximalen Schweifintensitätsunterschiedes um 1.2 im Vergleich zur Negativkontrolle (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In mit Hamster S9-Mix supplementierten HepG2 Zellen führte NFA zum maximal messbaren Anstieg der Schweifintensität um 1.8 im Vergleich zur Negativkontrolle (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). NFA induzierte keinen Anstieg der medianbasierten Schweifintensität in mit Ratten S9 Mix behandelten HepG2 Zellen (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die in HepG2-Zellen + Hamster S9 Mix intensiv ausgeprägten strangbruchinduzierenden Effekte im Vergleich zu den schwachen Effekten, die in den übrigen Zellmodellen durch NFA hervorgerufen wurden, können auf Unterschiede in Menge und Geschwindigkeit der zellulären Substrataufnahme, in Variabilitäten hinsichtlich Proteinkonzentration sowie Proteinaktivität-, und affinität und in der Reaktivität zum biologischen Targetmolekül begründet liegen. Die höchste Testkonzentration NND führte in PRH nach 2 h zu einem Anstieg um 2.1 im Vergleich zur Negativkontrolle (vgl. Abb. 50). Für NND gibt es bisher keine Daten hinsichtlich genotoxischer Effekte. Mutagene und karzinogene Effekte des H1-Antihistaminikum Desloratadin hingegen wurde in *in vitro* und *in vivo* Studien untersucht (Brambilla *et al.*, 2011). In Genmutationstest unter Verwendung von

Salmonella Thyphimurium und unter Verwendung von E.coli induzierte die Substanz keine mutagenen Effekte (Brambilla *et al*., 2011; Physicians Desk Reference, 2005). Chromosomale Schäden ließen sich weder in humanen Lymphozyten, noch im *in vivo* Mikrokern Test der Spezies Maus nachweisen (Brambilla *et al*., 2011; Physicians Desk Reference, 2005). Auch in Langzeitkarzinogenitätstests führte Desloratadin zu keinen kanzerogenen Effekten in Mäusen (Brambilla *et al*., 2011; Physicians Desk Reference, 2005). Behandlung mit 0.075 mM NND hatte in PHH eine leichte Zunahme der Schweifintensität von 1.1 im Vergleich zur Negativkontrolle zur Folge (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). 0.2 mM NND führten in mit Hamster S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen zu einem messbaren Anstieg der medianbasierten Schweifintensität um 2.9 im Vergleich zur Negativkontrolle (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In mit Ratten S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen traten nach Behandlung mit NND keine strangbruchinduzierenden Effekte auf (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Zusammenfassend war NND in PRH und HepG2 + Hamster S9 Mix positiv, wobei der Effekt in HepG2 Zellen deutlicher ausgeprägt war als in PRH (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Insbesondere für PRH müssen bei der Interpretation der Daten die zytotoxischen Effekte von NND berücksichtigt werden, da diese im Konzentrationsbereich, der zum Auftreten der maximalen Schweifintensität geführt hat, sehr ausgeprägt waren (vgl. Abb. 43 A, Tab. 19). Hierbei führte NND nach 2 h zu einer Reduktion der Zellviabilität um mehr als 50 % (vgl. Abb. 43 A). Daher kann der Anstieg der medianbasierten Schweifintensität nicht eindeutig auf einen durch DNA-Alkylierung hervorgerufenen Effekt zurückgeführt werden (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). In HepG2 + Hamster S9 Mix waren hingegen keine zytotoxischen Effekte messbar was auf genotoxische Effekte infolge von DNA-Alkylierung hindeutet (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). Die im Vergleich zu den übrigen Zellmodellen höhere Sensitivität von HepG2 Zellen + Hamster S9 Mix hinsichtlich der Detektion strangbruchinduzierender Effekte könnte in höheren Konzentrationen sowie Proteinaktivitäten-, und affinitäten der an der metabolischen Aktivierung beteiligten CYP Enzyme im Vergleich zu PHH, PRH und HepG2 Zellen + Ratten S9 Mix liegen. Darüberhinaus könnte die Menge und Geschwindigkeit der zellulären Substrataufnahme sowie die Reaktivität zum biologischen Targetmolekül in mit Hamster S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen höher sein.

5.3.6 Effekte von NFluo und Fluo

NFluo führte in PRH zu einem maximal messbaren Schweifintensitätsunterschied von 6.3 im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abschnitt 4.3.6, Abb. 51). Die niedrigste Konzentration, die zu signifikanten Effekten führte, lag bei 50 µM (Abb. 51). Da 2 h Behandlung mit NFluo zu einer maximalen Reduktion der Zellviabilität um 20 % im Vergleich zur Negativkontrolle führt, können die strangbruchinduzierenden Effekte auf DNA-Alkylierung zurückgeführt werden (vgl. Abschnitt 4.2.10, Abb. 44 B). Auch in 2D und 3D HepaRG Zellen wurden genotoxische Eigenschaften von NFluo mittels CometChip Assay nach 24 h Inkubation untersucht. Hier führte die maximale Testkonzentration von 80 µM im 2D Zellmodell sowie von 50 µM im 3D Zellmodell zu einer jeweils mehr als 10-fach erhöhten Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle (Seo *et al.*, 2025). Die geringste Konzentration, die einen statistisch signifikanten Effekt induzierte, lag in 2D HepaRG Zellen bei 10 µM und in 3D HepaRG Zellen bei 2.5 µM (Seo *et al.*, 2025). Mit einem maximalen Schweifintensitätsunterschied von 13.3 % - 16.2 % im Vergleich zur Negativkontrolle, die im 2D Zellmodell messbar war, sowie einem im Vergleich zur Negativkontrolle ermittelten Schweifintensitätsunterschied von 16.8 % - 18 % im 3D Zellmodell waren die in HepaRG Zellen ermittelten strangruchinduzierenden Effekte von NFluo deutlicher als in PRH (Seo *et al.*, 2025). Mögliche Ursache hierfür sind speziesspezifischen Unterschiede in Vorkommen und Aktivität der an der metabolischen Transformation beteiligten CYP Enzymen liegen (Djuari & Londenberg *et al*, 2023). Eine Beteiligung von CYP2B6, CYP2C19 und CYP3A4 an der metabolischen Aktivierung von NFluo konnte in TK6 Zellen demonstriert werden (Li *et al.*, 2024). In einer weiteren Studie konnte dies mithilfe von rekombinanten CYP Enzymen bestätigt werden (Vogel *et al.*, 2025). Die Proteinaktivität-, und affinität sowie Konzentration dieser CYP Enzyme in PRH ließ sich demonstrieren (vgl. Abschnitt 4.1., Abb. 34). Die Aktivität von CYP2B6 und CYP3A4 in HepaRG Zellmodellen ließ sich ebenfalls bestätigen (Seo *et al.*, 2019). Höhere Proteinaktivität dieser CYP Enzyme in HepaRG Zellen könnten die im Vergleich zu PRH um bis zu dreifach höhere Schweifintensitätsunterschiede erklären (vgl. Abb. 51 A). Zudem sind Unterschiede in der zellulären Substrataufnahme sowie in der Reaktivität mit dem biologischen Targetmolekül denkbar. In PHH waren die Effekte von NFluo ähnlich stark ausgeprägt wie in PRH (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Hierbei lag der maximale Unterschied der Schweifintensität bei 6.7 nach Behandlung mit 0.5 mM (Djuari &

Londenberg *et al.*, 2023). In mit Hamster S9 Mix behandelten HepG2 Zellen führte NFluo nach Behandlung mit der höchsten Testkonzentration zu einem Anstieg der medianbasierten Schweifintensität um 4.5 im Vergleich zur Negativkontrolle (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In HepG2 Zellen, die mit Ratten S9 Mix supplementiert wurden, war der Effekt ähnlich stark ausgeprägt (Djuari & Londenberg *et al*, 2023). In diesem Zellmodell führten 0.5 mM NFluo zu einem maximal messbaren Anstieg um 3.9 im Vergleich zur Negativkontrolle (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die im Vergleich zu HepG2 Zellen intensiveren strangbruchinduzierenden Effekte von NFluo in PRH und PHH könnten auf Unterschiede in Konzentration sowie Proteinaktivität-, und affinität der an der metabolischen Aktivierung beteiligten CYP Enzyme zurückgeführt werden. Auch sind variable zelluläre Aufmahmegeschwindigkeiten-, und konzentrationen des Substrates zwischen den Zellmodellen denkbare Ursache für die feststellbaren Unterschiede. Die nicht nitrosierte Form Fluo wurde zusätzlich in PRH analysiert und führte ebenfalls zu einem leichten Anstieg der Schweifintensität (vgl. Abb. 51). Aufgrund der ausgeprägten Zytotoxizität war der gewählte Konzentrationsbereich auf 0 - 50 µM eingeschränkt (vgl. Abschnitt 4.2.11, Abb. 45). 5 µM führten zu einer maximalen Zunahme der Schweifintensität um knapp 2.0 (Abb. 51). Das Kriterium für die Klassifizierung als biologisch relevanter Effekt wurde damit verfehlt. In der Literatur existieren keine Daten zu Fluo, mit welchen die in PRH erhobenen Resultate verglichen werden können.

5.3.7 BMD Modelling der mittels Comet Assay erhobenen Daten

Die für NDMA in PRH erhobenen Daten zeigen mit dem BMD_{median} von 2.61 mM, einer BMDu von 8.1 mM sowie einer BMDl von 0.0072 mM deutlich höhere BMD CI Werte für die CES_{50} als die in Studien von Seo *et al.* in 3D HepaRG Spheroiden nach 24 h Inkubation ermittelten Werte (vgl. Tab. 21, Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Seo *et al.*, 2025). So wurde für NDMA nach mathematischer Modellierung der mittels CometChip Assay gemessenen DNA-Strangbruchschäden eine BMC_{50} von 1.9 µM mit einer $BMCL_{50}$ von 1 µM und einer $BMCU_{50}$ von 3.6 µM ermittelt, wobei die BMC_{50} die Konzentration angibt, welche zu einer 50 %-igen Steigerung der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle führte und damit vergleichbar mit der im Rahmen des EMA Projektes erhobenen CES_{50} ist (Seo *et al.*, 2025; Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Das mittels meanbasierter CES_{100} ermittelte CI aus den in PHH ermittelten Daten hatte im Gegensatz zu PRH die Unterscheidung aller Substanzen anhand ihres genotoxischen Potentials ermöglicht (Djuari & Londenberg *et*

al., 2025). Die Reihenfolge war wie folgt: NFluo > NDMA > NMIPA > NDELA. Der medianbasierte BMD_{median} für die CES_{50} lag hierbei bei 0.0169 mM mit einer BMDl von 0.00297 mM und einer BMDu von 0.071 mM (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). PHHs repräsentierten damit robustere Konzentrations-Wirkungsverhältnisse als PRHs (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die von Seo *et al.* in PHH mittels CometChip Assay ermittelten Daten zeigen deutlich geringere BMD CI Werte (Seo *et al.*, 2025). In diesem Zusammenhang wurde für NDMA eine BMC_{50} von 0.01 µM mit einer $BMCU_{50}$ von 0.04 µM und einer $BMCL_{50}$ von 0.001 µM in PHH ermittelt (Seo *et al.*, 2025). Das strangbruchinduzierende Potential von NMA wurde auch mittels CometChip Assay untersucht. Auf Basis der in diesem Zusammenhang erhobenen Daten ließ sich eine BMC_{50} von 180 µM mit einer $BMCL_{50}$ von 81 µM und einer $BMCU_{50}$ von 389 µM in PHH sowie eine BMC_{50} von 88.6 µM mit einer $BMCL_{50}$ von 45.6 und einer $BMCU_{50}$ von 183 in 3D HepaRG Spheroiden ermitteln. In 3D HepaRG Spheroiden induzierte NMA damit eine im Vergleich zur Negativkontrolle 2.3-fach erhöhte Schweifintensität, während diese in PHH zwischen 1.5 ≤ 2.0 lag (Seo *et al.*, 2023; Seo *et al.*, 2025). Damit waren 3D HepaRG Spheroide sensitiver in der Detektion des strangbruchinduzierenden Potentials von NMA als PHH, während PHH sensitiver für die Detektion von NDMA waren (Seo *et al.*, 2025). Mit den im EMA Projekt verwendeten Leberzellmodellen konnte das strangbruchinduzierende Potential von NMA mittels alkalischem Comet Assay nicht detektiert werden, was auf eine im Vergleich zur CometChip Methode geringere Testsensitivität zurückgeführt werden kann (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Seo *et al.*, 2023; Seo *et al.*, 2025). Seo und Coautoren untersuchte auch die DNA-Strangbruchformation von zehn verschiedenen NDSRIs, darunter NFluo und NFA in 2D HepaRG Zellen sowie in 3D HepaRG Spheroiden mittels CometChip Assay nach 24 h Inkubation (Seo *et al.* 2025). Hierbei ließen sich aufgrund des strangbruchinduzierenden Potentials BMD Werte für NFluo in beiden Zellmodellen ableiten, während NFA negativ getestet wurde (Seo *et al.* 2025). Für NFluo konnte in 2D HepaRG Zellen ein BMC_{50} von 0.53 µM mit einem $BMCL_{50}$ von 0.33 µM und einem $BMCU_{50}$ von 0.82 µM abgeleitet werden (Seo *et al.* 2025). In 3D HepaRG Spheroiden ließ sich ein BMC_{50} von 0.4 µM mit einem $BMCL_{50}$ von 0.29 µM und einem $BMCU_{50}$ von 0.56 µM ableiten (Seo *et al.,* 2025). Zusammenfassend deuten die von Seo *et al.* in 3D HepaRG Spheroiden, in 2D HepaRG Zellen sowie in PHH erhobenen Daten von NDMA, NMA und NFluo darauf hin, dass die

CometChip Methode zur Detektion des strangbruchinduzierenden Potentials von *N*-Nitrosaminen deutlich sensitiver als der im Rahmen des EMA Projektes durchgeführte alkalische Comet Assay ist (Seo *et al.*, 2019; Seo *et al.*, 2025; Seo *et al*. 2023; Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Seo und Coautoren untersuchte zudem NDMA in differenzierten HepaRG Zellen und in HepG2 Zellen mittels CometChip Assay nach 24 h Inkubation (Seo *et al.*, 2019). Hierbei lag der BMD_{50} in HepaRG Zellen bei 453.7 µM, während in HepG2 Zellen kein strangbruchinduzierendes Potential messbar war (Seo *et al.*, 2019). In den innerhalb des EMA Projektes verwendeten, mit 10 % (v/v) Ratten S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen induzierten NDMA, NFluo und NMtBu Strangbrüche in statistisch signifikantem Ausmaß im Vergleich zur Negativkontrolle (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Sowohl mean-, als auch medianbasierte BMD_{100} CIs ermöglichten die Unterscheidung von NDMA und NFluo hinsichtlich des genotoxischen Potentials mit folgendem Ergebnis: NFluo > NDMA (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). Für NDMA ließ sich ein medianbasierter BMD_{median} von 0.835 mM mit einem BMDl von 0.315 mM und einem BMDu von 1.77 mM ermitteln (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). Für NFluo ließ sich ein medianbasierter BMD_{median} von 0.106 mM mit einem BMDl von 0.0328 mM und einem BMDu von 0.254 mM evaluieren (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). In HepG2 Zellen + 10 % (v/v) Hamster S9 Mix führten NDMA, NDELA, NMIPA, S-NNN, NFluo, NND, NMA und NMtBu zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle, welche hinsichtlich ihrer Ausprägung für mindestens eine der Testkonzentration die Vorraussetzung der biologischen Relevanz erfüllte (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Das BMD Modeling erfolgte für NDMA, NDELA, NMIPA, S-NNN und NFluo (Djuari & Londenberg *et al*., 2023). Meanbasierte Daten ermöglichten eine Unterscheidung zwischen NFluo und S-NNN. In Konsequenz ergab das Ranking folgende Reihenfolge: NFluo> NMIPA/S-NNN> NDMA/NDELA unter Berücksichtigung meanbasierter CES_{100} Daten (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Der meanbasierte BMD_{median} für NDMA lag bei 2.69 mM mit einem BMDl von 1.01 mM und einem BMDu von 8.23 mM (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Für NFluo lag dieser bei 0.01621 mM mit einem BMDl von 0.00202 mM und einem BMDu von 0.0651 mM mM (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die Positivtestung von sechs Verbindungen in mit Hamster S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen sowie drei positiv getestete Substanzen in mit Ratten S9 Mix supplementierten HepG2 Zellen veranschaulicht, dass die Sensitivität der Detektion

genotoxischer Effekte in HepG2 Zellen durch ein exogenes Metabolisierungssystems verbessert werden kann (Seo *et al.*, 2019; Djuari & Londenberg *et al.,* 2023). Innerhalb des EMA Projektes wurden strangbruchinduzierende Effekte schließlich in PCLIS untersucht (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Aufgrund limitierter Verfügbarkeit des frischen Lebergewebes konnte nur NDMA und NPro untersucht werden, wobei NPro negativ getestet wurde (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). NDMA hingegen wurde positiv getestet und erfüllte die Vorraussetzung für das BMD Modelling (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Da die CES_{SD} bereits im Bereich einer 50 %-igen Antwort lag, das CI für die CES_{100} wesentlich schmaler war und die CES_{50} in einem Bereich ohne gemessene Testkonzentrationen geschätzt wurde, wird die CES_{100} für die Analyse des genotoxischen Potentials von NDMA empfohlen. Der medianbasierte BMD_{median} lag bei 0.551 mM mit einem BMDl von 0.166 mM und einem BMDu von 1.6 mM (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In diesem Zusammenhang ist der BMD_{median} mit dem von Seo *et al.* generierten BMD_{50} in mit NDMA behandelten HepaRG Zellen, welcher bei 453.7 µM lag, vergleichbar (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Seo *et al.*, 2019). In der Literatur gibt es einige *in vivo* Kanzerogenitäts-, sowie *in vivo* Genmutationsstudien, auf welchen hauptsächlich BMD Modellierungen von NDMA, jedoch auch von NDELA und NFluo basieren (Johnson *et al.*, 2021; Roper *et al.*, 2025; Ashford *et al.*, 2025; Lynch *et al.*, 2024; Jolly *et al.,* 2024). Der adverse Effekt basiert in diesem Zusammenhang oft auf der Konzentration, die zu einer definierten Tumorinzidenz führt, welche zur mathematischen Modellierung herangezogen wird (Cross *et al.*, 2021). Für NDMA wurden zur BMD Modellierung Daten aus dem Transgenic Rodent Mutation Assay (TGR) von Gollapudi und Coautoren sowie aus einer von Peto *et al.* durchgeführten Kanzerogenitätsstudie in Colworth Ratten herangezogen (Gollapudi *et al.* 1998; Peto *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 2021). Peto und Coautoren untersuchte die Lebertumorinzidenz in über 200 Colworth Ratten, denen 15 unterschiedliche Konzentrationen NDMA über das Trinkwasser zwei Jahre lang verabreicht wurde (Peto *et al.*, 1991). Im Rahmen des TGR Assay wurde die Mutationsfrequenz im lacl Gen in BigBlue Ratten untersucht, welchen NDMA in vier verschiedenen Konzentrationen oral mittels Gavage an 9 von 12 Tagen administriert wurde. (Gollapudi *et al.*, 1998). Der auf der CES_{50} basierende BMD Wert lag bei 0.37 mg/ kg/Tag (Gollapudi *et al.*, 1998). In auf dem CES_{10} basierenden Daten von Peto *et al.* ließ sich ein BMD_{50} von 0.088 mg/kg/Tag ermitteln (Peto *et al.*,1991). Die auf dem Benchmark

Verfahren beruhenden Methoden sind der simplen linearen Extrapolation, welche zur Ableitung des AIs von Nitrosaminen wie NDMA oder NDEA verwendet wird, aufgrund größerer Robustheit gegenüber zu bevorzugen (Cross *et al.*, 2021). Die BMD Werte werden in der Studie von Ponting und Coautoren unter Berücksichtigung von Unsicherheitsfaktoren zur Festlegung von zulässigen täglichen Aufnahmemengen herangezogen, welche für NDMA mit 0.6 µg/Tag basierend auf dem TGR und mit 6.2 µg/Tag basierend auf Kanzerogenitätsdaten deutlich über dem von regulatorischen Behörden abgeleiteten AI von 96 ng/Tag liegen (Cross *et al.*, 2021). Die Autoren argumentieren, dass mit diesem alternativen Verfahren, das von Nitrosaminverunreinigungen in Sartanen ausgehende Gesundheitrisiko realistischer abgebildet wird (Cross *et al.*, 2021). Auch die vergleichende Gegenüberstellung der aus *in vivo* Mutagenitäts-, sowie Kanzerogenitätsstudien erhaltenen BMD Daten mit aus neueren Verfahren wie der Error-corrected Next Generation Sequencing (ecNGS) oder quantenmechanischer *in silico* Methoden generierten BMD Werten erhalten zunehmend Bedeutung (Roper *et al.*, 2025). Für NDELA wurden in diesem Zusammenhang BMD Werte aus TGRs sowie der Computer-Aided Discovery and RE-design Methode (CADRE) abgeleitet und gegenübergestellt, während für NDMA BMD Werte mithilfer der aus dem TGR Assay erhaltenen Daten sowie dem Duplex Sequencing zum Vergleich herangezogen wurden (Roper *et al.*, 2025; Ashford *et al*, 2025). Diese Methoden werden in der Zukunft aufgrund der Präzision der Vorhersagen und aus ethischen Aspekten durch Berücksichtigung des 3R Prinzips zunehmend an Bedeutung gewinnen (Ashford *et al.*, 2025).

5.3.8 Vergleich des Comet Assays mit dem Ames Test hinsichtlich der Prädiktivität der Vorhersage des genotoxischen und mutagenen Potentials strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine

Insgesamt stimmten die Ergebnisse des alkalischen Comet Assays mit den verwendeten Leberzellmodellen und die innerhalb des Ames Test generierten Resultate in der Vorhersage von acht aus zehn *N*-Nitrosaminen hinsichtlich des genotoxischen Potentials überein (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Im Gegensatz zur falsch negativen Testung von NDELA im Ames Test erkannten die besten Zellmodelle innerhalb der Comet Assay Methode, PHH und HepG2 + Hamster S9 Mix, das strangbruchinduzierende Potential von NDELA (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die zweite Substanz, für die Diskrepanzen

hinsichtlich einer Positiv-, bzw Negativtestung resultierten, war NND (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Diese Verbindung war negativ im Ames Test und positiv nach Testung in HepG2 + Hamster S9 Mix im Comet Assay (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Da zur Verifizierung einer möglicherweise falsch positiven Antwort im Comet Assay oder einer falsch negativen Antwort im Ames Test Literaturdaten fehlen, muss nach konservativer Beurteilung und bis zum eindeutigen Nachweis des Gegenteils eine positive Antwort angenommen werden (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Heflich und Coautoren untersuchten *N*-Nitrosamine unterschiedlicher Struktur, darunter NDMA, NMA, NFluo und NFA im Ames Test unter variablen Testbedingungen (Heflich *et al.*, 2024). Dabei wurden die Salmonella Typhimurium Teststämme TA1535, TA 1537, TA98, TA100 sowie der E.coli Stamm WP2uvrA in Kombination mit 10 % (v/v) oder 30 % (v/v) Hamster und Ratten S9 Mix verwendet, wobei eine Vorinkubationszeit von 30 Minuten oder 60 Minuten gewählt wurde (Heflich *et al.*, 2024). In Übereinstimmung mit den innerhalb des EMA Projektes generierten Ames Testdaten wurden NDMA, NMA und NFluo positiv getestet, während NFA negativ getestet wurde (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Heflich *et al.*, 2024). Dies demonstriert, dass die im Rahmen des EMA Projektes verwendetete Ames Testmethode zur Detektion von einer Mehrheit der sechs *N*-Nitrosamine mit bekannten mutagenen und kanzerogenen Eigenschaften geeignet ist (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023).

5.4 Untersuchung der DNA-Reparaturmechanismen in PRH

5.4.1 Messung der Genotoxizität nach Behandlung mit NDMA, NFluo, NBH und NNT vor und nach Erholungszeit mittels Comet Assay

Anhand dieses Reparaturexperimentes sollten mithilfe des Vergleiches des unmittelbar induzierten DNA-Schadens nach 2 h Inkubation mit dem DNA-Schaden nach 2 h Inkubation und einer Erholungszeit von 24 h Hinweise auf einsetzende DNA-Reparaturmechanismen detektiert werden. Für NFluo konnte innerhalb dieser Arbeit nach Behandlung mit 50 µM und 24 h Inkubation eine mehr als 80 % reduzierte Zellviabilität gezeigt werden, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss (s. Abb. 44 B). Es muss auch berücksichtigt werden, dass 50 µM NFluo nach 2 h Inkubation und 0 h Nacherholungszeit geringe Effekte auf die Zellviabilität hat, wobei 75 µM zu einer Abnahme um 20 % im Vergleich zur Negativkontrolle führten (Abb. 44 A).

In Zellviabilitätsmessungen unter angepassten Testbedingungen, wobei die Zellviabilität nach 2 h Inkubation und 24 h Inkubation in substanzfreiem Medium gemessen wurde, was dem experimentellen Setting des DNA-Reparaturexperiments entsprach, ließ sich im Vergleich zu den innerhalb dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen eine Abnahme der Zellviabilität nach Behandlung mit NBH, NFluo und NNT feststellen (Vogel *et al.*, 2025). So trat nach Behandlung mit 500 µM NBH eine Reduktion der Zellviabilität um fast 30 % im Vergleich zur Negativkontrolle auf, während diese nach Inkubation mit 50 µM NNT bei fast 40 % lag (Vogel *et al.*, 2025). Die stärkste Abnahme der Zellviabilität trat nach Behandlung mit 50 µM NFluo auf und lag bei knapp 80 %, was mit den innerhalb dieser Arbeit nach 24 h Inkubation ermittelten zytotoxischen Effekten in PRH korrelliert (s. Abb. 44 B,Vogel *et al.*, 2025). Die Positivkontrolle MMS führte zu keiner Abnahme der Zellviabilität nach 2 h (vgl Abb. 53). Für MMS konnte nach 24 h ein Rückgang des Strangbruchlevels gemessen werden, was auf einsetzende DNA-Reparatur hinweist. Die Bildung von N7-MeG und N3-MeA Addukten ist bekannt für MMS, welche Substrate der BER sind (Fahrer *et al.*, 2023, Carlsson *et al.*, 2025). In deren Verlauf gebildete Einzelstrangbrüche können die nach 2 h detektierten, hohen Schweifintensitäten erklären (vgl. Abb. 54 a, 55 a, Demple *et al.*, 2005). Der Rückgang der Schweifintensitäten nach 2 h + 24 h Erholungszeit im Vergleich zu 2 h Inkubation und 0 h Erholungszeit ist auch anhand der repräsentativen Comet Aufnahmen erkennbar (vgl. Abb. 54 b, 55 b). MMS führte nach 0 h zu einem Schweifintensitätsunterschied von 3.0, während dieser nach 24 h bei 1.6 lag (s. Abb. 54 a, 55 a). Für die übrigen Verbindungen wurde eine leichte Zunahme der medianbasierten Schweifintensitäten nach 2 h Behandlung und 24 h Nacherholungszeit im Vergleich zur 2 h Inkubation und 0 h Nacherholung festgestellt (vgl. Abb. 54 a, Abb. 55 a). Die gemessenen Schweifintensitätsunterschiede im Vergleich zur Negativkontrolle sind nach 2 h Inkubation und 0 h Erholungszeit jedoch deutlicher ausgeprägt als nach 2 h Inkubation und 24 h Erholungszeit (vgl. Abb. 54 a, Abb. 55 a). So ließ sich nach Behandlung mit 500 µM NDMA nach 2 h + 0 h Erholungszeit ein Schweifintensitätsunterschied von 1.3 im Vergleich zu 1.1 nach 2 h + 24 h Erholungszeit messen (vgl. Abschnitt 4.4.1, Abb. 54 und 55). Auch war der Schweifintensitätsunterschied im Vergleich zur Negativkontrolle aller getesten NDSRIs nach 24 h geringer als nach 0 h, wobei dieser nach Behandlung mit 500 µM NBH bei 2.5 nach 0 h und bei 1.7 nach 24 h lag (vgl. Abb. 54, 55). Für die höchste Testkonzentration

von NNT und NFluo lag der Schweifintensitätsunterschied nach 0 h bei 4.5 und nach 24 h bei 2.9 (NFluo) sowie bei 2.3 (NNT) (vgl. Abb. 54, Abb. 55). Für primäre Zellen ist bekannt, dass sie eine begrenzte Lebensdauer haben und daher eingeschränkt kultivierbar sind (Verma *et al.*, 2020). Es kann angenommen werden, dass diese Effekte auch bei den übrigen behandelten Zellen nach 24 h eingetreten sind (s. Abb. 55 a). Die Zunahme der Schweifintensität müsste in den mit Nitrosaminen behandelten Zellen unter der Vorraussetzung, dass keine DNA-Reparatur erfolgt, erwartungsgemäß starker ausgeprägt sein (s. Abb. 54 a, 55 a). Folglich kann angenommen werden, dass die abgeschwächte Zunahme der Schweifintensität in mit *N*-Nitrosaminen behandelten Zellen auf zelluläre Reparaturmechanismen zurückzuführen ist (vgl Abschnitt 4.4.1, Abb. 55). Diese konnten für die direkt wirkende Substanz MMS rascher in Gang gebracht werden, weshalb ein Rückgang der Schweifintensität nach 24 h Nacherholung versus 0 h Nacherholung messbar war (vgl. Abb 55). Für NDMA und die NDSRIs ist die Abnahme des Schweifintensitätsunterschiedes mit einsetzender BER sowie mit der MGMT vermittelten DNA-Reparatur erklärbar (s. Abb 54, 55; Vogel *et al*, 2025; Carlsson *et al*, 2025). Für die NDSRIs wird diese Annahme zusätzlich durch die im Vergleich zur 2 h Inkubation und 0 h Nacherholungszeit geringere Anzahl an O^6-MeG-, und N7-MeG-Addukten nach 2 h Inkubation und 24 h Nacherholungszeit bestätigt (Vogel *et al.*, 2025). Die Zahl an N7-MeG-Addukten für NDMA, TMZ und alle NDSRIs war zu beiden Zeitpunkten 10-fach höher als die Zahl an O^6-MeG-Addukten (Vogel *et al.*, 2025). Innerhalb dieser Arbeit war die Anzahl der durch NDMA induzierten N7-MeG-Addukte in PRH 8.1-fach sowie für TMZ 8-fach höher als die Anzahl der O^6-MeG Addukte (vgl Abb. 56 A, B, Abb. 57 A, B). Sowohl die in PRH erhobenen Ergebnisse als auch die Ergebnisse aus Studien von Vogel *et al.* korrellieren damit mit in der Literatur publizierten Daten (vgl. Abb. 56 A, B, Abb. 57 A, B, Vogel *et al.*, 2025; Pegg *et al.*, 1978; Yoshimoto *et al.*, 2012). Nach 2 h Inkubation und 0 h Nacherholung führte NDMA zu geringeren DNA-Adduktleveln als die NDSRIs NNT und NFluo (vgl. Vogel *et al.*, 2025). Dies steht in Einklang mit den innerhalb dieser Arbeit gemessenen Schweifintensitäten, wobei nach 0 h Nacherholungszeit NNT das stärkste strangbruchinduzierende Potential aufwies, gefolgt von NFluo, NBH und NDMA (vgl. Abb. 54 a). Für NNT und NDMA ist diese Reihenfolge mit dem N7-MeG-Level erklärbar, während das Strangbruchlevel von NBH geringer ist als das von NFluo trotz höherer N7-MeG-Adduktlevel von NBH im Vergleich zu NFluo zu diesem Zeitpunkt (vgl. Abb. 54 a,

Vogel *et al.*, 2025). Hierbei ist die Zytotoxizität von NFluo zu berücksichtigen (Vogel *et al.*, 2025). Eine weitere Erklärung könnte in höheren Leveln eines weiteren Methyladdukts wie N3-MeA liegen, welches infolge metabolischer Aktivierung von NFluo gebildet wurde und welches als Substrat der BER strangbruchinduzierende Eigenschaften aufweist (M. Carlsson *et al.*, 2025; Engelward *et al.*, 1997; Gates *et al.*, 2004; Demple *et al.*, 2005). Nach 2 h Behandlung und 24 h Nacherholung konnte für NFluo das höchste strangbruchinduzierende Potential festgestellt werden, gefolgt von NNT, NBH und NDMA (vgl Abb. 55 a). Demgegenüber ließen sich für das N7-MeG-Adduktlevel in PRH eine abweichende Reihenfolge ermitteln, wobei das höchste DNA-Adduktlevel nach Behandlung mit NNT auftrat, gefolgt von NDMA, NBH und NFluo (Vogel *et al.*, 2025). Damit sind die sehr hohen Schweifintensitäten, welche nach Behandlung mit NFluo detektierbar waren, mit den starken zytotoxischen Eigenschaften, welche sich nach 2 h Inkubation und 24 h Nacherholung messen ließen, erklärbar (Vogel *et al.*, 2025). 50 µM führten nach 2 h und 24 h Nacherholung zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität um 80 % im Vergleich zur Negativkontrolle (vgl. Abb. 44 A, Vogel *et al.*, 2025; Li *et al.*, 2024). Diese deuten die Bildung eines sperrigen Adduktes an (Vogel *et al.*; Li *et al.*, 2024). Auch die höhere Schweifintensität von NBH im Vergleich zu NDMA nach 2 h Inkubation und 24 h Nachbehandlung trotz niedriger N7-MeG-Adduktlevel zu diesem Zeitpunkt lässt sich mit zytotoxischen Effekten von NBH begründen, welche nach 2 h Inkubation und 24 h Nacherholungszeit in einer um knapp 30 % reduzierten Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle resultierten und möglicherweise auf Entstehung eines sperrigen Adduktes zurückzuführen sind (vgl. Abb. 55 a, Vogel *et al.*, 2025; Li *et al.*, 2024). Für NDMA waren in Studien von Vogel und Coautoren nach 24 h Nacherholungszeit höhere O^6-MeG-, und N7-MeG-Adduktlevel als nach 0 h Nacherholungszeit zu beobachten (vgl. Vogel *et al.*, 2025). Dies korrelliert mit dem in Studien von Carlsson *et al.* in HepG2-CYP2E1 gemessenen, zeitabhängigen Anstieg der O^6-MeG-Adduktlevels bis 24 h nach NDMA Behandlung sowie mit dem im Rahmen dieser Arbeit in PRH durch NDMA induzierten DNA-Adduktbildungsverlauf von O^6-MeG und N7-MeG (s. Abb. 56 A, B, 57 A, B). Die im Vergleich zu NDMA abweichende Adduktbildungskinetik der NDSRIs könnte auf physikochemische Eigenschaften der NDSRIs zurückzuführen sein (Vogel *et al.*, 2025). Im Vergleich zu NDMA handelt es sich um nicht flüchtige, lipophile und sperrige Verbindungen, was schnellere intrazellulären Aufnahme, metabolische Aktivierung und

Adduktbildung zur Folge haben kann (Vogel *et al.*, 2025). Eine Beteiligung von CYP2C19, CYP2B6, CYP2A6 und CYP3A4 an der metabolischen Aktivierung von NNT und NFluo konnte in TK6 Zellen nachgewiesen werden (Li *et al.*, 2024; Vogel *et al.*, 2025). Der Anteil dieser Enzyme an der metabolischen Aktivierung von NBH, NNT und NFluo und infolge dessen gebildeter N7-MeG und O^6-MeG Addukte wurde von Vogel *et al.* mithilfe von ctDNA, rekombinanten CYP Enzymen und S9 Mix untersucht (Vogel et al., 2025). Für NBH konnte gezeigt werden, dass N7-MeG hauptsächlich nach metabolischer Aktivierung von CYP2A6 gebildet wird, während die Beteiligung von CYP2B6 geringer ausgeprägt ist (Vogel *et al.*, 2025). Dies kann mit dem Pyridinring begründet werden, auf welchem die strukturelle Ähnlichkeit zu den CYP2A6 Substraten NNN und NNK basiert (Vogel *et al.*, 2025; Hecht *et al.*, 1998; Jalas *et al.*, 2005). CYP2A6 ist zudem an der Enstehung von O^6-MeG Addukten beteiligt (Vogel *et al.*, 2025). An der metabolischen Aktivierung von NNT und nachfolgend gebildeten N7-MeG-, und O^6-MeG Addukte ist hauptsächlich CYP3A4 beteiligt, gefolgt CYP2B6 und CYP2C19 (Vogel *et al.*, 2025). An der metabolischen Aktivierung von NFluo und nachfolgend gebildeter O^6-MeG sowie N7-MeG Addukte hatten ebenfalls CYP3A4, CYP2C19 und CYP2B6 den größten Einfluss, wobei der Hauptanteil durch CYP2B6 katalysiert wird, gefolgt von CYP2C19 und CYP3A4 (Vogel *et al.*, 2025). Für die metabolische Aktivierung von NDMA ist insbesondere CYP2E1 relevant (Fahrer *et al.*, 2023; Carlsson *et al.*, 2025; Vogel *et al.*, 2025). Die Beteiligung verschiedener CYP Enzyme an der metabolischen Aktivierung der NDSRIs im Vergleich zu NDMA könnte ebenso Begründung für die abweichende Adduktbildungskinetik von NDMA im Vergleich zu NBH, NNT und NFluo sein (Vogel *et al.*, 2025). Für CYP2B6 und CYP3A4 besitzen PRHs ausreichend Proteinaktivität, was innerhalb dieser Arbeit demonstriert werden konnte (vgl. Abb. 34). Für CYP2A6 hingegen konnte das Stoffwechselverhältnis nicht bestimmt werden, da das Substrat Nikotin nicht detektierbar war (s. Abb. 34). Für CYP2C19 konnte kaum Metabolit identifiziert werden, was die Vermutung zulässt, dass dieses Enzym nahezu inaktiv in PRH ist (s. Abb. 34). Damit sind für NFluo und NNT in einem Zellmodell, das über aktive CYP2C19 Aktivität verfügt, höhere N7-MeG-, und O^6-MeG-Adduktlevel anzunehmen als in PRH, da auf deren Entstehung CYP2C19 Einfluss nimmt (Vogel *et al.*, Abb. 34). Die infolge der Aktivierung gebildeten Metaboliten könnten zur N-Alkylierung der DNA geführt haben, was mit den gemessener N3-MeA, und N7-MeG-Addukten nach Behandlung mit NNT und NFluo in

Studien von Vogel und Coautoren demonstriert werden konnte (Vogel *et al.*, 2025, Carlsson *et al.*, 2025). Die infolge dessen gebildeten Strangbrüche sind mit im Zuge der BER gebildeten Einzelstrangbruchintermediate zu begründen (vg. Abb. 54 a, 55 a, Carlsson *et al.*, 2025; Engelward *et al.*, 1997; Gates *et al.*, 2004; Demple *et al.*, 2005). Dennoch sind infolge der Exposition gegenüber NDSRIs eingeleitete Reparaturmechanismen bisher nicht hinreichend geklärt, weshalb weitere Studien notwendig sind, um ein klärendes Fazit beispielsweise im Hinblick auf das Ausmaß gebildeter sperriger DNA-Addukte zu ziehen. Die im Vergleich zu NDMA intensiver ausgeprägteZytotoxizität von NBH, NNT und NFluo könnte auf Bildung sperriger Addukte zurückzuführen sein (Vogel *et al.*, 2025). Für NFluo besteht in diesem Zusammenhang die Hypothese, dass die mutagenen Effekte durch Methyladdukte hervorgerufen werden, während sperrige Addukte zytotoxische Effekte begründen (Vogel *et al.*, 2025; Li *et al.*, 2024).

5.4.2 Untersuchung des zeitabhängigen Anstiegs von O^6-MeG und N7-MeG und Einfluss der MGMT in PRH nach Behandlung mit NDMA mittels LC-MS

TMZ diente in diesem Versuch als Positivkontrolle, da dieses erwiesenermaßen O^6-MeG-Addukte erzeugt (vgl. Abschnitt 4.4.1, Abb. 56, Abb. 57, Kraus *et al.*, 2019). Zwei der drei Hauptaddukte, O^6-MeG, N7-MeG, die neben N3-MeA-Addukten durch NDMA induziert werden, wurden gemessen (vgl. Abb. 56, Abb. 57). Diese stiegen nach Behandlung in zeitabhängiger Weise bis zu 24 h an, wobei gemessene N7-MeG-Adduktlevel sowohl nach TMZ als auch nach NDMA Behandlung wesentlich höher ausfielen (vgl. Abb. 56, Abb. 57). So wurden 8.1-fach mehr N7-MeG Addukte im Vergleich zu O^6-MeG Addukten gemessen, was in den Literatur beschriebenen Daten für detektierte Addukte in mit NDMA chronisch behandelten Ratten entspricht, die nach 4 h Exposition gemessen wurden (vgl. Abb. 56 A, Abb. 57 A, Yoshimoto *et al.*, 2012; Pegg *et al.*, 1978). In entsprechenden Studien von Pegg *et al.* konnte ein N7-MeG/O^6MeG Verhältnis von 8.3 bestimmt werden (Pegg *et al.*, 1978). Die Bildung von O^6-MeG Addukten nach NDMA Behandlung trat auch in Studien von Carlsson *et al.* in HepG2-CYP2E1 Zellen auf, in welchen der Effekt von NDMA nach Behandlung mit 0.5 mM und 5 mM gemessen wurde (Carlsson *et al.*, 2025). 0.5 mM NDMA führten hierbei zu einem DNA-Adduktlevel von knapp 60 Addukten/10^8 Nukleoside nach 2 h, welches sich nach 24 h auf ein Level von 1000 gemessenen Addukten/10^8 Nukleoside steigerte (Carlsson *et al.*, 2025). Auch in

PRH kam es zu einer Adduktakkumulation im Verlauf der Zeit von etwas geringerer Ausprägung, gleichzeitig konnte kein Rückgang von durch NDMA induzierten DNA-Addukten im Messzeitraum festgestellt werden (vgl. Abb. 56 A, B) . Mit 350 DNA-Addukten/10^8 Nukleoside nach 2 h und 2500 Addukten/10^8 Nukleoside nach 24 h induzierte NDMA in PRH Effekte von etwas deutlicherer Ausprägung als in HepG2-CYP2E1-Zellen (vgl Abb. 56 A, Carlsson *et al.*, 2025). Bei der Interpretation der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass zur Inkubation der PRH eine zweifach höhere Konzentration an NDMA gewählt wurde (vgl. Abschnitt 4.5.2). Die Messung maximaler O^6-MeG-, und N7-MeG nach 24 h im Vergleich zu maximalen Leveln für TMZ nach 4 h sowie der bereits nach 18 h ausschließlich bei TMZ einsetzende Rückgang gemessener Level beider Addukte veranschaulichen die langsamere Adduktbildungskinetik von NDMA versus TMZ (s. Abb. 56 A, Abb. 57 A). Diese kann verschiedene Ursachen haben. Neben der vermutlich vergleichsweise langsamer ablaufenden metabolischen Aktivierung, die im Gegensatz zur Aktivierung von TMZ aktiv unter Beteiligung von CYP2E1 erfolgt, können Unterschiede in der zellulären Aufnahme des Substrates sowie der Reaktivität der von NDMA nach metabolischer Aktivierung gebildeten reaktiven Zwischenprodukten Begründung hierfür sein (Stevens *et al.*, 1987; Friedmann *et al.*, 2000; Fahrer *et al.*, 2023; Carlsson *et al.*, 2025). Auch eine vorübergehende Inhibierung des MGMT-Enzyms, welches O^6-MeG repariert, anschließend den eigenen proteosomalen Abbau induziert und neu synthetisiert werden muss, könnte das vielfach höhere DNA-Adduktlevel nach 24 h im Vergleich zu 2 h erklären (Pegg *et al.*, 2011). Ursache für die schneller stattfindende Adduktbildung nach Behandlung mit TMZ könnte zudem auf spontanen Zerfall von TMZ zu MITC, zurückgeführt werden (Stevens *et al.*, 1987; Clark *et al.*, 1995; Friedmann *et al*. 2000). MITC ist instabil und zerfällt schließlich zum Methyldiazoniumion (Spassova *et al.*, 1985; Denny *et al.*, 1994; Friedmann *et al.*, 2000). Um indirekt Informationen über das Ausmaß gebildeter O^6-MeG Addukte, welche hauptsächlich durch das MGMT-Enzym repariert werden, zu erhalten, wurden PRH vergleichend mit und ohne MGMT Inhibitor O^6-BG behandelt (s. Abschnitt 4.4.2, Abb. 56 B). Dieses wird in Mäusen, Ratten und im Menschen zu einem gleichermaßen aktiven Metaboliten, O^6-benzyl-8-oxoguanin (8-oxo-BG), unter Beteiligung von CYP3A4, CYP1A2 sowie Aldehyd Oxidasen konvertiert (Ewesuedo *et al.*, 2000). Bioverfügbarkeit von O^6-BG sowie 8-oxo-

BG konnte in Studien von Ewesuedo et al nach oraler Applikation in Ratten nachgewiesen werden (Ewesuedo *et al.*, 2000). Aufgrund des Anstiegs gebildeter Addukte in mit MGMT-Inhibitor und NDMA sowie TMZ behandelten Proben konnte gezeigt werden, dass MGMT eine Rolle für die Reparatur gebildeter O^6-MeG-Addukte in PRH spielt (s. Abb. 56 B). Dennoch ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied messen (Abb. 56 B). Mögliche Ursachen hierfür sind eine im Vergleich zu *in vivo* Studien von Ewesuedo *et al.* begrenzte zellulären Aufnahme des MGMT-Inhibitors (Ewesuedo *et al.*, 2000). Eine andere Erklärung liefern Studien, in denen speziesspezifische, sehr hohe Proteinaktivitäten des MGMT-Enzyms nach Exposition gegenüber alkylierenden Substanzen gezeigt werden konnten (Grombacher *et al.*, 1996). Nach Grombacher *et al.* konnte nach MNNG Behandlung eine bis zu 6-fache Induktion der MGMT-Proteinaktivität in primären Ratten Hepatozyten sowie in verschiedenen differenzierten Hepatoma Zelllinien gemessen werden, die mit dem Grad der Differenzierung korrellierte (Grombacher *et al.*, 1996). Diese Erkenntnis lässt die Vermutung zu, dass entsprechend höhere Inhibitorkonzentrationen angewendet werden müssten, um signifikante Effekte in Bezug auf das DNA-Adduktlevel in PRH zu detektieren. In HepG2-CYP2E1 Zellen konnte ein statistisch signifikanter Einfluss der MGMT an der Reparatur gebildeter O^6-MeG-Addukte mittels konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie demonstriert werden (Carlsson *et al.*, 2025). Hierbei kam es nach Behandlung mit 10 mM NDMA in Kombination mit O^6-BG zu einer knapp 1.5-fachen Steigerung des O^6-MeG-Levels im Vergleich zur Negativkontrolle (Carlsson *et al.*, 2025). Ein weiterer Schritt bestand in Einfluss der MGMT auf die Reparatur gebilder N7-MeG Addukte zu untersuchen, für welche bekannt ist, dass diese hauptsächlich durch die BER repariert werden (Fahrer *et al.*, 2023). Die Detektion statistisch signifikanter Unterschiede in mit TMZ behandelten Proben nach 4 h Inkubation, die vergleichsweise mit und ohne MGMT-Inhibitor behandelt wurden, spricht für den Einfluss von MGMT bei hohen N7-MeG-Adduktleveln und gleichzeitiger Erschöpfung der Reparaturkapazität der BER. In der Literatur existieren Daten, die darauf hindeuten, dass die MGMT-Aktivität durch das an der BER beteiligte Protein PARP reguliert wird, welches eine entscheidende Rolle bei der BER-Prozessierung von N-Alkylpurinen spielt (Fang *et al.*, 2024). Die PARP vermittelte PARylierung verbessert die Bindung der MGMT an das Chromatin sowie die Entfernung von DNA-Addukten, was auf eine mögliche, gegenseitige Aktivierung der beiden Reparaturwege hindeutet

(Cropper *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2021). Für eine Beteiligung der MGMT an der Reparatur von N7-MeG Addukten fehlen in der Literatur jedoch Daten, die einen solchen Zusammenhang belegen. Für NDMA traten keine vergleichbaren Effekte auf (vgl. Abb. 57 B). So gab es für den MGMT-Inhibitor keine statistisch signifikanten Effekte auf das messbare N7-MeG-Adduktlevel in mit NDMA behandelten Proben im Zeitraum von 0 - 24 h (Abb 57 B).

5.5 Untersuchungen der Metabolischen Kompetenz in HepG2 mittels LC-MS

Für CYP2E1, CYP1A2 sowie für CYP2D6 konnte ausreichend enzymatische Aktivität in den durch lentivirale Transduktion hergestellten Zelllinien HepG2-CYP2E1 nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 4.5, Abb. 58, Steinbrecht *et al.*, 2020; Carlsson *et al.*, 2025). In HepG2-CYP3A4 Zellen, HepG2-CYP1A2 Zellen in HepG2 Zellen war keine Aktivität von CYP2E1 messbar (s. Abb. 58, Herzog *et al.*, 2015). Dagegen konnte in Studien von Seo und Coautoren CYP Aktivität von CYP3A4, CYP2B6 und CYP2C9 in HepaRG Zellen, nicht jedoch in HepG2 Zellen nachgewiesen werden (Seo *et al.*, 2019). Auch in PHHs sowie in primären Makaken Hepatozyten (PMHs) ließ sich Proteinaktivität von CYP3A4, CYP2B6 und CYP2C9 nachweisen (Seo *et al.*, 2020; Seo *et al.*, 2025). In PHHs sowie in PMHs konnte zudem CYP2E1 Aktivität nachgewiesen werden (Seo *et al.*, 2025). CYP1A2 Aktivität ließ sich im Rahmen dieser Arbeit in allen Zelllinien demonstrieren (Abb. 58). Seo *et al.* konnte hingegen nur CYP1A2 Aktivität in HepaRG Zellen sowie in PHHs und PMHs demonstrieren, während die absolute Proteinaktivität in HepG2 Zellen undetektierbar oder kleiner als 1 pmol/min/mg Protein war (s. Abb. 58, Seo *et al.*, 2019; Seo *et al.* 2025). In PMHs waren die Proteinaktivitäten für CYP3A4, CYP1A2 und CYP2B6 am höchsten, gefolgt von CYP2D6, CYP2C19, CYP2E1 und CYP2C9, während PHHs für CYP2D6 höhere Proteinaktivitäten als für CYP1A2 und CYP2B6 nachgewiesen werden konnte (Seo *et al.*, 2025). Die Aktivitäten von CYP2C9 und CYP2E1 waren in PHHs zudem ähnlich ausgeprägt (Seo *et al.,* 2025). Zudem wiesen PHHs höhere CYP2E1 und CYP2C9 Proteinaktivitäten als PMHs auf, während die absoluten Aktivitäten aller übrigen CYP Enzyme in PMHs höher als in PHHs war (Seo *et al.*, 2025). Dies verdeutlicht speziesspezifische Unterschiede (Seo *et al.*, 2025). Zudem konnten Seo und Coautoren aufgrund der Messung von CYP Enzymaktivitäten unterschiedlicher Spender interindividuelle Unterschiede hinsichtlich

der metabolischen Kompetenz demonstrieren (Seo *et al.*, 2025). Das Signal des durch CYP2E1 entstehenden Metaboliten Hydroxychlorzoxazon war innerhalb der vier untersuchten Zelllinien den Erwartungen entsprechend auch in HepG2-CYP2E1 Zellen vorhanden (s. Abb. 58). Dies korrelliert mit Studien von Carlsson, in welchem der Nachweis des Enzyms mithilfe von Western Blot sowie Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnte (Carlsson *et al.*, 2025). Seo und Coautoren konnten im Vergleich zu den in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP3A4 Zellen erhobenen Daten absolute Proteinaktivitäten von von CYP2D6 in HepaRG Zellen nachweisen, jedoch nicht in HepG2 Zellen (Seo *et al.*, 2019). Der Nachweis ausreichender CYP2E1 Aktivität in HepG2-CYP2E1 Zellen ist insbesondere aufgrund der metabolischen Aktivierung von NDMA, NDELA und NMA von Relevanz, an welcher dieses CYP Enzym maßgeblich beteiligt ist (Liu *et al.*, 2008; Yamazaki *et al.*, 1992; Loeppky *et al.*, 2002; Carlsson *et al.*, 2025). Für diese scheinen die Zelllinien geeignete Modelssysteme darzustellen (vgl. Abb. 58). Das Stoffwechselverhältnis von CYP2E1 aus dem im Rahmen des EMA Projektes verwendeten S9 Mix aus der Spezies Hamster sowie aus der Spezies Ratte war deutlich höher als das Stoffwechselverhältnis von CYP2E1 in HepG2-CYP2E1 Zellen (vgl. Abb. 58, Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Gleichermaßen war das Stoffwechselverhältnis von CYP2D6 und CYP1A2 in HepG2-CYP1A2, HepG2-CYP2E1, HepG2-CYP3A4 und in HepG2 geringer ausgeprägt (vgl. Abb. 58, Djuari & Londenberg *et al.*, 2023. Die Zelllinien HepG2-CYP2E1 und HepG2-CYP1A2 scheinen auch geeignet hinsichtlich der metabolischen Aktivierung von NNN zu sein. Studien von Zarth *et al.* konnten zeigen, dass an der metabolischen Aktivierung von NNN CYP2E1 und CYP2D6 beteiligt sind (s. Abb. 58, Zarth *et al.*, 2016). Nicht nachweisbare bzw. geringe Enzymaktivität von CYP2E1 und CYP2D6 der HepG2 Zellen, welche in dieser Arbeit ermittelt wurden, korrellieren mit Daten, welche im Rahmen des EMA Projektes generiert wurden (vgl. Abb. 58, Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Auch hier ließ sich keine Aktivität von CYP2D6 und CYP2E1 anhand des Stoffwechselverhältnisses feststellen (vgl. Abb. 58, Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Dagegen konnte in dieser Arbeit geringe Aktivität von CYP1A2 demonstriert werden, welche jedoch nicht in der innerhalb des EMA Projektes verwendeten HepG2 Zelllinie nachweisbar war (s. Abb. 58, Djuari & Londenberg *et al.*, 2023).

Bei der Interpretation der in dieser Arbeit in HepG2 Zellen erhobenen Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass das ermittelte Stoffwechselverhältnis relative

Proteinaktivitäten anstelle von absoluten Proteinaktivitäten beschreibt, welche in der Literatur oftmals durch die Umsetzungseinheit pmol/min/Menge Protein angegeben sind (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Zudem wurde bei der Substratauswahl die Spezifität humaner CYP Enzyme berücksichtigt, während keine Selektion anhand der Affinität erfolgte (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In der Literatur wird das Vorhandensein aktiver Phase-II Enzyme in HepG2 Zellen beschrieben, für welche die im Rahmen dieser Arbeit detektierten Phase-I-Metaboliten Substrate sind (Hewitt *et al.*, 2004). Durch diesen Phase-II-Metabolismus wird die exakte Ermittlung der Proteinaktivität zusätzlich beeinträchtigt (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Die erhobenen Daten sind aus den genannten Gründen von qualitativer Natur und erlauben eine Beurteilung, ob und in welchem Ausmaß Effekte in den nachfolgenden Untersuchungen zu erwarten sind (s. Abb. 58).

5.6 Untersuchung der Zytotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 mittels Zellviabilitätstest

5.6.1 Effekt von CPA

CPA hatte geringen Einfluss auf die Zellviabilität in HepG2, HepG2-CYP3A4 und HepG2-CYP1A2 Zellen (vgl. Abschnitt 4.6.1, Abb. 59). In HepG2 Zellen war das Ausmaß hervorgerufenerzytotoxischer Effekte größer als das in HepG2-CYP1A2 Zellen und in HepG2-CYP3A4 Zellen induzierte (vgl. Abb. 59). Die Behandlung mit 9 mM nach 24 h führte zu einer Abnahme der Zellviabilität um 10 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Abschnitt 4.6.1, Abb. 59). Eine maximale Reduktion der Zellviabilität um 20 % im Vergleich zur Negativkontrolle war in HepG2 Zellen nach Behandlung mit 7.5 mM detektierbar (vgl. Abb. 59). Seo *et al.* konnte mittels ATP Assay nach 24 h Inkubation von 10 mM CPA in HepaRG Zellen eine Abnahme der Zellviabilität um 25 % im Vergleich zur Negativkontrolle demonstrieren, was auf eine im Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten HepG2 Zellen etwas höhere Sensitivität dieses Zellmodels hindeutet (Seo *et al.*, 2019). Die im Rahmen dieser Arbeit in HepG2 Zellen ermittelte Abnahme der Zellviabilität korrelliert mit von Seo *et al.* erhobenen Resultaten in HepG2 Zellen, in welchen 10 mM CPA zu einer Abnahme der mittels ATP Assay gemessenen Zellviabilität

um 10 % im Vergleich zur Negativkontrolle führte (vgl. Abb. 60, Seo *et al.*, 2019). Dennoch muss der in Studien von Seo *et al.* abweichende Endpunkt beim Vergleich der in HepG2 Zellen erhobenen Ergebnissen berücksichtigt werden. In PHHs führte 10 mM CPA zu einer Abnahme der mittels MTS ermittelten Zellviabilität um knapp 15 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Seo *et al.*, 2020). Fenselau und Coautoren konnte in humanem Blut erstmals zeigen, dass nach intravenöser Applikation von CPA Aldophosphamid gebildet wird (Fenselau *et al.*, 1977). Roy *et al.* demonstrierte durch Verwendung humaner CYP Enzyme, welche in Supersomen sowie Lymphoblasten überexprimiert wurden, dass an der metabolischen Aktivierung von CPA hauptsächlich CYP3A4 und CYP2B6 beteiligt sind, wobei der Hauptanteil des entstehenden 4-Hydroxymetaboliten auf die Katalyse durch CYP2B6 zurückgeführt werden kann (Roy *et al.*, 1999). Ren und Coautoren konnte in humanen Mikrosomen zeigen, dass nach metabolischer Aktivierung 4-OH-CPA entsteht (Ren *et al.*, 1997). Dieses steht in einem Gleichgewicht mit dem ringoffenen Tautomer Aldophosphamid, aus welchem nach β-Eliminierung Phosphoramidmustard sowie Acrolein gebildet werden kann (Sladek *et al.*, 1988). Phosphoramidmustard kann durch crosslinks zwischen DNA-Strängen sowie crosslinks zwischen DNA und Proteinen zytotoxische Effekte hervorrufen (Erickson *et al.*, 1980). Begründung für durch CPA hervorgerufenen zytotoxischen Effekte kann zudem die Einleitung des programmierten Zelltodes sein (Goldstein *et al.*, 2008). So führte das CPA Analogon Maphosphamid in Lymphoblastoid Zellen (p53 wt) zur Apoptose (Goldstein *et al.*, 2008). Nach ATM/ATR vermittelter Phosphorylierung von CHK1/CHK2 erfolgte über Phosphorylierung von p53 an Ser15, 20 und Ser37 die Einleitung des Caspase abhängigen Zelltodes (Goldstein *et al.*, 2008). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Maphosphamid und CPA sind für CPA ähnliche Effekte anzunehmen (Goldstein *et al.*, 2008). Zusätzlich kann Acrolein durch Glutathion Depletion zu zytotoxischen Effekten führen (Crook *et al.*, 1986; Gurtoo *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1991). Das Ausbleiben zytotoxischer Effekte in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 Zellen lässt sich damit begründen, dass die verwendeten Zelllinien keine ausreichende metabolische Aktivität des an der Aktivierung von CPA hauptsächlich beteiligten Enzyms CYP2B6 aufweisen (vgl. Abb. 58, Abb. 59, Roy *et al.*, 1999). Diese Feststellung korrelliert mit in der Literatur beschriebenen Daten von Seo und Coautoren, der die Enzymaktivität nach 2 h Inkubation mit CYP

spezifischen Substraten in HepG2 untersuchte (Seo *et al.*, 2019). In diesem Zusammenhang lagen die Proteinaktivitäten zwischen 0 und unter 1 pmol/min/mg Protein für die P450 Enzyme CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP2B6 und CYP3A4 (Seo *et al.*, 2019). Zytotoxizität in HepG2 Zellen nach 24 h Behandlung mit CPA war unter Berücksichtigung verschiedener Endpunkte, darunter dem ATP, MTS und Zellviabilitätstest, ebenfalls nicht messbar. Studien in HepG2-CYP3A4 Zellen demonstrierten hingegen eine Abnahme der metabolischen Aktivität um bis zu 50 % nach Behandlung mit CPA mittels MTS und XTT Assay (Steinbrecht *et al.*, 2019). Die Diskrepanz zu in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen nach Behandlung von HepG2-CYP3A4 könnte am abweichenden Endpunkt zur Messung zytotoxischer Effekte liegen. Eine Begründung für das Ausbleiben zytotoxischer Effekte in dieser Arbeit lässt sich mit einer hauptsächlich durch CYP3A4 vermittelten N-Dechloroethylierung, die zur direkten Detoxifizierung von CPA führt, erklären und konnte bereits in humanen Lebermikrosomen nachgewiesen werden (Ren *et al.*, 1997). Darüberhinaus werden die von CPA nach CYP2B6 vermittelter 4-Hydroxylierung gebildeten Metaboliten Aldophosphamid, Acrolein sowie Phosphoamidmustard durch Glutathion-S-Transferasen (GST) detoxifiziert (Gamcsik *et al.*, 1999). Daher lässt sich das Ausbleiben zytotoxischer Effekte in den vier HepG2 Zelllinien auch mit der in diesen Zelllinien vorhandenen GST-Expression, welche in Studien von Marí *et al.* für HepG2-CYP2E1 und in weiteren Studien für HepG2 Zellen gezeigt werden konnte, begründen (Steinbrecht *et al.*, 2019; Dierickx *et al.*, 1989; Duthie *et al.*, 1988). Die wichtigste Detoxifizierungsreaktion von CPA wird durch Aldehydehydrogenase 1 (ALDH1) vermittelt, die die Reaktion von Aldophosphamid zu Carboxyphosphamid katalysiert (Struck *et al.*, 1975). Bekannte Daten zu ALDH1-Level in HepG2 Zellen sind bisher nicht bekannt. Hohe ALDH1 Proteinaktivität in den verwendeten Zelllinien wäre eine weitere denkbare Ursache für das Ausbleiben zytotoxischer Effekte in HepG2 Zellen. Eine weitere Detoxifizierungsreaktion wird durch Alkoholdehydrogenase (ADH) vermittelt, welche 4-Hydroxycyclophosphamid zu 4-Ketocyclophosphamid oxidiert (Struck *et al.*, 1975). Weniger bedeutend ist die Reduktion von Aldophosphamid zu Alcophosphamid durch die Aldosereduktase (AR) (Dockham *et al.*, 1997). Auch für diese beiden Enzyme existieren keine Studien im Hinblick auf Expression oder Aktivität in HepG2 Zellen.

5.6.2 Effekt von MMS

In allen verwendeten Zelllinien reduzierte das direkt wirksame Alkylanz MMS innerhalb von 24 h die Zellviabilität, wobei einzelne EC_{50}-Werte zwischen den Zelllinien im Bereich zwischen 400 und 500 µM lagen (Abschnitte 4.6.2, 4.6.3, Abb. 60, Abb. 61). 500 µM MMS führte nach 24 h zu einer mittels ATP Assay gemessenen Abnahme der Zellviabilität um knapp 20 % in HepaRG Zellen sowie um knapp 25 % in HepG2 Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (Seo *et al.*, 2019). Zudem konnte in Studien von Seo und Coautoren eine Abnahme der Zellviabilität um knapp 15 % im Vergleich zur Negativkontrolle in PHH nach 24 h Behandlung mittels ATP Assay gemessen werden (Seo *et al.*, 2020). Damit waren die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sensitiver als die von Seo verwendeten Zellmodelle (vgl Abb. 60, Abb. 61, Seo *et al.*, 2019; Seo *et al.*, 2020). Die Ergebnisse decken sich mit in der Literatur publizierten Studien, in welchen durch MMS hervorgerufene zytotoxische Effekte in isolierten Hepatozyten demonstriert werden konnten (Mizumoto *et al.*, 1993; Reitmann *et al.*, 1988). Hierbei konnte eine Freisetzung von 90 % Laktat nach 180-minütiger Behandlung mit 2 mM MMS gemessen werden (Reitmann *et al.*, 1988). Ein durch MMS induzierter Effekt besteht in der Induktion von Einzelstrangbrüchen nach Bildung von N7-MeG-, und N3-MeA-Addukten im Zuge der DNA-Reparatur (Hayaishi *et al.*, 1977; Glaab *et al.*,1999; Fahrer *et al.*, 2023). Diese führen zur Aktivierung der poly(ADP-ribose)polymerase infolge der Übertragung einer ADP-Ribose Einheit von NAD (Mizumoto *et al.*, 1993; Carson *et al.*, 1986). Ein ausgeprägter DNA-Schaden kann in der Folge zu einer Akkumulation von ADP-Riboseketten und einer verstärkten NAD-Depletion führen (Mizumoto *et al.*, 1993). In Studien von Mizumoto *et al.* wurde die Konzentration an zellulärem ATP von 8 nmol/10^6 Zellen auf knapp 1 nmol/10^6 Zellen durch Behandlung mit 1 mM MMS innerhalb von 12 h reduziert, während sich die NAD-Konzentration von knapp 2.8 nmol/10^6 Zellen auf 0 nmol/10^6 Zellen verringerte (Mizumoto *et al.*, 1993). Da NAD zur ATP-Synthese innerhalb der Zellatmung benötigt wird, resultiert ein Mangel in zytotoxischen Effekten aufgrund unzureichender ATP-Syntheseleistung innerhalb der Mitochondrien (Mizumoto *et al.*, 1993; Berger *et al.*, 1985). Aufgrund der Notwendigkeit von ATP für die Resynthese von NAD hat eine verringerte ATP-Ausbeute im Verlaufe der Zellatmung verstärkenden Effekt auf den NAD-Mangel (Mizumoto *et al.*,1993; Carson *et al.*, 1986; Berger *et al.*, 1985). Glaab *et al.* konnte

in Basenfehlpaarungsreparatur defizienten, humanen Krebszelllinien HCT116 und DLD-1 zeigen, dass die Sensitivität gegenüber durch MMS induzierten, zytotoxischen Effekten geringer ist als in Reparaturprofizienten Zelllinien, während die Mutationsfrequenz höher war (Glaab *et al.*, 1999). Glaab und Coautoren postulieren in diesem Zusammenhang, dass die durch MMS induzierten N7-MeG-, sowie N3-MeA Addukte für die Induktion zytotoxischer Effekte durch Entstehung abasischer Stellen verantwortlich sind, welche Substrat der Basenfehlpaarungsreparatur darstellen (Glaab *et al.*,1999). Im Vergleich zu N3-MeA ist N7-MeG aufgrund der spontanen Depurinierung als weniger kritisch zu betrachten (Fahrer *et al.*, 2023). Zytotoxizität wird zudem durch die im Zuge der Basenexzision (BER) entstehenden, nicht reparierten Einzelstrangbruchintermediaten hervorgerufen (Lundin *et al.*, 2005). Neben genotoxischen Effekten, zu denen Alkylierungen an N3-MeA und N7-MeG zählen, vermag MMS weitere Mechanismen zu induzieren die zur Reduktion der Zellviabilität führen können. Hierzu zählen oxidative Schäden, Acetylierung von Proteinen sowie die Induktion von Lipidstress an der Membran des Zellkerns (Ovejero *et al.*, 2021). Oxidative Schäden werden durch MMS auf indirektem Weg durch die Depletion von Glutathion hervorgerufen (Mizumoto *et al.*, 1993). So führte 1 mM MMS innerhalb von 1 h - 2 h zu einer vollständigen Glutathion Depletion in Hepatozyten (Mizumoto *et al.*, 1993). Konsequenz der schnellen Glutathion Depletion ist die erhöhter Sensitivität gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies, was in der Folge zu Lipidperoxidation und zum Zelltod in Hepatozyten führen kann (Miccadei *et al.*,1988; Miccadei, Nakae *et al.*, 1988). Innerhalb von 3 h - 4 h verringerte sich die Zellviabilität infolge der Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies um über 70 % in kultivierten Hepatozyten (Mizumoto *et al.*, 1993). Lipidstress, welcher sich anhand eines Membranwachstums, Ausstülpungen des Endoplasmatischen Retikulums sowie der Bildung nuklearer Lipidtröpfchen bemerkbar machte, konnte in Studien von Ovejero *et al.* auch in HepG2, die mit 590 µM MMS für 2 h behandelt wurden, gezeigt werden (Ovejero *et al.*, 2021). Letztlich sind diese Prozesse auf die in dieser Arbeit erhobenen Daten übertragbar, weshalb sie als Begründung für die festgestellte Abnahme der Zellviabilität im Konzentrationsbereich bis 900 µM herangezogen werden können (vgl. Abb. 60, Abb. 61).

5.6.3 Effekt von NDMA

In HepG2 Zellen, HepG2-CYP3A4 Zellen und in HepG2-CYP1A2 Zellen hatte NDMA kaum Einfluss auf die Zellviabilität (vgl. Abschnitt 4.6.4, Abb. 62, Abb. 63, Abb. 64, Tab. 22). Eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität von NDMA zeigte sich zusammenfassend nur nach 72 h Inkubation in HepG2-CYP2E1 Zellen (s. Abb. 65 B). Die im Vergleich zu HepG2, HepG2-CYP3A4 und HepG2-CYP1A2 Zellen deutlicher ausgeprägten zytotoxischen Effekte von NDMA in HepG2-CYP2E1 Zellen können auf Unterschiede in der CYP2E1 Proteinaktivität zurückgeführt werden (vgl. Abb. 58). So ließ sich keine CYP2E1 Aktivität in HepG2 Zellen und in HepG2-CYP3A4 Zellen nachweisen, während sich Aktivitäten in HepG2-CYP2E1 Zellen und HepG2-CYP1A2 Zellen detektieren ließen (s. Abb. 58). In Einklang mit den Effekten auf die Zellviabilität war die CYP2E1 Aktivität in HepG2-CYP1A2 Zellen schwächer ausgeprägt als in HepG2-CYP2E1 Zellen (vgl. Abb. 58). Auch in Studien von Seo und Coautoren führte NDMA nach 24 h zu schwachen zytotoxischen Effekten in HepG2 Zellen nach Behandlung mit 10 mM NDMA (Seo *et al.*, 2019). Zytotoxische Effekte von NDMA, die in HepG2-CYP2E1 Zellen im Rahmen dieser Arbeit auftraten, konnten zudem in weiteren Studien von Seo und Coautoren, in welche die Zellviabilität von NDMA in 2D HepaRG Zellkulturen sowie in 3D HepaRG Spheroiden untersucht wurde, die ebenfalls aktive CYP2E1 Proteinaktivität aufwiesen, bestätigt werden (Seo *et al.*, 2023). Hierbei induzierte NDMA nach 24 h eine Abnahme der ATP-Konzentration um knapp 14 % in 2D HepaRG Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (Seo *et al.*, 2023). Beim Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse mit den Daten von Seo und Coautoren muss berücksichtigt werden, dass es sich beim ATP Assay um einen abweichenden Endpunktmethode handelt (Seo *et al.*, 2023). In Übereinstimmung mit den in PRH erhobenen Daten reichten die in HepG2-CYP2E1 Zellen detektierten Effekte zur Bestimmung einer EC_{50} nicht aus (vgl. Abb. 37 A, Abb. 65 B). Die in HepG2-CYP2E1 Zellen und in HepG2 Zellen erhobenen Ergebnisse stimmen mit Studien von Carlsson *et al.* überein, in welchen NDMA nach 72 h ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellviabilität in HepG2-CYP2E1 Zellen um knapp 15 % im Vergleich zur Negativkontrolle führte (Carlsson *et al.*, 2025). Damit waren die von Carlsson *et al.* erhobenen Effekte etwas schwächer ausgeprägt als die in dieser Arbeit durch NDMA verursachte Zellviabilitätsabnahme um

knapp 40 % nach 72 h in HepG2-CYP2E1 Zellen (vgl. Abb. 65, Carlsson *et al.*, 2025). In HepG2 Zellen führte NDMA weder nach 24 h noch nach 72 h zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität, was mit Studien von Carlsson *et al.* korrelliert (s. Abb. 62 A, 62 B, Carlsson *et al.*, 2025). Das Ausbleiben zytotoxischer Effekte in HepG2, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP3A4 Zellen nach 24 h und 72 h Behandlung mit NDMA steht im Einklang mit Studien von Reitmann *et al.*, in welchen NDMA keine zytotoxischen Effekte in isolierten Hepatozyten hervorrief sowie mit den im Rahmen dieser Arbeit in PRH erhobenen Ergebnissen (vgl. Abb. 37, Abb. 62 - 64, Tab. 22, Reitmann *et al.*, 1988).

5.6.4 Effekt von NDELA

In HepG2 Zellen induzierte NDELA weder nach 24 h noch nach 72 h zytotoxische Effekte im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 66, Tab. 22). Dies lässt sich mit der fehlenden CYP2E1 Aktivität in dieser Zelllinie erklären (vgl. Abb. 58). Diese Ergebnisse stehen zudem in Einklang mit den von Carlsson *et al.* in HepG2 Zellen erhobenen Daten (Carlsson *et al.*, 2025). In HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP3A4 Zellen konnte eine Abnahme der Zellviabilität nach 72 h festgestellt werden, welche einen biphasischen Verlauf beschrieb (s. Abb. 67 - 68). So kam es nach Abnahme der Zellviabilität bis 1 mM zu einer Zunahme, an welche sich eine erneute Abnahme bei 10 mM anschloss (vgl. Abb. 67 - 68). Aufgrund hoher Standardabweichungen sind diese Effekte weniger eindeutig als in HepG2-CYP2E1 Zellen, was bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden muss (vgl. Abb. 67 - 68, s. Abb. 69). Eindeutige zeitabhängige und konzentrationsabhängige Effekte waren in HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NDELA zu beiden Messzeitpunkten feststellbar, wobei das Ausmaß der Effekte nach 72 h größer war (vgl. Abb. 69 A, B). Zudem ließen sich nach beiden Zeitpunkten statistisch signifikante Effekte detektieren (s. Abb. 69 A, B). Eine Ursache für die im Vergleich zu HepG2, HepG2-CYP3A4 und HepG2-CYP1A2 Zellen deutlicheren zytotoxischen Effekte von NDELA in HepG2-CYP2E1 Zellen sind die vergleichsweise hohen CYP2E1 Aktivitäten in dieser Zelllinie (vgl. Abb. 58). Die in HepG2-CYP2E1 Zellen erhobenen Daten korrellieren mit Studien von Carlsson *et al.*, in welchen 10 mM NDELA nach 72 h ebenfalls zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Zellviabilität in HepG2-CYP2E1 Zellen führte (vgl. Abb. 69 A, B, Carlsson *et al.*, 2025). Auch in mit CYP2E1 transfiszierten V79 Hamster Fibroblasten führte NDELA in konzentrationsabhängiger Weise zu einem Anstieg zytotoxischer Effekte nach 24 h

Behandlung in mit NDELA und β-D_4-NDELA behandelten Zellen, während in mit α-D_4-NDELA behandelten Zellen keine Effekte auftraten (Loeppky *et al.*, 1998). Diese Daten verdeutlichen die Relevanz der CYP2E1 vermittelten α-Hydroxylierung für die Induktion zytotoxischer Effekte infolge der metabolischen Aktivierung von NDELA in V79 Hamster Fibroblasten, welche mit den im Rahmen dieser Arbeit und mit den von Carlsson *et al.* erhobenen Ergebnissen in HepG2-CYP2E1 Zellen in Einklang stehen (Loeppky *et al.*, 1998, s. Abb. 69, Abb. 94, Carlsson *et al.*, 2025). Hierbei ließ sich die Entstehung des nach CYP2E1 katalysierter α-Hydroxylierung entstehenden, reaktiven Diazoniumion sowie die Bildung von Glyoxal demonstrieren, welche in der Folge zur Bildung von gdG-, und OHEdG-Addukten führen können (Loeppky *et al.*, 1998; Dennehy *et al.*, 2005).

5.6.5 Effekt von S-NNN

In HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 Zellen führte S-NNN zu zytotoxischen Effekten, wobei diese im Wildtyp bereits nach 24 h bei Konzentrationen > 1 mM auftraten und mit einer Abnahme von knapp 60 % sehr ausgeprägt waren (vgl. Abb. 70, s. Abb. 71 - 73). Eine eindeutige konzentrationsabhängige und zeitabhängige Abnahme der Zellviabilität war in HepG2-CYP3A4 Zellen nach 72 h detektierbar, wobei hier keine statistisch signifikanten Ergebnisse auftraten (s. Abb. 71). In HepG2-CYP3A4 und in HepG2-CYP2E1 Zellen trat die Abnahme der Zellviabilität bereits nach Konzentrationen > 1 mM auf (s. Abb. 71 B, 73 B). Diese Daten deuten eine im Vergleich zu den übrigen HepG2 Zelllinien höhere Sensitivität in HepG2-CYP3A4 Zellen an (s. Abb. 71 B). Zur möglichen Begründung hierfür kann auf Daten von Patten *et al.* verwiesen werden, in welchen eine Beteiligung von CYP3A4 an der metabolischen Aktivierung von NNN in humanen Lebermikrosomen beschrieben wird (Patten *et al.*, 1997). In diesem Zusammenhang ließ sich in CYP3A4, CYP2D6, CYP2A6 und CYP2E1 exprimierenden Baculovirus infizierten Sf9 Zellen sowie in CYP3A4 exprimierenden CHO Zellen festellen, dass die 2'-Hydroxylierung hauptsächlich durch CYP3A4 katalysiert wird (Patten *et al.*, 1997). Zytotoxische Effekte wären hiermit auf Metaboliten zurückzuführen, die nach CYP3A4 katalysierter α-Hydroxylierung entstehen (Patten *et al.*, 1997). Reaktive Metaboliten konnten in diesem Zusammenhang von Castonguay und Coautoren in kultiviertem, humanen Gewebe identifiziert werden (Castonguay *et al.*, 1983). Der 2'-Hydroxylierungsweg führte nach Bildung des instabilen α-Hydroxynitrosamines zur Entstehung eines Diazohydroxides, das mit Nukleophilen via S_n2-Mechanismus

reagieren kann (Castonguay *et al.*, 1983). Gleichermaßen kann eine Alkylierung der DNA durch Reaktion mit aus NNN gebildeten Alkyldiazoniumionen oder Carbokationen auftreten (Castonguay *et al.*, 1983). Darüberhinaus kann NNN die Entstehung von Pyridyloxobutyladdukten, darunter N^6-pob-dAdo und O^6-pobdG induzieren (Li *et al.*, 2022; Hecht *et al.*, 1999; Hecht, Hecht *et al.*, 1986). O^6-pobdG wird einerseits durch die MGMT repariert, andererseits sind an der Schadensreversion die NER sowie die TLS beteiligt (Mijal *et al.*, 2004; Fahrer *et al.*, 2023; Choi *et al.*, 2006). Lange, einzelsträngige Reparaturintermediate, die während der GGR durch EXO1 entstehen können die DNA-Schadensantwort und die Apoptose einleiten (Giannattasio *et al.*, 2010). Zytotoxische Effekte in HepG2-CYP3A4 Zellen wären damit zu erklären. NNN führt nach CYP2A6 vermittelter 5'-Hydroxylierung zur Bildung weiterer komplexer Addukte, darunter N^6-OPB-dAdo, N^6-HPB-dAdo, Py-Py-OH-dN, Py-Py-dN und Py-Py-dI, die ebenfalls durch Aktivierung der NER zu zytotoxischen Effekten in den verwendeten HepG2 Zelllinien führen können (Li *et al.*, 2022). Die nach 24 h erhobenen Daten in den anderen HepG2 Zelllinien korrellieren mit Versuchen in Studien von Svedmark *et al.*, in welchen eine leichte Abnahme der Zellviabilität um etwa 20 +/- 7 % nach 24 h Behandlung mit NNN in V79 Hamster Fibroblasten, die mit H4IIE Zellen der Ratte kokultiviert wurden, feststellbar war (Svedmark *et al.*, 1994). Auch in dieser Arbeit lag die Abnahme der Zellviabilität nach 24 h bei etwa 0 - 40 % in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinie, was auf unterschiedliche Sensitivitäten hinsichtlich S-NNN verweist (s. Abb. 70 - 73). Für HepG2-CYP1A2 und HepG2 Zellen ließen sich nach 72 h EC_{50}-Werte ableiten, die knapp unter 10 mM lagen (s. Tab. 22). Die in HepG2 Zellen erhobenen Daten stehen in Einklang mit der von Li *et al.* in CHO-Zellen ermittelten Abnahme der Zellviabilität durch Pyridyloxobutyladdukte wie O^6-pobdG, welche durch NNN infolge der 2'-Hydroxylierung gebildet werden können (Li *et al.*, 2009). Bei der Interpretation der Ergebnisse ist die Organspezifität von NNN zu berücksichtigen Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). In diesem Zusammenhang existieren Literaturdaten, die im Vergleich zur Leber eine bevorzugte Metabolisierung von NNN im Ösophagus beschreiben (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023, Li *et al.*, 2022). Dies könnte erklären, weshalb die in den HepG2-CYP3A4 und in HepG2-CYP2E1 Zellen ermittelten Effekte nicht signifikant waren.

5.7 Untersuchung der Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 nach Behandlung mit strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen mittels Western Blot

5.7.1 Effekt von NDMA

In HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und in HepG2-CYP2E1 Zellen konnten induzierende Effekte auf die p53 Proteinintensität nach Behandlung mit NDMA detektiert werden, wobei der Effekt in HepG2-CYP1A2 Zellen mit einem maximalen Anstieg von 1.25 im Vergleich zur Negativkontrolle am geringsten ausgeprägt war (s. Abb. 74 - Abb. 77, Tab. 23). In HepG2 Zellen führte NDMA zu einem deutlichen Anstieg des p53 Proteinlevels um 2.3 im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 74, Tab. 23). NDMA wird durch CYP2E1 metabolisch aktiviert (Carlsson *et al.*, 2025). CYP2E1 Aktivität konnte in HepG2 Zellen nachgewiesen werden (Alexandre *et al.*,1999). Alexandre *et al.* demonstrierte in diesem Zusammenhang eine vom Wachstum und der verbundenen Zelldichte beeinflusste enzymatische Aktivität sowie Induzierbarkeit von CYP2E1, was mit dem zeitabhängigen, CYP2E1 assoziierten p-nitrophenol Hydroxylase Assay sowie mit Western Blot bewiesen werden konnte (Alexandre *et al.*, 1999). Hierbei ließ sich ein Anstieg der Aktivität bis Tag 2 und ein darauffolgenden Abfall bis Tag 7 sowie eine auf die Wachstumsphase von Tag 0 bis Tag 2 beschränkte Induzierbarkeit von CYP2E1 messen (Alexandre *et al.*, 1999). Damit lässt sich der Anstieg des p53 Signals in dieser Zelllinie begründen (vgl. Abb. 74). Die Effekte auf die p53 Proteinintensität waren in HepG2-CYP3A4 intensiver als in HepG2-CYP2E1 Zellen (vgl. Abb. 75, Abb. 77, Tab. 23). Aufgrund hoher Standardabweichungen waren die Ergebnisse jedoch nicht signifikant (s. Abb. 75). In HepG2-CYP2E1 sowie in HepG2-CYP3A4 Zellen war ein deutlicher Anstieg des γH2AX Proteinlevels messbar, während die Effekte in HepG2 und in HepG2-CYP1A2 wesentlich geringer ausgeprägt waren (vgl. Abb. 74 – 77, Tab. 23). Die in HepG2-CYP2E1 aufgetretenen Effekte korrellieren mit Studien von Seo *et al.*, in welchen die Aktivierung der γH2AX Proteinintensität in metabolisch kompetenten 3D HepaRG Spheroiden nach Behandlung mit NDMA nachweisbar war (Seo *et al.*, 2023). Auch in Studien von Carlsson *et al.* wurde eine durch NDMA getriggerte Induktion des γH2AX Proteinlevels nach 2 h in HepG2-CYP2E1 Zellen mittels konfokaler Mikroskopie demonstriert (Carlsson *et al.*, 2025). 10

mM NDMA führten zu einer um knapp 2.6 fach gesteigerten Anzahl an γH2AX-Foci in HepG2-CYP2E1 Zellen (Carlsson *et al.*, 2025). Die Abhängigkeit der Induktion einer DNA Schadensantwort von der metabolischer Kompetenz des verwendeten Zellsystems kann anhand eines statistisch signifikante Anstiegs beider Proteine nach Behandlung mit dem strukturell ähnlichen Nitrosamin NDEA in TK6 Zellen, die CYP2A6 exprimieren, verdeutlicht werden (Li *et al.*, 2022). Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse passen auch zu Studien in HepG2 Zellen, in welchen NDMA in Konzentrationen von 0.000492 µmol – 0.492 µmol nach 24 h Inkubation keinen Effekt auf das Proteinlevel von γH2AX hatte (Dong *et al.*, 2022). NDMA induziert nach metabolischer Aktivierung neben N7-MeG Addukten N3-MeA Addukte und O^6-MeG Addukte, die Substrate der BER sind und im weiteren Verlauf zur Aktivierung von γH2AX führen können (Fahrer *et al.*, 2015; Kay *et al.*, 2021; Fahrer *et al.*, 2023). Die Bedeutung der BER an den durch NDMA hervorgerufenen Effekten konnte von Kay *et al.* in AAG profizienten sowie in AAG defizienten Mäusen demonstriert werden (Kay *et al.*, 2021). Diese sind hauptsächlich auf durch NDMA induzierte N3-MeA Addukte zurückzuführen (Kay *et al.*, 2021). Die durch die AAG entstehenden Einzelstrangbrüche im Zuge der Exzision von N3-MeA Addukten induzieren in diesem Zusammenhang zytotoxische Effekte durch die Entstehung von abasischen Stellen (Kay *et al.*, 2021). In der Folge kommt es zur Aktivierung von γH2AX, wobei für AAG überexprimierende Mäuse ein im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich intensiverer Anstieg des γH2AX Signalintensität nach Behandlung mit NDMA nachgewiesen werden konnte als für AAG defiziente oder AAG Wildtyp Mäuse (Kay *et al.*, 2021; Calvo *et al.*, 2012; Alloca *et al.*, 2017; Alloca *et al.*, 2019). Ferner konnte in MGMT defizienten Mäusen gezeigt werden, dass O^6-MeG, welches von *N*-Nitrosoverbindungen wie NDMA induziert wird, zur γH2AX Aktivierung führen kann (Fahrer *et al.*, 2015). Diese Studien stehen mit dem in dieser Arbeit ermittelten, durch NDMA induzierten Anstieg des γH2AX Proteinlevels in HepG2-CYP3A4 und in HepG2-CYP2E1 Zellen in Einklang (vgl. Abb. 74 – 77, Tab. 23).

5.7.2 Effekt von NDELA

In HepG2 Zellen war der konzentrationsabhängige Anstieg nach Behandlung mit NDELA auf das p53 Proteinlevel beschränkt, wobei hohe Standardabweichungen bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen (s. Abb. 78, s. Tab. 23). Aufgrund statistischer Signifikanz können hierbei substanzassoziierte Effekte angenommen werden (vgl. Abb. 78). In Studien von Alexandre *et al.* konnte gezeigt

werden, dass HepG2 Zellen CYP2E1 Proteinaktivität aufweisen, weshalb eine metabolische Umsetzung von NDELA in dieser Zelllinie stattfinden kann (Alexandre *et al.*, 1999). Dies würde die in dieser Arbeit detektierten Effekte erklären (s. Abb. 78, Tab. 23).
In HepG2-CYP3A4 Zellen war der Einfluss von NDELA auf das Level beider Proteine schwach, was anhand eines maximalen Anstiegs von p53 um 1.5 im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt werden konnte (s. Abb. 79, Tab. 23). In HepG2-CYP1A2 Zellen konnte ein eindeutiger Effekt von NDELA auf die zellulären Level der beiden Proteine detektiert werden (s. Abb. 80, Tab. 23). In HepG2-CYP2E1 Zellen hatte NDELA induzierende Effekte auf die Signalintensitäten von p53 und γH2AX, wobei ein konzentrationsabhängiger Trend auftrat (s. Abb. 81). Dennoch konnte für keine der Testkonzentrationen statistische Signifikanz festgestellt werden (Abb. 81). Verglichen mit NDMA war der durch NDELA induzierte Effekt auf die γH2AX Proteinintensität etwas schwächer ausgeprägt, während NDELA einen intensiveren Effekt auf das p53 Proteinlevel hatte (vgl Abb. 77, Abb. 81, Tab. 23). Die Induktion deutlicherer Effekte durch NDMA konnte in Studien, in welchen die Mutationsrate am Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) Genlokus in V79 Zellen, die mit HepG2-CYP2E1 transfiziert wurden, untersucht wurde, gezeigt werden (Liu *et al.*, 2008). Hier war die messbare Mutationsrate nach Behandlung mit der höchsten Testkonzentration NDELA 7.5-fach geringer als nach Behandlung mit der höchsten Testkonzentration NDMA, die mehr als 100-fach geringer als die eingesetzte NDELA Konzentration war (Liu *et al.*, 2008). Mögliche Ursache für die Unterschiede zwischen den vier Zelllinien hinsichtlich induzierender Effekte auf die relativen Proteinintensitäten von p53 und γH2AX könnte in der CYP2E1 Aktivität liegen. Die in HepG2-CYP2E1 Zellen festgestellten Effekte auf beide Proteine stehen in Einklang mit der vorhandenen Proteinaktivität von CYP2E1, die in dieser Zelllinie innerhalb dieser Arbeit nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 58, Abb. 80, Abb. 81).

5.7.3 Effekt von S-NNN

In HepG2 Zellen führte S-NNN zu einem Anstieg der Proteinintensitäten von p53 und γH2AX (vgl. Abb. 82). Dabei war das Ausmaß des Effektes auf beide Proteine gleich, erkennbar anhand eines Anstiegs um 1.9 im Vergleich zur Negativkontrolle (vgl. Abb. 82, Tab. 23). In HepG2-CYP3A4 Zellen ließen sich keine vergleichbaren Effekte auf die Signalintensitäten p53 und γH2AX durch S-NNN belegen (s. Abb. 83, Tab. 23).

Behandlung mit S-NNN führte in HepG2-CYP1A2 Zellen zu einem starken, jedoch nicht signifikanten Anstieg des p53 Proteinlevels in konzentrationsabhängiger Weise, wobei das γH2AX Level nahezu unbeeinflusst blieb (s. Abb. 84). In HepG2-CYP2E1 Zellen hatte S-NNN einen induzierenden Effekt auf beide Proteine, der mit einem Anstieg des p53 Signals um 1.9 im Vergleich zur Negativkontrolle maximal war (s. Abb. 85, Tab. 23). Aufgrund der Studien von Patten und Coautoren, die eine Beteiligung von CYP3A4 an der metabolischen Aktivierung von NNN nachweisen konnten, wären größere Effekte auf die die Proteinlevel von p53 und γH2AX in HepG2-CYP3A4 Zellen zu erwarten (vgl. Abb. 83, Patten *et al.*, 1997). So wurde in Studien von Patten *et al.* eine CYP3A4 vermittelte metabolische Umsetzung von S-NNN in humanen Lebermikrosomen nach 2'-Hydroxylierung am α-C-Atom demonstriert (Patten *et al.*, 1997). Eine metabolische Aktivierung von S-NNN hat die Bildung sperriger Addukte wie beispielsweise Pyridyloxobutyladdukte nach 2'-Hydroxylierung sowie Py-Py-dI Addukte nach 5'-Hydroxylierung zur Folge, die aufgrund ihrer Komplexität Substrate der NER sind und aufgrund ihrer replikationsblockierenden Eigenschaften die DNA-Schadensantwort aktivieren können (Zarth *et al.*, 2016; Fahrer *et al.*, 2023). Für NNN ist jedoch bekannt, dass es organspezifisch wirkt (Li *et al.*, 2022). So konnte gezeigt werden, dass hepatische Mikrosomen höhere K_M-Werte für die α-Hydroxylierung aufweisen als im Ösophagus lokalisierte Mikrosomen, was geringere enzymatischen Affinität hepatischer Enzyme begründet und als Erklärung für die schwachen Effekte in HepG2-CYP3A4 Zellen herangezogen werden kann (vgl. Abb. 83, Tab. 23, Li *et al.*, 2022). Unterschiede in der Konzentration sowie Proteinaktivität der an der metabolischen Aktivierung von S-NNN beteiligten Enzyme CYP3A4 und CYP2A6 zwischen den Zelllinien können die variablen Effekte auf die Proteinintensitäten von p53 und γH2AX erklären.

5.8 Untersuchung der Genotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 mittels Comet Assay

5.8.1 Effekt von NDMA

NDMA führte in HepG2 und in HepG2-CYP3A4 Zellen zu DNA-strangbruchinduzierenden Effekten (Abb. 86, Tab. 24). Die Effekte waren im Wildtyp ab mittleren Konzentrationen statistisch signifikant (s. Abb. 86 A, Tab. 24). In HepG2-CYP3A4 konnte ein zweifacher

Anstieg des Schweifintensitätsunterschiedes im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen werden (vgl. Tab. 24). In HepG2-CYP1A2 Zellen ließ sich kein strangbruchinduzierender Effekt nach Behandlung mit NDMA feststellen (vgl. Abb. 87 A). In HepG2-CYP2E1 Zellen traten nach Behandlung mit NDMA deutliche strangbruchinduzierende Effekte auf, die nach Inkubation mit 10 mM statistisch signifikant waren (s. Abb. 87 B). Der maximale Schweifintensitätsunterschied im Vergleich zur Negativkontrolle war in HepG2-CYP2E1 Zellen mit 7.8 größer als in PRH (3.7), was auf eine höhere Sensitivität dieser Zelllinie gegenüber NDMA induzierter DNA-Strangbruchschäden verweist (vgl. Abb. 37 A, Abb. 87 B). CYP2E1 und CYP2A6 katalysieren die metabolische Aktivierung von NDMA durch α-Hydroxylierung (Yamazaki *et al.*, 1992). Entstehende Methyldiazoniumionen können die DNA alkylieren und zur Entstehung von N7-MeG, N3-MeA und O^6-MeG führen (Den Engelse *et al.*, 1986). Die Daten korrellieren mit Studien von Carlsson *et al.,* die nach 2 h Inkubation statistisch signifikante, strangbruchinduzierende Effekte von NDMA in HepG2-CYP2E1 Zellen demonstrieren konnten (Carlsson *et al.*, 2025). In HepG2 Zellen hingegen ließ sich kein signifikanter Anstieg der Schweifintensität messen, womit sich die Bedeutung von CYP2E1 zur Induktion genotoxischer Schäden von NDMA demonstrieren ließ (Carlsson *et al.*, 2025). Aufgrund geringer O^6-MeG-Adduktlevel nach Behandlung mit NDMA für 2 h sind strangbruchinduzierende Effekte in HepG2-CYP2E1 Zellen auf N7-MeG und N3-MeA zurückzuführen, welche Substrate der BER sind (Carlsson *et al.*, 2025). Die Prozessierung dieser Addukte führt im weiteren Verlauf zu Einzelstrangbruchintermediaten, die mittels alkalischem Comet Assay detektierbar sind (Carlsson *et al.*, 2025; Gates *et al.*, 2004; Demple *et al.*, 2005; Ngo *et al.*, 2020). CYP2E1 Proteinaktivität in HepG2 Zellen konnte in Studien von Alexandre *et al.* demonstriert werden, was die im Wildtyp aufgetretenen Effekte erklären kann (vgl. Abb. 86 A, Alexandre *et al.*, 1999). In Studien von Seo *et al.* konnten strangbruchinduzierende Effekte in PHHs sowie in PMHs nachgewiesen werden (Seo *et al.*, 2025). Im CometChip Assay führte die Behandlung von PHHs mit 1.25 mM NDMA nach 24 h zu einem Schweifintensitätsunterschied von 15.4 im Vergleich zur Negativkontrolle, während in PMHs ein Schweifintensitätsunterschied von 11 ermittelt wurde (Seo *et al.,* 2025). Damit sind die verwendeten Zellmodelle sensitiver als die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten HepG2 Zelllinien (vgl Abb. 86, 87, Tab. 24, Seo *et al.*, 2025). In 2D HepaRG Zellen waren die von NDMA strangbruchinduzierenden

Effekte nach 24 h etwas schwächer ausgeprägt als in HepG2-CYP2E1 Zellen (Seo *et al.*, 2023, Abb. 87 B). In diesem Zusammenhang führte 10 mM NDMA im CometChip Assay nach 24 h Inkubation zu einem Schweifintensitätsunterschied von 4.6 im Vergleich zur Negativkontrolle (Seo *et al.*, 2023). Der in HepG2 Zellen nach 24 h Inkubation mit 10 mM NDMA feststellbare Schweifintensitätsunterschied von 1.2 im Vergleich zur Negativkontrolle war von ähnlicher Ausprägung wie der in HepG2-CYP1A2 Zellen ermittelte Schweifintensitätsunterschied (Seo *et al.*, 2019, Kap. 4.8.9, Tab. 24, Abb. 87 A). Der in 3D HepaRG Spheroiden nach 24 h Behandlung mit 625 µM NDMA ermittelte Schweifintensitätsunterschied lag bei 6.1 im Vergleich zur Negativkontrolle und war damit vergleichbar mit den in HepG2-CYP2E1 Zellen erhobenen Daten (vgl. Abb. 87 B, Seo *et al.*, 2023). Mögliche Ursache für die unterschiedlichen DNA-Strangbruchlevel in HepG2, HepG2-CYP3A4, HepG2-CYP1A2 und HepG2-CYP2E1 Zellen sind variable Konzentrationen und Proteinaktivitäten von CYP2E1 sowie CYP2A6, die die metabolische Aktivierung von NDMA katalysieren.

5.8.2 Effekt von NDELA

In HepG2, HepG2-CYP3A4 und in HepG2-CYP1A2 Zellen waren strangbruchinduzierende Effekte nach Behandlung mit NDELA detektierbar (s. Abb. 88, 89 A, Tab. 24). In HepG2-CYP2E1 Zellen war der durch NDELA induzierte Effekt deutlicher ausgeprägt, jedoch im Vergleich zu NDMA gering und nicht statistisch signifikant (s. Abb. 89 B, Tab. 24). NDELA wird durch CYP2E1 metabolisch aktiviert und induziert sowohl Monoaddukte durch OHEdG als auch crosslinks durch gdG-Addukte (Loeppky, Chen *et al.*, 2002; Dennehy *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009, Carlsson *et al.*, 2025). Dieses gemischte Schadensmuster könnte erklären, weshalb das durch NDELA induzierte Strangbruchlevel in HepG2-CYP2E1 geringer war als nach Exposition gegenüber NDMA (Carlsson *et al.*, 2025). Die innerhalb dieser Arbeit in PRH erhobenen strangbruchinduzierenden Effekte von NDELA sind vergleichbar mit den in HepG2-CYP2E1 Zellen ermittelten Effekten (vgl. Abb. 46, Tab. 20). In Studien von Carlsson *et al.*, wurde der strangbruchinduzierende Effekt von NDELA in HepG2 und In HepG2-CYP2E1 Zellen ermittelt (Carlsson *et al.*, 2025). Nach 2 h ließen sich strangbruchinduzierende Effekte in beiden Zelllinien nachweisen (Carlsson *et al.*, 2025). Nach 2 h waren die in HepG2-CYP2E1 Zellen ermittelten, strangbruchinduzierenden Effekte intensiver ausgeprägt als in HepG2 Zellen (Carlsson *et al.*, 2025). Die erhobenen Daten demonstrieren die Bedeutung von CYP2E1 für die

metabolische Aktivierung von NDELA (vgl. Abb. 89 B, Tab. 24). Die Rolle von CYP2E1 an der metabolischen Aktivierung von NDELA und im Zuge dessen induzierter DNA-Strangbrüche konnte auch in Studien von Loeppky *et al.* sowohl *in vivo* in Rattengewebe als auch in mit CYP2E1 transfiszierten V79 Zellen gezeigt werden (Loeppky *et al.*, 1998). Mögliche Ursache für die geringeren strangbruchinduzierenden Effekte von NDELA in HepG2, HepG2-CYP3A4 und HepG2-CYP1A2 Zellen sind im Vergleich zu HepG2-CYP2E1 Zellen geringere bzw. nicht vorhandene Proteinkonzentrationen und Aktivitäten von CYP2E1.

5.8.3 Effekt von S-NNN

S-NNN führte zu keinen ausgeprägten strangbruchinduzierenden Effekten in den untersuchten Zelllinien (vgl. Abb. 91, Abb. 92). Die in den HepG2 Zelllinien ermittelten Daten korrelieren mit den in dieser Arbeit in PRH erhobenen, schwachen Schweifintensitätsunterschieden im Vergleich zur Negativkontrolle, die nach Behandlung mit S-NNN auftraten (vgl. Abb. 48 B, Tab. 20). Eine Ursache für das Ausbleiben von strangbruchinduzierenden Effekten kann einerseits an unzureichenden Proteinaktivitäten der an der Metabolisierung von NNN beteiligten CYP Enzyme, die in Studien von Patten und Coautoren identifiziert werden konnten, CYP3A4 und CYP2A6, in den Leberzelllinien liegen (vgl. Abschnitt 4.5, Abb. 58, Patten *et al.*, 1997). Weitere Erklärung für das Ausbleiben strangbruchinduzierender Effekte kann in organspezifischen Differenzen im Hinblick auf Häufigkeit und Affinität der an der metabolischen Aktivierung von NNN beteiligten CYP Enzyme liegen, was die Leber als gewähltes Targetorgan zur Detektion genotoxischer Effekte von NNN in Frage stellt (Djuari & Londenberg *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2022). In diesem Zusammenhang lässt sich die im Vergleich zur Ösophagustumorinzidenz geringe Lebertumorinzidenz mit Affinitätsunterschieden zwischen den an der α-Hydroxylierung von NNN beteiligten CYP Enzymen erklären, die für mikrosomale, im Ösophagus der Ratte lokalisierte Enzyme höher ist als für die in der Leber lokalisierten Enzyme (Li *et al.*, 2022). Weiteres Targetorgan von NNN für die metabolische Aktivierung und mutagene sowie karzinogene Effekte stellen Mundhöhle und Nasenhöhle dar (Balbo *et al.*, 2013; Djuari & Londenberg *et al.*, 2023). Infolge der 2'-Hydroxylierung können Pyridyloxobutyladdukte wie O^2-[4-(3 pyridyl)-4-oxobut-1-yl]-2-deoxythymidine) (O^2-pobT), gebildet werden, die aufgrund ihrer sperrigen Natur Substrate der NER darstellen (Li *et al.*, 2009; Zarth *et al.*, 2016; Fahrer *et*

al., 2023). Mithilfe des alkalischen Comet Assays lassen sich jedoch größteinteils Strangbrüche, welche die DNA-Migration auf direktem Weg inhibieren, detektieren, was als eine weitere Erklärung für die schwachen Effekte in den HepG2 Zelllinien herangezogen werden kann (vgl. Tab. 24, Ngo *et al.*, 2020). Zur Detektion sperriger Addukte mittels Comet Assay können NER Inhibitoren wie Hydroxyurea (HU) oder 1-β-D-arabinofuranosyl cytosine (AraC) verwendet werden, die die Präsenz der kurzlebigen NER Intermediate verlängern (Ngo *et al.*, 2020). Weitere Studien unter Verwendung eines modifizierten Comet Assay Protokolls wären zur Aufklärung der durch S-NNN in den verwendeten Leberzellmodellen induzierten, genotoxischen Effekte sinnvoll.

5.8.4 Effekt von NMA in mit H_2O_2 nachbehandelten HepG2-CYP2E1 Zellen

NMA führte in HepG2-CYP2E1 Zellen zur Reduktion der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 92 A, Tab. 24). Dieser Effekt ist auch anhand der repräsentativen Comet Aufnahmen erkennbar (s. Abb. 92 B). NMA scheint einen von Strangbruchschäden abweichenden, alternativen Schadensmechanismus zu induzieren (vgl. Abb. 92, Tab. 24). Verlangsamte elektrophoretische Wanderung der DNA kann durch deren Quervernetzung verursacht werden (Merk *et al.*, 1999). Zur Detektion eines solchen Effektes im Comet Assay dient die Festlegung der reduzierten Migration im Vergleich zu einer strangbruchinduzierenden Kontrollsubstanz wie H_2O_2, welche durch Oxidation von DNA-Basen Strangbrüche hervorruft (Merk *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2001; Bankoglu *et al.*, 2021). Als Positivkontrolle wird eine Substanz wie beispielsweise MMC verwendet, die bekanntermaßen zu cross-links der DNA führt und damit zum Vergleich der durch die Testsubstanz hervorgerufenen Effekte herangezogen werden kann (s. Abb. 92, Tab. 24, Warren *et al.*, 1998). CYP2E1 katalysiert die metabolische Aktivierung von NMA durch α-Hydroxylierung (Quan *et al.*, 1992). Auch in Studien von Carlsson *et al.* konnte die metabolische Aktivierung von NMA durch CYP2E1 demonstriert werden (Carlsson *et al.*, 2025). Es existieren Daten, die die Bildung eines Benzendiazoniumions Ions (BDI) nach CYP2E1 katalysierter α-Hydroxylierung von NMA belegen, welches in der Folge Addukte mit Adenin bildet (Koepke *et al.*, 1990; Kroeger-Koepke *et al.*, 1981; Carlsson *et al.*, 2025). Die durch BDI gebildeten Monoaddukte allein können jedoch den Rückgang der im Comet Assay erfassten Schweifintensität nicht erklären (Carlsson *et al.*, 2025). Basierend auf einer Studie von Latriano *et al.*, in welcher die Bildung eines Muconaldehyds aus Benzen in Lebermikrosomen aus der Mausspezies nachgewiesen werden konnte, besteht die

Annahme, dass BDI nach Konversion zum Muconaldehyd zur Quervernetzung der DNA führt (Latriano *et al.*, 1986). Dieser Hypothese zufolge wird der durch BDI Monoaddukte erzeugte Strangbruchschaden durch die quervernetzenden Eigenschaften der α, β-ungesättigte Verbindung überdeckt (Carlsson *et al.*, 2025). Dennoch sind weitere Studien notwendig, um diese Vermutung zu belegen.

5.8.5 Effekt von NDELA in mit H_2O_2 nachbehandelten HepG2-CYP2E1 Zellen

NDELA führte zur leichten Abnahme der Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle H_2O_2 um - 1.4 (vgl. Abb. 93, Tab. 24). Der Effekt war jedoch im Vergleich zur reduzierten DNA-Migration nach NMA Behandlung von deutlich geringerem Ausmaß (vgl. Abb. 92, Abb. 93, Tab. 24). Mögliche Ursache für den beobachteten Rückgang der Schweifintensität infolge reduzierter Migration kann das quervernetzende gdG-Addukt, das von NDELA nach metabolischer Aktivierung erwiesenermaßen entsteht, sein (Dennehy *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009; Carlsson *et al.*, 2025). Der im Vergleich zu NMA schwächer ausgeprägte Rückgang der Schweifintensität könnte auf das 2-Hydroxyethyldiazoniumion, welches nach CYP2E1 vermittelter metabolischer Aktivierung OHEdG-Monoaddukte bildet, zurückzuführen sein (Dennehy *et al.*, 2005). Dieses gemischte Muster, bestehend aus DNA-Monaddukten sowie DNA-Quervernetzung könnte erklären, weshalb die nach Behandlung mit NDELA messbare Schweifintensität im Bereich zwischen den durch NDMA sowie den durch NMA hervorgerufenen Effekten liegt (Carlsson *et al.*, 2025). Weitere Analysen sind für die Bestätigung dieser Hypothese erforderlich.

5.9 Vergleichende Untersuchung der Genotoxizität strukturell verschiedener *N*-Nitrosamine in HepG2 und in HepG2-CYP2E1 und Einfluss der MGMT mittels Comet Assay

5.9.1 Effekt von NDMA

NDMA führte nach 72 h zu keiner Abnahme der Zellviabilität in HepG2 Zellen (Carlsson *et al.*, 2025). Nach 72 h hatte die Behandlung mit NDMA in HepG2-CYP2E1 Zellen eine leichte, nicht signifikanten Reduktion der Zellviabilität zur Folge (Carlsson *et al.*, 2025). Die Bedeutung von CYP2E1 für die metabolische Aktivierung von NDMA konnte damit belegt werden (Carlsson *et al.*, 2025). In HepG2 Zellen führte NDMA zu keinen

signifikanten, strangbruchinduzierenden Effekten (vgl. Abb. 94 A). NDMA führte in zeit-, und konzentrationsabhängiger Weise zu statistisch signifikanten DNA-Strangbrüchen in HepG2-CYP2E1 Zellen nach 24 h (s. Abschnitt 4.9.1, Abb. 94 A). In HepG2-CYP2E1 Zellen erzeugte NDMA strangbruchinduzierende Effekte von erheblich deutlicherem Ausmaß, was erneut auf die Bedeutung des CYP2E1 Enzyms für die metabolische Aktivierung verweist (vgl. Abb. 94 A, Tab. 25). In diesem Zusammenhang lag der maximale Schweifintensitätsunterschied nach Behandlung mit 1 mM bei 3.8, während für HepG2 Zellen ein maximaler Schweifintensitätsunterschied von 1.4 im Vergleich zur Negativkontrolle gemessen werden konnte (vgl. Abb. 94 A, Tab. 25). In den repräsentativen Comet Aufnahmen beider Zelllinien werden Unterschiede in Bezug auf das durch NDMA hervorgerufene Schadensausmaß deutlich (s. Abb. 94 B, C). Die in HepG2 Zellen erhobenen Ergebnisse stehen in Einklang mit Studien von Valentin-Severin *et al.*, in welchen eine im Vergleich zur Negativkontrolle zweifach erhöhte Schweifintensität im Wildtyp erst nach Behandlung mit 27 mM NDMA nachgewiesen werden konnte (Valentin-Severin *et al.*, 2003). Damit lässt sich bestätigen, dass für NDMA die Induktion genotoxischer Effekte von der CYP2E1 vermittelten metabolischen Aktivierung abhängig ist (vgl. Abb. 94). Dies konnte auch in Studien von Seo *et al.*, in welchen für 3D HepaRG Spheroide im Vergleich zu 2D HepaRG Zellen höhere CYP2E1 Expression und damit einhergehende, deutlichere maximale Schweifintensitätsunterschiede im 3D HepaRG Zellmodell nach Behandlung mit NDMA demonstriert werden konnten (Seo *et al*, 2023). In einer weiteren Studie von Seo und Coautoren ließen sich in HepG2 Zellen keine Strangbruchschäden nach NDMA Behandlung feststellen, was mit den innerhalb dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen korrelliert (Seo *et al.*, 2019). Gleichzeitig konnte durch den Anstieg der Schweifintensität nach MGMT-Inhibition gezeigt werden, dass DNA-Schäden teilweise auf die Bildung von O^6-MeG-Addukten zurückgeführt werden können und dass dieses Enzym an der Reparatur induzierter Schäden beteiligt ist (vgl Abb. 94 A). Im Vergleich zur 24 h Inkubation waren die Effekte nach 2 h intensiver ausgeprägt, was auf die Einleitung von DNA-Reparaturmechanismen hindeutet (s. Abb. 86 A, 87 B, 94 A, Tab. 25). In Studien von Carlsson *et al.* ließen sich nach 24 h wesentlich höhere O^6-MeG- Adduktlevel messen als nach 2 h (Carlsson *et al.*, 2025). Die nach 2 h detektierten Strangbruchschäden sind folglich nicht auf O^6-MeG-Addukte zurückzuführen (Carlsson *et al.*, 2025, vgl. Abb. 88 B,

Tab. 25). Vielmehr können die im Vergleich zum 24 h Zeitpunkt höheren Schweifintensitäten nach 2 h auf BER vermittelte Reparatur von N3-MeA-, und N7-MeG-Addukten zurückgeführt werden (Carlsson *et al.*, 2025, Abb. 86 A, 87 B, 94 A, Tab. 25). Im Verlauf der BER kommt es nach APE vermittelter Exzision dieser N-Alkyladenin-Addukte zur Entstehung apuriner Stellen (Carlsson *et al.*, 2025; Gates *et al.*, 2004).

Danach erfolgt die Prozession durch die AP-Endonuklease-1, die die Inzision des DNA-Rückgrates katalysiert, was zur Entstehung von Einzelstrangbrüchen führt (Demple *et al.*, 2005; Ngo *et al.*, 2020). Diese sind im alkalischen Comet Assay detektierbar (Ngo *et al.*, 2020). Die im Vergleich zum 24 h Zeitpunkt höheren O^6-MeG-Adduktlevel, die in Studien von Carlsson *et al*. nachgewiesen werden konnten, sind vermutlich auf eine kontinuierliche Substrataufnahme und CYP2E1 vermittelte, metabolische Aktivierung von NDMA zurückzuführen (Carlsson *et al.*, 2025). Mit diesen Effekten sind die in HepG2-CYP2E1 durch NDMA induzierten DNA-Strangbruchschäden nach 24 h Inkubation sowie der DNA-strangbruchverstärkende Effekt des MGMT-Inhibitors O^6-BG erklärbar. Eine weitere Ursache für den zeitabhängigen Anstieg detektierter O^6-MeG-Adduktlevel könnte in der progressiven Inaktivierung der MGMT durch Reparatur von O^6-MeG-Addukten liegen, welche stöchiometrisch abläuft (Carlsson *et al.*, 2025; Pegg *et al.*, 2011). Die MGMT wird infolge der Inaktivierung proteosomal abgebaut und muss neu synthetisiert werden (Pegg *et al.*, 2011). Nicht reparierte O^6-MeG-Läsionen können nach Prozessierung durch die MMR-Reparatur zu DNA-Strangbrüchen führen (Fahrer *et al*., 2023; Carlsson *et al*., 2025; Mojas *et al*., 2007; Quiros *et al*., 2010). Dieser Effekt wird durch MGMT-Inhibition zusätzlich verstärkt (Carlsson *et al*., 2025; Ramos *et al*., 2013). So konnte durch Studien gezeigt werden, dass alkylierende Substanzen wie TMZ und MNNG zu persistierenden O^6-MeG-Addukten führen, welche DNA-Strangbrüche in einer Basenfehlpaarungs-, und replikationsassoziierten Weise induzieren (Mojas *et al.*, 2007; Quiros *et al.*, 2010). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der MGMT zu einem Anstieg der durch TMZ hervorgerufenen Schweifintensität in Basenfeehlpaarungsprofizienten humanen Kolonepithelzellen (HCEC) führt (Kostka *et al.*, 2021). Ferner konnte in Basenfehlpaarungsprofizienten Caco-2 Zellen ein Anstieg der DNA-Strangbruchlevel nach MGMT-Inhibition durch O^6-BG infolge der Inkubation mit *N*-Nitroso-*N*-methylurea (NMU) detektiert werden, während Effekte in

Basenfehlpaarungsdefizienten HCT116 Zellen vergleichsweise schwach ausgeprägt waren (Ramos *et al.*, 2013).

5.9.2 Effekte von NDELA und NMA

NDELA

NDELA führte nach 24 h erneut in konzentrationsabhängiger Weise zu signifikanten zytotoxischen Effekten in HepG2-CYP2E1 Zellen (vgl. Abb. 95). Zytotoxische Effekte nach 72 h waren von ähnlicher Ausprägung (s. Abb. 95). NDELA führte in HepG2 Zellen nach 72 h zu zytotoxischen Effekten , die jedoch nicht statistisch signifikant waren (vgl. Abb. 95). Die Bedeutung von CYP2E1 für die metabolische Aktivierung von NDELA und der damit einhergehenden Induktion zytotoxischer Effekte konnte damit bestätigt werden (vgl. Abb. 95, Carlsson *et al.*, 2025). Die im Vergleich zu HepG2-CYP2E1 wesentlich schwächer ausgeprägte Zytotoxizität ist mit der im Vergleich zu humanen Mikrosomen um 80 % reduzierten CYP2E1 Aktivität in HepG2 Zellen zu begründen (vgl. Abb. 95, Roe *et al.*, 1993). In CYP2E1 transfiszierten Hamster Fibroblasten wurde der Zusammenhang zwischen CYP2E1 katalysierter metabolischer Aktivierung von NDELA und Zytotoxizität festgestellt (Loeppky *et al.*, 1998). In diesem Zellmodell traten zytotoxische Effekte nach Behandlung mit Konzentrationen > 20 mM auf (Loeppky *et al.*, 1998). CYP2E1 transfiszierte Hamsterfibroblasten waren entsprechend weniger sensitiv als HepG2-CYP2E1 Zellen (vgl. Abb. 95, Loeppky *et al.*, 1998). In Übereinstimmung mit Studien in CYP2E1 transfiszierten V79 Zellen und PRHs, in welchen NDELA nach 4 h und Konzentrationen ≥ 10 mM Strangbruchinduktion hervorrief, konnten im Rahmen dieser Arbeit in HepG2-CYP2E1 Zellen nach 2 h und ab Konzentrationen von 1 mM ein konzentrationsabhängiger Anstieg von DNA-Strangbrüchen gemessen werden (vgl. Abb. 96 A, Loeppky *et al*, 1998). Eine Verstärkung der von NDELA induzierten Effekte nach Behandlung mit höheren Konzentrationen sowie statistische Signifikanz trat nach 24 h ein (s. Abb. 97 A). Der MGMT-Inhibitor hatte keinen Effekt auf induzierte Strangbrüche weshalb der Rückschluss nahe liegt, dass dieses Enzym keine Hauptrolle an der Reparatur der von NDELA hervorgerufenen Addukte und den assoziierten Strangbruchschäden hat. NDELA induziert erwiesenermaßen OHEdG-Addukte, auf welche sich die detektierten Strangbruchschäden zurückführen lassen (Dennehy *et al.*, 2005, Loeppky, Chen *et al.*, 2002, Carlsson *et al.*, 2025). Dieses ist wie O^6-MeG Substrat

der MGMT, wobei die Affinität allerdings vergleichweise gering ist (Coulter *et al.*, 2007). Darüberhinaus konnte in *E.coli* gezeigt werden, dass dieses Addukt ein Substrat der NER ist (Mazon *et al.*, 2009). Zur Detektion von NER-Einzelstrangbruchintermediaten wäre die Messung nach Inkubationszeiträumen < 2 h ideal, da diese sehr kurzlebig sind (Djuari & Londenberg *et al.*, 2019; Ngo *et al.*, 2020). Zudem wird durch NDELA gdG induziert, welches sowohl Monoaddukte als auch crosslinks bilden kann (Chen *et al.*, 2009). Dieses gemischte Adduktspektrum könnte Erklärung für die im Vergleich zu NDMA geringer ausgeprägten Strangbruchschäden sein (Carlsson *et al.*, 2025). Dies demonstriert die Bedeutung von CYP2E1 für die metabolische Aktivierung von NDELA (Carlsson *et al.*, 2025).

NMA

NMA hatte keinen strangbruchinduzierenden Effekt in HepG2 und in HepG2-CYP2E1 Zellen nach 2 h Inkubation (vgl. Abb. 96 B). Dies konnte auch anhand der repräsentativen Comet Aufnahmen festgestellt werden (s. Abb. 96 E, F). Nach 24 h ließ sich in mit NMA behandelten HepG2 und HepG2-CYP2E1 Zellen kein Anstieg der medianbasierten Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle feststellen (vgl. Abb. 97 B). Das Ausbleiben erhöhter Schweifintensitäten im Wildtyp und in HepG2-CYP2E1 Zellen nach Behandlung mit NMA nach 2 h und nach 24 h korrelliert mit Studien von Seo und Coautoren, in denen NMA keine DNA-Strangbrüche in HepaRG Zellen hervorrief (vgl. Abschnitte 4.9.1 und 4.9.2, Abb. 96 B, 97 B, Seo *et al.*, 2023). Auch anhand der repräsentativen Comet Aufnahmen konnten nach 24 h keine strangbruchinduzierenden Effekte von NMA beobachtet werden (vgl. Abb. Abb. 97 E, F). In 3D HepaRG Spheroiden hingegen führte NMA ab Konzentrationen > 3 mM zu 2-fach erhöhter Schweifintensität im Vergleich zur Negativkontrolle nach 24 h Inkubation (Seo *et al.*, 2023). Eine mögliche Erklärung sind höhere Proteinaktivitäten von an der metabolischen Aktivierung von NMA beteiligten Enzymen wie CYP2E1 in 3D HepaRG Spheroiden im Vergleich zu den von Seo verwendeten 2D HepaRG Zellen (Seo *et al.*, 2023). Demzufolge liegt nahe, dass die Proteinaktivität von CYP2E1 in den innerhalb dieser Arbeit verwendeten HepG2 und HepG2-CYP2E1 Zellen ebenfalls geringer ist als in den 3D HepaRG Zellen (vgl. Abb. 58, Seo *et al.*, 2023). Auch eine im Vergleich zu HepG2 Zellen und 2D HepaRG Zellen effektivere, zelluläre Substrataufnahme der HepaRG Spheroide könnte dieses Resultat begründen. Weiterhin sind Differenzen der an der Aktivierung und Detoxifizierung von

NMA beteiligten CYP Enzyme hinsichtlich Art und Aktivität zwischen 3D HepaRG Speroiden und HepG2 Zellen denkbar. Für NMA gibt es Studien, die die CYP2E1 vermittelte α-Hydroxylierung zu BDI demonstrieren, das N^6-Adeninaddukte bilden kann (Quan *et al.*, 1992; Kroeger-Koepke *et al.*, 1981; Stiborová *et al.*, 1995; Stiborová *et al.*, 1999). Für dieses ist DNA-Quervernetzung unwahrscheinlich, was auf einen alternativen Mechanismus Aktivierungsweg von NMA zur Erklärung der schwachen Schweifintensitäten hindeutet. In der Literatur existieren in diesem Zusammenhang Daten, die die Konvertierung von Benzen in Muconaldehyd beschreiben, weshalb die Vermutung nahe liegt, dass das strukturell ähnliche BDI auch zu Muconaldehyd verstoffwechselt werden kann (Latriano *et al.*, 1986, Carlsson *et al.*, 2025). Diese α, β-ungesättigte Verbindung könnte zur Quervernetzung der DNA führen (Carlsson *et al.*, 2025). Die Maskierung strangbruchinduzierende Effekte von NMA durch Bildung von DNA-crosslinks würden die innerhalb dieser Arbeit detektierten, geringen Schweifintensitäten im Vergleich zur Negativkontrolle erklären (vgl. Abb. 96 B, 97 B).

5.10 Vergleichende Untersuchung der Genotoxizität von NDMA in HepG2 und in HepG2-CYP2E1 mittels Mikrokern Assay

Mit dem Mikrokerntest wurde ein weiterer Endpunkt zur Untersuchung genotoxischer Eigenschaften von NDMA gewählt (vgl. Abschnitt 4.10). Zum Ausschluss zytotoxischer Effekte wurde hierfür zunächst ein Zellviabilitätstest durchgeführt (vgl. Abb. 98 A). Die Zellen wurden für 24 h mit NDMA behandelt. Die Messung der Zellviabilität erfolgte nach 72 Erholungszeit in substanzfreiem Medium (s. Abb. 98 A). In HepG2 Zellen traten keine zytotoxischen Effekte auf (s. Abb. 98 A). In HepG2-CYP2E1 Zellen war die durch NDMA verursachte Reduktion der Zellviabilität schwach ausgeprägt und entsprach der Vorraussetzung der OECD Testrichtlinie, die zum Ausschluss unspezifischer Effekte eine Zytotoxizität von höchstens 55 ± 5 % fordert (vgl. Abb. 98 A, OECD, 2023). In HepG2-CYP2E1 Zellen führte NDMA zu einem signifikanten Anstieg der Mikrokernrate im Vergleich zur Negativkontrolle (s. Abb. 98 B). MMC und Etoposid, die als Positivkontrollen dienten, erzeugten in Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur Mikrokerne, ohne Überschreitung des OECD Kriteriums bezüglich der maximalen Zytotoxizität (vgl. Abb. 98 A, 98 B, OECD, 2023. Die Entstehung von Mikrokernen nach Behandlung mit NDMA und den Positivkontrollen ließ sich zudem in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mittels DAPI Färbung demonstrieren (s. Abb. 98 C). Im Wildtyp konnte ebenfalls die Bildung von

Mikrokernen gezeigt werden, die Effekte waren jedoch vergleichsweise gering und nicht signifikant (s. Abb. 98 B). Damit ließ sich demonstrieren, dass für klastogene Effekte von NDMA die CYP2E1 katalysierte, metabolischen Aktivierung Vorraussetzung ist (vgl. Abb. 98 B). Die in HepG2-CYP2E1 Zellen erhobenen Daten stehen in Einklang mit einer 28 Tage Studie in Ratten, in welcher die Entstehung von Mikrokernen mittels Durchflusszytometrischer Messung bestätigt wurde (Guo *et al.*, 2025). Darüberhinaus konnte eine Induktion der Mikrokernrate nach Behandlung mit 10 mM NDMA in HepG2-CYP2E1 in durchflusszytometrischen Studien von Carlsson *et al.* demonstriert werden (Carlsson *et al.*, 2025). Im Vergleich zur Negativkontrolle war die Mikrokernrate etwa dreifach erhöht und damit von sehr ähnlicher Ausprägung wie die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse (vgl. Abb. 98 B, Carlsson *et al.*, 2025). Zudem korrellieren die Daten mit einer Studie von Seo *et al.*, in welcher die Mikrokernrate nach 72 h in 3D HepaRG Spheroiden mit hoher CYP2E1 Aktivität als nach NDMA Behandlung intensiver ausgeprägt war als in 2D HepaRG Zellen mit im Vergleich zum 3D HepaRG Zellmodell geringerer CYP2E1 Aktivität (Seo *et al.*, 2024). Die Effekte von MMC korrellieren mit einer Studie von Yasui und Coautoren, in welcher Mikrokern Formation in der humanen Lymphoblastoid Zelllinie T105GTCH Zellen nachgewiesen wurde (Yasui *et al.*, 2010). Die von Etoposid erzeugten Mikrokerne in HepG2 und HepG2-CYP2E1 Zellen stehen in Einklang mit Studien von Mukherjee, in welchen der mikrokerninduzierende Effekt von Etoposid in HepG2 Zellen demonstriert werden konnte (vgl. Abb. 98 B, Mukherjee *et al.*, 2013). MMC und Etoposid stellten damit geeignete Positivkontrollen für den Mikrokern Assay in HepG2 und in HepG2-CYP2E1 Zellen dar.

6. Fazit

Zusammenfassend konnte innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die *in vitro* Variante des alkalischen Comet Assays in PRH als ergänzende Methode zum Ames Test zur Vorhersage des genotoxischen Potentials von *N*-Nitrosaminen grundsätzlich eignet. Hierbei sind insbesondere Verbindungen zu nennen, die nur durch in bestimmten Geweben vorkommende CYP Enzyme metabolisch aktiviert werden. Es muss berücksichtigt werden, dass beim Ames Test fixe DNA-Schäden in Form von Mutationen evaluiert werden, während im Comet Assay durch Erfassung von DNA-Strangbrüchen potentiell reversible Schäden gemessen werden, weshalb der Comet Assay keine ersetzende Methode darstellt. Der alkalische Comet Assay ermöglichte neben der Ermittlung strangbruchinduzierender Eigenschaften von zehn strukturell verschiedenen *N*-Nitrosaminen die Detektion des genotoxischen Potentials weiterer NDSRIs, NBH und NNT, sowie eingeleitete DNA-Reparaturmechanismen. In diesem Zusammenhang ließ sich feststellen, dass NDSRIs wie NFluo starke DNA-schädigende Effekte hervorrufen, wodurch die Dringlichkeit im Hinblick auf Untersuchung der an der metabolischen Aktivierung weiterer NDSRIs sowie an der Reparatur von Alkylierungsschäden involvierte Proteinen deutlich gemacht werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass CYP2E1 die metabolische Aktivierung von NDMA, NDELA und NMA katalysiert. Zudem konnte demonstriert werden, dass die MGMT an der Reparatur von durch NDMA induzierten O^6-MeG-Addukten in PRH sowie induzierten DNA-Strangbruchschäden in HepG2-CYP2E1 Zellen beteiligt ist. Auch ließen sich DNA-quervernetzende Eigenschaften infolge der CYP2E1 vermittelten metabolischen Aktivierung von NMA durch eine H_2O_2-modifizierte Variante des Comet Assays in HepG2-CYP2E1 Zellen ermitteln. Schließlich konnte gezeigt werden, dass NDMA nach metabolischer Aktivierung klastogene und zytotoxische Effekte in HepG2-CYP2E1 Zellen induziert, was erneut auf die zentrale Rolle von CYP2E1 für die metabolische Aktivierung von NDMA und damit verbundenen genotoxischen Effekten verweist. Das Potential der Methode im Hinblick auf Prädiktivität ist derzeit aufgrund der Anzahl der getesteten *N*-Nitrosamine und der damit verbundenen Datenmenge nur eingeschränkt abzuschätzbar, weshalb die Untersuchung weiterer Verbindungen für die Einschätzung notwendig ist. Die standardisierte Anwendung im regulatorischen Kontext setzt weitere Etablierungsarbeit unter Berücksichtigung der im Comet Assay relevanten, experimentellen Parameter wie beispielsweise Denaturierungsbedingungen und Elektrophoresekonditionen vorraus.

Ausblick

Die Untersuchung weiterer *N*-Nitrosamine mithilfe des alkalischen Comet Assays in PRH wäre zur Beurteilung der Prädiktivität einschließlich Sensitivität und Spezifität dieser Methode sinnvoll. DNA-Akylierungsschäden, auf welchen die Induktion von DNA-Strangbrüchen der innerhalb dieser Arbeit untersuchten *N*-Nitrosamine mit unzureichender Datenlage beruht, könnten mithilfe geeigneter LC-MS Methoden untersucht werden. Für die NDSRIs NFluo, NNT und NBH konnten in diesem Zusammenhang in einer noch nicht veröffentlichten Studie die Bildung von O^6-MeG-, und N7-MeG-Addukten nachgewiesen werden. Die hierbei aufgetretenen starken zytotoxischen Effekte deuten die Bildung sperriger Addukte an, weshalb für deren Identifizierung weitere LC-MS Analysen empfehlenswert wäre. Ebenso wären DNA-Adduktanalysen von NMIPA sowie NND aufschlussreich zur Interpretation der innerhalb dieser Arbeit aufgetretenen Effekte. Die Untersuchungen sollten in PRH durchgeführt werden, da diese über Proteinaktivität der für die metabolische Aktivierung von *N*-Nitrosaminen relevanten CYP Enzyme verfügen. Für NMIPA konnten starke strangbruchinduzierende Effekte in PRH mithilfe des alkalischen Comet Assays bei gleichzeitigem Ausbleiben zytotoxischer Effekte festgestellt werden, was auf die Bildung von N-Alkyladdukten wie N7-MeG hindeutet. Hierbei ließe sich durch zeitabhängige Experimente die Bildung von N7-MeG, N3-MeA und O^6-MeG sowie der Einfluss der MGMT an der DNA-Reparatur von O^6-MeG-Addukten untersuchen. Bei bestätigter N7-MeG-, und O^6-MeG-Adduktbildung könnte in einem zweiten Schritt die an der Bildung dieser beiden Addukte beteiligten CYP Enzyme mithilfe von rekombinanten CYP Enzymen, ctDNA und S9 Mix untersucht werden. Interessant wäre auch eine genauere Charakterisierung genotoxischer Eigenschaften von NND, da der Nachweis spezifisch strangbruchinduzierender Effekte mittels Comet Assay aufgrund der starken zytotoxischen Eigenschaften nicht möglich war. Hierbei wären LC-MS basierte Adduktbildungsanalysen informativ. Die Untersuchung der DNA-Schadensantwort mithilfe von Western Blot Experimenten wäre zur Bestätigung genotoxischer Eigenschaften von NMIPA und NND sinnvoll. γH2AX könnte ergänzend mittels konfokaler Mikroskopie untersucht werden, so wie dies für NDMA in HepG2-CYP2E1 Zellen in einer kürzlich veröffentlichten Studie erfolgte, um induzierte DNA-Alkylierungsschäden mit einer ergänzenden Methode zu bestätigen. Für NND sollten die Untersuchungen in PRH durchgeführt werden, da diese über Proteinaktivi-

tät von verschiedenen für die metabolischen Aktivierung von *N*-Nitrosaminen relevanten CYP Enzymen verfügen. Aufgrund des im Western Blot ermittelten starken Anstiegs von p53 in HepG2-CYP1A2 Zellen bei gleichzeitigem Ausbleiben strangbruchinduzierender Effekte nach Behandlung mit S-NNN liegt ein nächster Schritt in DNA-Adduktbildungsanalysen in der genetisch modifizierten Zelllinie sowie vergleichend im Wildtyp zur Bestätigung von Pyridyloxobutyladdukten, welche von diesem *N*-Nitrosamin bekanntermaßen gebildet werden und Substrate der NER darstellen. In diesem Zusammenhang wäre neben HepG2 und HepG2-CYP1A2 Zellen die Berücksichtigung von HepG2-CYP3A4 Zellen sinnvoll, da an der metabolischen Aktivierung von S-NNN bekanntermaßen CYP3A4 beteiligt ist. Zudem könnten die Untersuchungen parallel in PRH erfolgen, welche über CYP3A4 Proteinaktivität verfügen. Auch die Untersuchung von γH2AX mittels konfokaler Mikroskopie könnte ergänzend durchgeführt werden. Die Modifizierung des alkalischen Comet Assays unter Verwendung von NER-Inhibitoren zur Identifizierung von nach Pyridyloxobutylierung der DNA entstehenden Einzelstrangbruchintermediaten wäre eine alternative Methode, um genotoxische Effekte von S-NNN in HepG2-CYP1A2 zu bestätigen. Für NFluo ließ sich in einer aktuellen, noch unveröffentlichten Studie die Beteiligung von CYP3A4 an der metabolischen Aktivierung nachweisen, weshalb die Untersuchung der DNA-Schadensantwort in HepG2-CYP3A4 sowie in PRH mittels Western Blot interessant wäre. Parallel ließe sich dies für NFluo in der Wildtyp Zelllinie durchführen, um die Bedeutung der CYP3A4 vermittelten metabolischen Aktivierung für die Aktivierung der DNA-Schadensantwort zu demonstrieren. Um DNA-quervernetzende Eigenschaften von NMA mithilfe einer weiteren Methode zu bestätigen, wäre die Untersuchung von Proteinen, die an der Reparatur von crosslinks beteiligt sind, wie beispielsweise dem Fanconi anemia complementation group 2 Protein (FANCD2), sinnvoll. In weiterführenden Analysen zur Charakterisierung der Mikrokerninduktion nach Behandlung von HepG2-CYP2E1 Zellen mit NDMA könnte gezeigt werden, ob die festgestellte Zunahme auf aneugenen oder klastogenen Effekten beruht. Hierbei wäre die immunochemische Färbung der Kinetochore oder die Hybridisierung mit telomeren oder zentromeren Sonden, wie im regulatorischen Kontext nach OECD TG 487 beschrieben, sinnvoll. Die Untersuchung aneugener Effekte könnte auch für NMA und NDELA erfolgen, da für diese *N*-Nitrosamine in einer kürzlich veröffentlichten Studie mikrokerninduzierende Effekte in HepG2-CYP2E1 Zellen demonstriert wurden.

Literaturverzeichnis

Aas, P. A.; Otterlei, M.; Falnes, P. O.; Vågbø, C. B.; Skorpen, F.; Akbari, M.; Sundheim, O.; Bjørås, M.; Slupphaug, G.; Seeberg, E.; Krokan, H. E. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* **2003**, *421* (6925), 859–863. DOI: 10.1038/nature01363.

Aasland, D.; Götzinger, L.; Hauck, L.; Berte, N.; Meyer, J.; Effenberger, M.; Schneider, S.; Reuber, E. E.; Roos, W. P.; Tomicic, M. T.; Kaina, B.; Christmann, M. Temozolomide induces senescence and repression of DNA repair pathways in glioblastoma cells via activation of ATR-CHK1, p21, and NF-κB. *Cancer Research* **2019**, *79* (1), 99–113. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1733.

Aasland, D.; Reich, T. R.; Tomicic, M. T.; Switzeny, O. J.; Kaina, B.; Christmann, M. Repair gene O^6-methylguanine-DNA methyltransferase is controlled by SP1 and up-regulated by glucocorticoids, but not by temozolomide and radiation. *Journal of Neurochemistry* **2018**, *144* (2), 139–151. DOI: 10.1111/jnc.14262.

Acosta, D.; Mitchell, D. B. Metabolic activation and cytotoxicity of cyclophosphamide in primary cultures of postnatal rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* **1981**, *30* (23), 3225–3230. DOI: 10.1016/0006-2952(81)90522-0.

Aden, D. P.; Fogel, A.; Plotkin, S.; Damjanov, I.; Knowles, B. B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* **1979**, *282* (5739), 615–616. DOI: 10.1038/282615a0.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for N-Nitrosodiphenylamine. **1987**,*113*. https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp16.pdf.

Agius, L.; Battersby, C.; Alberti, K. G. Monolayer culture of parenchymal rat hepatocytes on collagen-coated microcarriers. A hepatocyte system for short- and long-term metabolic studies. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **1985**, *21* (5), 254–259. DOI: 10.1007/BF02620938.

Ahn C. S.; Metallo, C. M. Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. *Cancer & Metabolism* **2015**, *3* (1). DOI: 10.1186/s40170-015-0128-2.

Alarcon, R. A.; Meienhofer, J. Formation of the cytotoxic aldehyde acrolein during *in vitro* degradation of cyclophosphamide. *Nature New Biology* **1971**, *233*. 250-252. DOI: 10.1038/newbio233250b0.

Alcón, P.; Shakeel, S.; Chen, Z. A.; Rappsilber, J.; Patel, K. J.; Passmore, L. A. FANCD2-FANCI is a clamp stabilized on DNA by monoubiquitination of FANCD2 during DNA repair. *Nature Structural & Molecular Biology* **2020**, *27* (3), 240–248. DOI: 10.1038/s41594-020-0380-1.
Alexandre, E.; David, P.; Viollon, C.; Wolf, P.; Jaeck, D.; Azimzadeh, A.; Nicod, L.; Boudjema, K.; Richert, L. Expression of cytochromes P-450 2E1, 3A4 and 1A1/1A2 in growing and confluent human HepG2 hepatoma cells-effect of ethanol. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **1999**, *13* (3), 427–435. DOI: 10.1016/s0887-2333(99)00007-7.

Allen, R. C. Haloperoxidase-catalyzed luminol luminescence. *Antioxidants* **2022**, *11* (3), 518. DOI: 10. 3390/antiox11030518.

Allocca, M.; Corrigan J. J.; Fake K. R.; Calvo J. A.; Samson, L. D. PARP inhibitors protect against sex- and AAG-dependent alkylation-induced neural degeneration. *Oncotarget* **2017**, *8*(40), 68707-68720. DOI: 10.18632/oncotarget.19844.

Allocca, M.; Corrigan J. J.; Mazumder A.; Fake K. R.; Samson, L.D. Inflammation, necrosis, and the kinase RIP3 are key mediators of AAG-dependent alkylation-induced retinal degeneration. *Science Signaling* **2019**, *12* (568). DOI: 10.1126/scisignal.aau9216.

Almohaimeed, H. M.; Mohammedsaleh Z. M.; Batawi, A. H.; Balgoon M. J.; Ramadan O.I.; Baz, H. A.; Al Jaouni, S.; Ayuob, N. N. Synergistic anti-inflammatory and neuroprotective effects of *Cinnamomum cassia* and *Zingiber officinale* alleviate Diabetes-induced Hippocampal changes in male albino rats: structural and molecular evidence. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2021**, *9*. DOI: 10.3389/fcell. 2021.727049.

Amberg, A.; Harvey, J. S.; Czich, A.; Spirkl, H. P.; Robinson, S.; White, A.; Elder, D. P. Do carboxylic/suldonic acid halides really present a mutagenic and carcinogenic risk as impurities in final drug products? *Organic Research & Development* **2015**, *19* (11). 10.1021/acs.oprd.5b00106.

Anantha, R. W.; Vassin, V. M.; Borowiec, J. A. Sequential and synergistic modification of human RPA stimulates chromosomal DNA repair. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282* (49), 35910-35923. DOI: 10.1074/jbc.M704645200.

Andersson, B.; Sadeghi, T.; Siciliano, M. Nucleotide excision repair genes as determinants of cellular sensitivity to cyclophosphamide analogs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacol*ogy **1996**, *38*, 406–416. Doi: 10.1007/s002800050504.

Appel, K. E.; Rühl, C. S.; Hildebrandt, A. G. Oxidative dealkylation and reductive denitrosation of nitrosomethylaniline *in vitro*. *Chemico-Biological Interactions* **1985**, *53* (1-2), 69–76. DOI: 10.1016/S0009-2797(85)80085-5.

Arcos, J. C.; Woo, Y. T.; Argus, M. F. Structural Bases and Biological Mechanisms-Alipathic Carcinogens: Transnitrosation; Chemical Induction of Cancer. *Elsevier*, **1982**.

Ashford, A. L.; Nachmanson, D.; Wills, J. W.; Higgins, J. E.; Smith, T.H.; Vavra, K. C.; Dahalan, F. A.; Howe, J.; Elloway, J. M.; Salk, J. J.; Doherty, A.; Lynch, A. M. Alignment between duplex sequencing and transgenic rodent mutation assay data in the assessment of *in vivo* NDMA-induced mutagenesis. *Archives of Toxicology* **2025**, *99*, 4227-4242. DOI: 10.1007/s00204-025-04121-0.

Ashley, A. K.; Shrivastav, M.; Nie, J.; Amerin, C.; Troksa, K.; Glanzer, J. G.; Liu, S.; Opiyo, S. O.; Dimitrova, D. D.; Le, P.; Sishc, B.; Bailey, S. M.; Oakley, G. G.; Nickoloff, J. A. DNA-PK phosphorylation of RPA32 Ser4/Ser8 regulates replication stress checkpoint activation, fork restart, homologous recombination and mitotic catastrophe. *DNA Repair* **2014**, *21*, 131–139. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.04.008.

Asthana, S.; Labani, S.; Kailash, U.; Sinha, D. N.; Mehrotra, R. Association of smokeless tobacco use and oral cancer: A Systematic global review and meta-analysis. *Nicotine & Tobacco Research* **2018**, *21* (9), 1162–1171. DOI: 10.1093/ntr/nty074.

ATSDR. (2017). Toxicological Profile for N-Nitrosodiphenylamine. 113. doi:https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp16.pdf.

Aubrey, B. J.; Kelly, G. L.; Janic, A.; Herold, M. J.; Strasser, A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death and Differentiation* **2018**, *25* (1), 104–113. DOI: 10.1038/cdd.2017.169.

Bache, S., Wickham, H. (2022). _magrittr: A Forward-Pipe Operator for R_. R package version 2.0.3.

Balbo, S.; James-Yi, S.; Johnson, C. S.; O'Sullivan, M. G.; Stepanov, I.; Wang, M.; Bandyopadhyay, D.; Kassie, F.; Carmella, S.; Upadhyaya, P.; Hecht, S. S. (S)-N'-Nitrosonornicotine, a constituent of smokeless tobacco, is a powerful oral cavity carcinogen in rats. *Carcinogenesis* **2013**, *34* (9), 2178–2183. DOI: 10.1093/carcin/bgt162.

Bankoglu, E. E.; Schuele, C.; Stopper, H. Cell survival after DNA damage in the comet assay. *Archives of Toxicology* **2021**, *95* (12), 3803–3813. DOI: 10.1007/s00204-021-03164-3.

Beard, J. C.; Swager, T. M. An organic chemist's guide to *N*-Nitrosamines: their structure, reactivity, and role as contaminants. The Journal of *Organic Chemistry* **2021**, *86* (3), 2037–2057, DOI: 10.1021/acs.joc.0c02774.

Beard, W. A.; Horton, J. K.; Prasad, R.; Wilson, S. H. Eukaryotic Base Excision Repair: New Approaches Shine Light on Mechanism. *Annual Review of Biochemistry* **2019,** *88*, 137–162. DOI: 10.1146/annurev-biochem-013118-111315.

Beard, W. A.; Wilson, S. H. Structure and mechanism of DNA polymerase Beta. *Chemical Reviews* **2006**, *106* (2), 361–382. DOI: 10.1021/cr0404904.

Bellec, G.; Dréano, Y.; Lozach, P.; Ménez, J. F.; Berthou, F. Cytochrome P450 metabolic dealkylation of nine N-nitrosodialkylamines by human liver microsomes, *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 2029–2034, DOI: 10.1093/carcin/17.9.2029.

Beranek, D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research* **1990**, *231* (1), 11–30. DOI: 10.1016/0027-5107(90)90173-2.

Bercu, J. P.; Masuda-Herrera, M.; Trejo-Martin, A.; Sura, P.; Jolly, R.; Kenyon, M.; Tomas, R.; D. J. Ponting; Snodin, D.; Tuschl, G.; Simon, S.; De Vlieger, K.; Hutchinson, R.; Czich, A.; Glowienke, S.; Reddy, M. V.; Johanssen, S.; Vock, E.; Claude, N.; Weaver, R. J. Acceptable intakes (AIs) for 11 small molecule N-nitrosamines (NAs). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2023**,*142*.

Berger, N. A.; Cellular response to DNA damage: The role of poly(ADP-ribose):poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiation Research* **1985,** *101* (1), 4-15. DOI: 10.2307/3576299.

Bhakta, A.; Gavini, K.; Yang, E.; Lyman-Henley L.; Parameshwaran, K. Chronic traumatic stress impairs memory in mice: Potential roles of acetylcholine, neuroinflammation and corticotropin releasing factor expression in the hippocampus. *Behavioural Brain Research* **2017**, 335, 32-40. DOI: 10.1016/j.bbr.2017.08.013.

Bingham, S. A.; Pignatelli, B.; Pollock, J. R.; Ellul, A.; Malaveille, C.; Gross, G.; Runswick, S.; Cummings, J. H.; O'Neill, I. K. Does increased endogenous formation of N-nitrosocompounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer? *Carcinogenesis* **1996**, *17* (3), 515–523. DOI: 10.1093/carcin/17.3.515.

Blough, M. D.; Zlatescu, M. C.; Cairncross, J. G. O^6-methylguanine-DNA methyltransferase regulation by p53 in astrocytic cells. *Cancer Research* **2007**, *67* (2), 580–584. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2782.

Bocangel, D.; Sengupta, S.; Mitra, S.; Bhakat, K. K. p53-Mediated down-regulation of the human DNA repair gene O^6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) via interaction with Sp1 transcription factor. *Anticancer Research* **2009**, *29* (10), 3741–3750.

Bonfanti, M.; Magagnotti, C.; Fanelli, R.; & Airoldi, L. Comparative *in vitro* and *in vivo* β-oxidation of *N*-nitrosodiethanolamine in different animal species. *Chemico-Biological Interactions*, **1986**, *59*, 203-210. DOI: 10.1016/s0009-2797(86)80066-7.

Borellini, F.; Glazer, R. I. Induction of Sp1-p53 DNA-binding heterocomplexes during granulocyte /macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation in human erythroleukemia cell line TF-1. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268* (11), 7923-7928.

Brambilla, G.; Mattioli, F.; Robbiano, L.; Martelli, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihistamines. *Archives of Toxicology* **2011**, *85* (10), 1173-1187. DOI: 10.1007/s00204-011-0659-4.

Brambilla, P.; Cipriani, A.; Hotopf, M.; Barbui, C. Side-effect profile of fluoxetine in comparison with other SSRIs, tricyclic and newer antidepressants: a meta-analysis of clinical trial data. *Pharmacopsychiatry* **2005**, *38* (02), 69-77. DOI: 10.1055/s-2005-837806.

Brandon, E. F. A.; Bosch, T. M.; Deenen, M. J.; Levink, R.; van der Wal, E.; van Meerveld, J. B. M.; Bijl, M.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M.; Meijerman, I. Validation of *in vitro* cell models used in drug metabolism and transport studies; genotyping of cytochrome P450, phase II enzymes and drug transporter polymorphisms in the human hepatoma (HepG2), ovarian carcinoma (IGROV-1) and colon carcinoma (CaCo-2, LS180) cell lines. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2006**, *211* (1), 1–10. DOI: 10.1016/j.taap.2005.05.004.

Brandon, E. F. A.; Raap, C. D.; Meijerman, I.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2003**, *189* (3), 233–246. DOI: 10.1016/s0041-008x(03)00128-5.

Breslin, C.; Hornyak, P.; Ridley, A.; Rulten, S. L.; Hanzlikova, H.; Oliver, A. W.; Caldecott, K. W. The XRCC1 phosphate-binding pocket binds poly (ADP-ribose) and is required for XRCC1 function. *Nucleic Acids Research* **2015**, *43* (14), 6934–6944. DOI: 10.1093/nar/gkv623.

Brickner, J. R.; Townley, B. A.; Mosammaparast, N. Intersections between transcription-coupled repair and alkylation damage reversal. *DNA Repair* **2019**, *81*. DOI: 10.1016/j.dnarep.2019.102663.

Bringezu, F.; Simon, S. Salmonella typhimurium TA100 and TA1535 and E. coli WP2 uvrA are highly sensitive to detect the mutagenicity of short Alkyl-*N*-Nitrosamines in the bacterial reverse mutation test. *Toxicology Reports* **2022**, *9*, 250–255. DOI: 10.1016/j.toxrep.2022.02.005.

Brown, P. J.; Bedard, L. L.; Massey, T. E. Repair of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced DNA pyridyloxobutylation by nucleotide excision repair. *Cancer Letters* **2008**, *260* (1-2), 48–55. DOI: 10.1016/j.canlet.2007.10.015.

Brunnemann, K. D.; Scott, J. C.; Hoffmann, D. *N*-Nitrosoproline, an indicator for N-nitrosation of amines in processed tobacco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1983**, *31* (4), 905–909. DOI: 10.1021/jf00118a059.

Burczynski, M. E; McMillian M.; Parker J. B; Bryant S.; Leone A.; Grant E. R.; Thorne J. M.; Zhong Z.; Zivin R. A.; Johnson M. D. Cytochrome P450 induction in rat hepatocytes assessed by quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction and the RNA invasive cleavage assay. *Drug Metabolism and Disposition* **2001**, *29* (9):1243-50.

Busby, W. F.; Shuker, D. E.; Charnley, G.; Newberne, P. M.; Tannenbaum, S. R.; Wogan, G. N. Carcinogenicity in rats of the nitrosated bile acid conjugates N-nitrosoglycocholic acid and N-nitrosotaurocholic acid. *Cancer Research* **1985,** *45* (3), 1367–1371.

Calvo, J. A.; Meira, L. B.; Lee, C.-Y. I.; Moroski-Erkul, C. A.; Abolhassani, N.; Taghizadeh, K.; Eichinger, L. W.; Muthupalani, S.; Nordstrand, L. M.; Klungland, A.; Samson, L. D. DNA repair is indispensable for survival after acute inflammation. *The Journal of Clinical Investigation* **2012**, *122* (7), 2680–2689. DOI: 10.1172/JCI63338.

Camus, A. M.; Geneste, O.; Honkakoski, P.; Béréziat, J. C.; Henderson, C. J.; Wolf, C. R.; Bartsch, H.; Lang, M. A. High variability of nitrosamine metabolism among individuals: role of cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylamine in mice and humans. *Molecular Carcinogenesis* **1993**, *7* (4), 268–275. DOI: 10.1002/mc.2940070410.

Cappelli, E.; Taylor, R.; Cevasco, M.; Abbondandolo, A.; Caldecott, K.; Frosina, G. Involvement of XRCC1 and DNA ligase III gene products in DNA base excision repair. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272* (38), 23970–23975. DOI: 10.1074/jbc.272.38.23970.

Carlson, E. Metabolic Activation and DNA-Damaging Properties of Carcinogenic *N*-Nitrosamines. Dissertation, University of Minnesota, **2019.** Retrieved from the University Digital Conservancy, https://hdl.handle.net/11299/206315.

Carlsson, M. J.; Fahrer J. Analyzing the effects of HDAC Inhibitors on DNA damage and associated cytotoxicity in primary hepatocytes. *Methods in Molecular Biology* **2023**, *2589*, 241-252. DOI: 10.1007/978-1-0716-2788-4_16.

Carlsson, M. J.; Herzog, N.; Felske, C.; Ackermann, G.; Regier, A.; Wittmann, S.; Fernández Cereijo, R.; Sturla, S. J.; Küpper, J.-H.; Fahrer, J. The DNA repair protein MGMT protects against the genotoxicity of *N*-Nitrosodimethylamine, but Not *N*-Nitrosodiethanolamine and *N*-Nitrosomethylaniline, in human HepG2 Liver Cells with CYP2E1 Expression. *Chemical Research in Toxicology* **2025**. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.5c00133.

Carlsson, M. J.; Vollmer, A. S.; Demuth, P.; Heylmann, D.; Reich, D.; Quarz, C.; Rasenberger, B.; Nikolova, T.; Hofmann, T. G.; Christmann, M.; Fuhlbrueck, J. A.; Stegmüller, S.; Richling, E.; Cartus, A. T.; Fahrer, J. p53 triggers mitochondrial apoptosis following DNA damage-dependent replication stress by the hepatotoxin methyleugenol. *Cell Death & Disease* **2022**, *13* (11), 1009. DOI: 10.1038/s41419-022-05446-9.

Carr, B.; Norcross, R.; Fang, Y.; Lu, P.; Rodrigues, A. D.; Shou, M.; Rushmore, T.; Booth-Genthe, C. Characterization of the rhesus monkey CYP3A64 enzyme: species comparisons of CYP3A substrate specificity and kinetics using baculovirus-expressed recombinant enzymes. *Drug Metabolism and Disposition* **2006**, *34* (10), 1703–1712. DOI: 10.1124/dmd.106.009977.

Carson, D. A.; Seto, S.; Wasson, D. B.; Carrera, C. J. DNA strand breaks, NAD metabolism and programmed cell death. *Experimental Cell Research* **1986**, *164* (2), 273-281. DOI: 10.1016/0014-4827(86)90028-5.

Cascella, M.; Bimonte, S.; Barbieri, A.; Vecchio, V. D.; Caliendo, D.; Schiavone, V.; Fusco, R.; Granata. V.; Arra, C.; Cuomo, A. Dissecting the mechanisms and molecules underlying the potential carcinogenicity of red and processed meat in colorectal cancer (CRC): an overview on the current state of knowledge. *Infectious Agents and Cancer* **2018**, *13*, 3 . DOI: 10.1186/s13027-018-0174-9.

Castonguay, A.; Stoner, G. D.; Schut, H. A.; & Hecht, S. S. Metabolism of tobacco-specific N-nitrosamines by cultured human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1983**, *80* (21), 6694-6697. DOI: 10.1073/pnas.80.21.6694.

Center for Drug Evaluation and Research. Recommended acceptable intake levels for nitrosamine drug substance-related impurities (NDSRIs). Guidance for Industry. FDA, **2023**.

Chakravarti, D.; Ibeanu, G. C.; Tano, K.; Mitra, S. Cloning and expression in Escherichia coli of a human cDNA encoding the DNA repair protein *N*-methylpurine-DNA glycosylase. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266* (24), 15710–15715. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)98467-X.

Chan, D. W., Ping-Chi Chen, B.; Prithivirajsingh,S.; Kurimasa, A.; Story, M. D.; Qin, J.; Chen D. J. Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes & Development* **2002**, *16* (18), 2333-2338. DOI: 10.1101/gad.1015202.

Chang, T. K. H.; Weber, G. F.; Crespi, C. L.; Waxman, D. J. Differential activation of cyclophosphamide and ifosphamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Research* **1993**, *53* (23), 5629-5637.

Chang, T. K. H.; Yu, L.; Maurel, P., Waxman, D. J. Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepato cyte cultures: response to cytochrome P-450 inducers and autoinduction by oxazaphosphorines. *Cancer Research* **1997**, *57* (10), 1946-1954.

Chen, H. J. C.; Chen, Y.C. Analysis of glyoxal-induced DNA cross-links by capillary liquid chromatography nanospray ionization tandem mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* **2009**, *22* (7), 1334–1341. DOI: 10.1021/tx900129e.

Choi, J. Y. Chowdhury, G.; Zang, H.; Angel, K. C.; Vu, C. C.; Peterson, L. A.; Guengerich, F. P. Trans-lesion synthesis across O^6-alkylguanine DNA adducts by recombinant human DNA adducts by recombinant human DNA polymerases. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281* (50), 38422-38256. DOI: 10.1074/jbc.M608369200.

Chowdhury, G.; Calcutt, M. W.; Guengerich, F. P. Oxidation of N-Nitrosoalkylamines by human cytochrome P450 2A6: sequential oxidation to aldehydes and carboxylic acids and analysis of reaction steps. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285* (11), 8031–8044. DOI: 10.1074/jbc.M109.088039.

Chowdhury, G.; Calcutt, M. W.; Nagy, L. D.; Guengerich, F. P. Oxidation of methyl and ethyl nitrosamines by cytochrome P450 2E1 and 2B1. *Biochemistry* **2012**, *51* (50), 9995–10007. DOI: 10.1021/bi301092c.

Christmann, M.; Kaina, B. Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Research* **2013**, *41* (18), 8403–8420. DOI: 10.1093/nar/gkt635.

Christmann, M.; Tomicic, M. T.; Roos, W. P.; Kaina, B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* **2003**, *193* (1-2), 3-34. DOI: 10.1016/S0300-483X(03)00287-7.

Clark, A. S.; Deans, B.; Stevens, M. F.; Tisdale, M. J.; Wheelhouse, R. T.; Denny, B. J.; Hartley, J. A. Antitumor imidazotetrazines. 32. Synthesis of novel imidazotetrazinones and related bicyclic heterocycles to probe the mode of action of the antitumor drug temozolomide. *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, *38*. 1493–1504, 1995.

Collins, A.; Møller, P.; Gajski, G.; Vodenková, S.; Abdulwahed, A.; Anderson, D.; Bankoglu, E. E.; Bonassi, S.; Boutet-Robinet, E.; Brunborg, G.; Chao, C.; Cooke, M. S.; Costa, C.; Costa, S.; Dhawan, A.; Lapuente, J. de; Del Bo', C.; Dubus, J.; Dusinska, M.; Duthie, S. J.; Yamani, N. E.; Engelward, B.; Gaivão, I.; Giovannelli, L.; Godschalk, R.; Guilherme, S.; Gutzkow, K. B.; Habas, K.; Hernández, A.; Herrero, O.; Isidori, M.; Jha, A. N.; Knasmüller, S.; Kooter, I. M.; Koppen, G.; Kruszewski, M.; Ladeira, C.; Laffon, B.; Larramendy, M.; Le Hégarat, L.; Lewies, A.; Lewinska, A.; Liwszyc, G. E.; Cerain, A. L. de; Manjanatha, M.; Marcos, R.; Milić, M.; Andrade, V. M. de; Moretti, M.; Muruzabal, D.; Novak, M.; Oliveira, R.; Olsen, A.-K.; Owiti, N.; Pacheco, M.; Pandey, A. K.; Pfuhler, S.; Pourrut, B.; Reisinger,

K.; Rojas, E.; Rundén-Pran, E.; Sanz-Serrano, J.; Shaposhnikov, S.; Sipinen, V.; Smeets, K.; Stopper, H.; Teixeira, J. P.; Valdiglesias, V.; Valverde, M.; van Acker, F.; van Schooten, F.-J.; Vasquez, M.; Wentzel, J. F.; Wnuk, M.; Wouters, A.; Žegura, B.; Zikmund, T.; Langie, S. A. S.; Azqueta, A. Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nature protocols* **2023**, *18* (3), 929–989. DOI: 10.1038/s41596-022-00754-y.

Colvin, M.; Brundrett, R. B.; Kan, M. N.; Jardine, I.; Fenselau, C. Alkylating properties of phosphoramide mustard. *Cancer Research* **1976**, *36* (3), 1121–1126.

Connors, T. A; Cox, P. J.; Farmer, P. B.; Foster, A. B.; Jarman, M. Some studies on the active intermediates formed in the microsomal metabolism of cyclophosphamide and isophosphamide. *Biochemical Pharmacology* **1974**, *23* (1), 115-29. DOI: 10.1016/0006-2952(74)90318-9.

CONTAM-Panel; Schrenk, D.; Bignami, M.; Bodin, L.; Chipman, J. K.; Del Mazo, J.; Hogstrand, C.; Ron Hoogenboom, L.; Leblanc, J. C.; Nebbia, C. S.; Nielsen, E.; Ntzani, E.; Petersen, A.; Sand, S.; Schwerdtle, T.; Vleminckx, C.; Wallace, H.; Romualdo, B.; Cristina, F.; Stephen, H.; Marco, I.; Mosbach-Schulz, O.; Riolo, F.; Christodoulidou, A.; Grasl-Kraupp, B. Risk assessment of N nitrosamines in food. *EFSA Journal* **2023**, *21* (3), No. e07884.

Conway, G. E.; Shah, U.K.; Llewellyn, S.; Cervena, T.; Evans, S. J.; Al Ali, A. S.; Jenkins, G. J.; Clift, M. J. D.; Doak, S. H. Adaptation of the *in vitro* micronucleus assay for genotoxicity testing using 3D liver models supporting longer-term exposure durations. *Mutagenesis* **2020**, *35* (4), 319–330. DOI: 10.1093/mutage/geaa018.

Cordelli, E.; Bignami, M.; Pacchierotti, F. Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research* **2021**, *10* (1), 68–78. DOI: 10.1093/toxres/tfaa093.

Costello, J. F.; Futscher, B. W.; Kroes, R. A.; Pieper, R.O. Methylation-related chromatin structure is associated with exclusion of transcription factors from and suppressed expression of the O^6-methylguanine DNA methyltransferase gene in human glioma cell lines. Journal of Molecular Cell Biology **1994**, *14* (10), 6515–6521. DOI: 10.1128/mcb.14.10. 6515-6521.1994

Costello, J. F.; Futscher, B. W.; Tano, K.; Graunke, D. M.; Pieper, R. O. Graded methylation in the promoter and body of the O^6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) gene correlates with MGMT expression in human glioma cells. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269* (25), 17228–17237.

Coulter, R.; Blandino, M.; Tomlinson, J. M.; Pauly, G. T.; Krajewska, M.; Moschel, R. C.; Peterson, L. A.; Pegg, A. E.; Spratt, T. E. Differences in the rate of repair of O^6-alkylguanines in different sequence contexts by O^6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Chemical research in toxicology* **2007**, *20* (12), 1966–1971. DOI: 10.1021/tx700271j.

CPDB, 2005 The Carcinogenic Potency Database. https://files.toxplanet.com/cpdb/index.html. **2005**.

Crook, T. R.; Souhami, R. L.; Whyman G. D.; McLean, A. E. Glutathione depletion as a determinant of sensitivity of human leukaemia cells to cyclophosphamide. *Cancer Research* **1986**, *46* (10), 5035-5038.

Cropper J. D.; Alimbetov, D. S.; Brown, K. T. G.; Likhotvorik, R. I.; Robles, A. J.; Guerra, J. T.; He B.; Chen Y, Kwon Y.; Kurmasheva, R.T. PARP1-MGMT complex underpins pathway crosstalk in O^6-methylguanine repair. *Journal of Hematology and Oncology* **2022**, *15* (1). DOI: 10.1186/s13045-022-01367-4.

Cross, A. J.; Pollock, J. R. A.; Bingham, S. A. Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. *Cancer Research* **2003**, *63* (10), 2358–2360.

Cross, D. A.; Alessi, D.R.; Cohen, P.; Andjelkovich, M.; Hemmings, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **1995**, *378* (6559), 785-789. DOI: 10.1038/378785a0.

Cross, K. P.; Ponting, D. J. Developing structure-activity relationships for *N*-Nitrosamine activity. *Computational Toxicology* **2021**, *20*, 100186. DOI: 10.1016/j.comtox.2021.100186.

Dango, S.; Mosammaparast, N.; Sowa, M. E.; Xiong, L. J.; Wu, F.; Park, K.; Rubin, M.; Gygi, S.; Harper, J. W.; Shi, Y. DNA unwinding by ASCC3helicase is coupled to ALKBH3-dependent DNA alkylation repair and cancer cell proliferation. *Molecular Cell* **2011***, 44* (3), 373–384. DOI: 10.1016/j. molcel. 2011.08. 039.

De Jonge, M. E.; Huitema, A. D. R.; Rodenhuis, S.; Beijnen, J. H. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clinical Pharmacokinetics* **2005**, *44* (11), 1135–1164. DOI: 10.2165/00003088-200544110-00003.

De Oliveira, M. R. Fluoxetine and the mitochondria: A review of the toxicological aspects. *Toxicology Letters* **2016,** *258*, 185–191. DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.07.001.

De Vos, M.; Schreiber, V.; Dantzer, F. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: Current state of the art. *Biochemical Pharmacology* **2012**, *84* (2), 137–146. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.03.018.

Den Engelse, L.; Menkveld, G. J.; De Brij, R. J. ; Tates, A. D. Formation and stability of alkylated pyrimidines and purines (including imidazole ring-opened 7-alkylguanine) and alkylphosphotriesters in liver DNA of adult rats treated with ethylnitrosourea or dimethylnitrosamine. *Carcinogenesis* **1986**, *7* (3), 393–403. DOI: 10.1093/carcin/7.3.393

Delaney, J. C.; Smeester, L.; Wong, C.; Frick, L. E.; Taghizadeh, K.; Wishnok, J. S.; Drennan, C. L.; Samson, L. D.; Essigmann, J. M. AlkB reverses etheno DNA lesions caused by lipid oxidation *in vitro* and *in vivo*. *Nature Structural & Molecular Biology* **2005**, *12* (10), 855–860. DOI: 10.1038/nsmb996.

Demple, B.; Sung, J. S. Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair. *DNA repair* **2005**, *4* (12), 1442–1449. DOI: 10.1016/j.dnarep.2005.09.004.

Dennehy, M. K.; Loeppky, R. N. Mass spectrometric methodology for the determination of glyoxaldeoxyguanosine and O^6-hydroxyethyldeoxyguanosine DNA adducts produced by nitrosamine bident carcinogens. *Chemical Research in toxicology* **2005**, *18* (3), 556–565. DOI: 10.1021/tx049802o.

Denny, B. J.; Wheelhouse, R. T.; Stevens, M. F. G.; Tsang, L. L. H.; Slack, J. A. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* **1994**, *33*, 9045–9051.

Derouane, E. G.; Parmon, V.; Lemos, F.; Ribeiro, F. R., *Principles and methods for accelerated catalyst design and testing*, 1st ed. 2002; NATO Science Series II; Vol. 69; Springer Netherlands, **2002**. DOI: 10.1007/978-94-010-0554-8.

DeVore, N. M.; Scott, E. E. Nicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone binding and access channel in human cytochrome P450 2A6 and 2A13 enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, **2012**, *287*, 26576–26585. DOI: 10.1074/jbc. M112. 372813.

Dianova, I. I.; Sleeth, K. M.; Allinson, S. L.; Parsons, J. L.; Breslin, C.; Caldecott, K. W.; Dianov, G. L. XRCC1-DNA polymerase beta interaction is required for efficient base excision repair. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32* (8), 2550–2555. DOI: 10.1093/nar/gkh567.

Dietrich, M.; Block, G.; Pogoda, J. M.; Buffler, P.; Hecht., S.; Preston-Martin, S. A review: dietary and endogenously formed N-nitroso compounds and risk of childhood brain tumors. *Cancer Causes & Control*, **2005**, 16, 619-635. DOI: 10.1007/s10552-005-0168-y.

Ding, X.; Kaminsky, L. S. Human extrahepatic cytochromes P450: Function in xenobiotic metabolism and tissue-Selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts, Annual *Review of Pharmacology and Toxicology* **2003**, *43*, 149–173. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140251.

Djuari, M. A & Londenberg, A.; Bassan, A.; Cross, K.; Elenschneider, L.; Escher, S. E.; Fahrer, J.; Fangmann, J.; Felske, C.; Frötschl, R.; Haas, B.; Johnson, G. E.; Vogel, M.; Whomsley, R.; Ziemann, C.: In vitro mutagenicity methodology for nitrosamines. Deliverable 6: Final study report. **2023**.

Döbbeling, U.; Waeckerle-Men, Y.; Zabel, F.; Graf, N.; Kündig, T. M.; Johansen, P. The antihistamines clemastine and desloratadine inhibit STAT3 and c-Myc activities and induce apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines. *Experimental Dermatology* **2013,** *22* (2), 119–124. DOI: 10.1111/exd.12086.

Dockham, P. A.; Sreerama, L.; Sladek, N. E. Relative contribution of human erythrocyte aldehyde dehydrogenase to the systemic detoxification of the oxazaphosphorines. *Drug Metabolism and Disposition* **1997**, *25* (12), 1436–1441.

Dong, L.; Jiang, Z.; Yang, L.; Hu, F.; Zheng, W.; Xue, P.; Jiang, S.; Andersen, M. E.; He, G.; Crabbe, M. J.; Qu, W. The genotoxic potential of mixed nitrosamines in drinking water involves oxidative stress and Nrf2 activation. *Journal of Hazardous Materials* **2022**, *426*. *DOI:* 10.1016/j.jhazmat.2021.128010.

Doostdar, H.; Duthie, S. J.; Burke, M. D.; Melvin, W. T.; Grant, M. H. The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived HepG2 cell line. *Federation of European Biochemical Societies* **1988**, *241* (1-2), 15-18. DOI: 10.1016/0014-5793 (88) 81021-4.

Douglas, P.; Sapkota, G. P.; Morrice, N.; Yu, Y.; Goodarzi, A. A.; Merkle, D.; Meek, K.; Alessi, D. R.; Lees-Miller, S.P. Identification of *in vitro* and *in vivo* phosphorylation sites in the catalystic subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Biochemical Journal* **2002**, *368* (1), 243-251. DOI: 10.1042/BJ20020973.

Druckrey, H.; Preussmann, R.; Ivankovic, S.; Schmähl, D. Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. *Zeitschrift fur Krebsforschung* **1967**, *69* (2), 103–201.

Dubrow, R.; Darefsky, A. S.; Park, Y.; Mayne, S. T.; Moore, S. C.; Kilfoy, B.; Cross, A. J.; Sinha, R.; Hollenbeck, A. R.; Schatzkin, A.; Ward, M. H. Dietary components related to N-nitroso compound formation: a prospective study of adult glioma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **2010**, *19* (7), 1709–1722. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0225.

Duckett, D. R.; Drummond, J. T.; Murchie, A. I.; Reardon, J. T.; Sancar, A.; Lilley, D. M.; Modrich, P. Human MutSalpha recognizes damaged DNA base pairs containing O^6-methylguanine, O^4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1996**, *93* (13), 6443–6447. DOI: 10.1073/pnas.93.13.6443.

Duncan, T.; Trewick, S. C.; Koivisto, P.; Bates, P. A.; Lindahl, T.; Sedgwick, B. Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99* (26), 16660–16665. DOI: 10.1073/pnas.262589799.

Duthie, S. J.; Coleman, C. S.; Grant, M. H. Status of reduced glutathione in the human hepatoma cell line HepG2. *Biochemical Pharmacology* **1988**, *37* (17), 3365-3368. DOI: 10.1016/0006-2952 (88) 90653-3.

Eadie, J. S.; Conrad, M.; Toorchen, D.; Topal, M. D. Mechanism of mutagenesis by O^6-methylguanine. *Nature* **1984**, *308* (5955), 201–203. DOI: 10.1038/308201a0.

Eastmond, D. A.; Tucker, J. D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environmental and Molecular Mutagenesis* **1989**, *13* (1), 34-43. DOI: 10.1002/em.2850130104.

Edwards, D. M.; Speers, C.; Wahl, D. R. Targeting Noncanonical Regulators of the DNA Damage Response to Selectively Overcome Cancer Radiation Resistance. *Seminars in Radiation Oncology* **2022**, *32* (1), 64–75. DOI: 10.1016/j.semradonc.2021.09.006.

EFSA 2022 European Food Safety Authority. Guidance on the use of the benchmark dose approach in risk assessment. *EFSA Journal* **2022**, *20* (10):7854. DOI:10.2903/j.efsa.2022.7584.

EFSA 2005 European Food Safety Authority. Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic. EFSA Journal **2005** *282*, 1-31.

EFSA 2023 European Food Safety Authority. Risk assessment of *n*-nitrosamines in food. *EFSA Journal* **2023**, *21*(3). DOI: 10.2903/j.efsa.2023.7884.

EFSA 2012 European Food Safety Authority. Statement on the applicability of the Margin of Exposure approach for the safety assessment of impurities which are both genotoxic and carcinogenic in substances added to food/feed. *EFSA journal* **2012**, *10* (3): 2578.

EMA 2026 European Medicines Agency. Appendix 1 to Questions and answers for marketing authorisation holders/applicants on the CHMP Opinion for the Article 5 (3) of Regulation (EC) No 726/2004 referral on nitrosamine impurities in human medicinal products, Acceptable intakes established for N-nitrosamines. EMA/42189/2026 Rev. 12., **2026**.

EMA 2023 European Medicines Agency. Appendix 2 to Questions and answers for marketing authorisation holders/applicants on the CHMP Opinion for the Article 5 (3) of Regulation (EC) No 726/2004 referral on nitrosamine impurities in human medicinal products, Carcinogenic Potency Categorization Approach for N-nitrosamines. EMA/451665/2023, **2023**.

EMA 2024 European Medicines Agency. Appendix 3 to Questions and answers for marketing authorisation holders/applicants on the CHMP Opinion for the Article 5 (3) of Regulation (EC) No 726/2004 referral on nitrosamine impurities in human medicinal products, Enhanced Ames Test Conditions for N-nitrosamines. EMA/120337/2024, **2024**.

EMA, 2020, 369136/2020 European Medicines Agency. Assessment report. Procedure under article 5 (3) of regulation ec(no) 726/2004. Nitrosamine impurities in human medicina products. Procedure number: EMEA/H/A-5(3)/1490. EMA/369136/2020.

EMA 2020 European Medicines Agency. EMA update on metformin diabetes medicines. Press Release. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-update-metformin-diabetes-medicines Accessed May 11, **2020**.

EMA 2025 European Medicines Agency. Nitrosamine impurities in human medicines. The response of the European Medicines Regulatory Network. EMA/144509/2025, **2025**.

EMA 2020 EMA/369136/2020 European Medicines Agency. Procedure under Article 5(3) of Regulation EC (No) 726/2004: Nitrosamine impurities in human medicinal products. Procedure number: EMEA/H/A-5(3)/1490. EMA/369136/2020, **2020**.

EMA 2025 EMA/409815/2020 Rev. 23 European Medicines Agency. Questions and answers for marketing authorisation holders/applicants on the CHMP opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 referral on nitrosamine impurities in human medicinal products. EMA/409815/2020 Rev. 23, **2025**.

EMA 2020, 04 European Medicines Agency. Suspension of ranitidine medicines in the EU. Press Release. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/news/suspension-ranitidine-medicines-eu. Accessed December 1, **2020**.

EMA, 2019 European Medicines Agency. Temporary limits for NMBA, DIPNA and EIPNA impuritiesin sartan blood pressure medicines.EMA/351053/2019 rev1, **2019**.

Engelward, B. P.; Weeda, G.; Wyatt, M. D.; Broekhof, J. L.; Wit, J. de; Donker, I.; Allan, J. M.; Gold, B.; Hoeijmakers, J. H.; Samson, L. D. Base excision repair deficient mice lacking the Aag alkyladenine DNA glycosylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, *94* (24), 13087–13092. DOI: 10.1073/pnas.94.24.13087.

Ensminger, M.; Iloff, L.; Ebel, C.; Nikolova, T.; Kaina, B.; Löbrich, M. DNA breaks and chromosomal aberrations arise when replication meets base excision repair. *The Journal of Cell Biology* **2014**, *206* (1), 29–43. DOI: 10.1083/jcb.201312078.

Erickson, L. C.; Ramonas, L. M.; Zaharko, D. S.; Kohn, K. W. Cytotoxicity and DNA cross-linking activity of 4-Sulfidocyclophosphamides in mouse leukemia cells *in vitro*. *Cancer Research* **1980**, *40*, 4216-4220.

Eustermann, S.; Wu, W. F.; Langelier, M. F.; Yang, J.C.; Easton, L. E.; Riccio, A. A.; Pascal, J. M.; Neuhaus, D. Structural basis of detection and signaling of DNA single-strand breaks by human PARP-1. *Molecular Cell* **2015**, *60* (5), 742–754. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.10.032.

Evans, E.; Moggs, J. G.; Hwang, J. R.; Egly, J. M.; Wood, R. D. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *The EMBO Journal* **1997**, *16* (21), 6559–6573. DOI: 10.1093/emboj/16.21.6559.

Ewesuedo, R. B.; Dolan, M. E. Pharmacokinetics of oral O^6-benzylguanine and evidence of interaction with oral ketoconazole in the rat. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2000**, *46* (2), 150–155. DOI: 10.1007/s002800000121.

Fahrer, J., Decoding the genetic program of micronucleus formation: linking chromosomal instability to human disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2024**, *9* (1), 162. DOI: 10.1038/s41392-024-01869-02.

Fahrer, J.; Christmann, M. DNA alkylation damage by Nitrosamines and relevant DNA repair pathways. *International journal of molecular sciences* **2023**, *24* (5). DOI: 10.3390/ijms24054684.

Fahrer, J.; Frisch, J.; Nagel, G.; Kraus, A.; Dörsam, B.; Thomas, A. D.; Reißig, S.; Waisman, A.; Kaina, B. DNA repair by MGMT, but not AAG, causes a threshold in alkylation-induced colorectal carcinogenesis. *Carcinogenesis* **2015**, *36* (10), 1235–1244. DOI: 10.1093/carcin/bgv114.

Fahrer, J.; Huelsenbeck, J.; Jaurich, H.; Dörsam, B.; Frisan, T.; Eich, M.; Roos, W. P.; Kaina, B.; Fritz, G. Cytolethal distending toxin (CDT) is a radiomimetic agent and induces persistent levels of DNA double-strand breaks in human fibroblasts. *DNA Repair* **2014**, *18*, 31–43. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.03.002.

Fahrer, J.; Kaina, B. Impact of DNA repair on the dose-response of colorectal cancer formation induced by dietary carcinogens. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **2017**, *106* (Pt B), 583–594. DOI: 10.1016/j.fct.2016.09.029.

Fahrer, J.; Kaina, B. O^6-methylguanine-DNA methyltransferase in the defense against N-nitroso compounds and colorectal cancer. *Carcinogenesis* **2013**, *34* (11), 2435–2442. DOI: 10.1093/carcin/bgt275.

Fahrer, J.; Schweitzer, B.; Fiedler, K.; Langer, T.; Gierschik, P.; Barth, H. C2-streptavidin mediates the delivery of biotin-conjugated tumor suppressor protein p53 into tumor cells. *Bioconjugate Chemistry* **2013**, *24* (4), 595–603. DOI: 10.1021/bc300563c.

Falck, J.; Coates, J.; Jackson, S. P. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* **2005**, *434* (7033), 605–611. DOI: 10.1038/nature03442.

Falnes, P. O. Repair of 3-methylthymine and 1-methylguanine lesions by bacterial and human AlkB proteins. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32* (21), 6260–6267. DOI: 10.1093/nar/gkh964.

Falnes, P. O.; Johansen, R. F.; Seeberg, E. AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in Escherichia coli. *Nature* **2002**, *419* (6903), 178–182. DOI: 10.1038/nature01048

Fang, Q. The versatile attributes of MGMT: Its repair mechanism, crosstalk with other DNA repair pathways, and Its role in cancer. *Cancers* **2024**, *16* (2). DOI: 10.3390/cancers16020331.

FDA 2021 U. S. Food & Drug Administration. Control of Nitrosamine impurities in human drugs. Guidance for Industry. **2021**.

FDA 2023 U.S. Food & Drug Administration. Recommended acceptable intake limits for nitrosamine drug substance-related impurities. **2023**.

FDA 2024 U. S. Food & Drug Administration. Control of Nitrosamine impurities in human drugs. Guidance for Industry Revision 2. **2024**.

FDA 2020.01 U. S. Food & Drug Administration. FDA works to mitigate shortages of rifampin and rifapentine after manufacturers find nitrosamine impurities. Update. Available at: https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-nitrosamines-rifampin-and-rifapentine Accessed December 1, **2020**.

FDA 2020.11 U. S. Food & Drug Administration. Laboratory analysis of ranitidine and nizatidine products. Laboratory Tests. Available at: https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/laboratory-tests-ranitidine Accessed December 1, **2020**.

FDA 2020.09 U.S. Food & Drug Administration. Questions and answers: NDMA impurities in metformin products. Q&A. Available at: https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/questions-and-answers-ndma-impurities-metformin-products Accessed December 1, **2020**.

Fenech, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols*, **2007**. *2* (5), pp. 1084-1104. DOI: 10.1038/nprot.2007.77

Fenech, M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research* **2000**, *455* (1-2), 81-95. DOI: 10.1016/s0027-5107(00)00065-8.

Fenech, M.; Morley, A. A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in-vivo ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Research*, **1986**. *161*(2), 193-198. DOI: 10.1016/0027-5107(86)90010-2

Fenech, M.; Morley, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/ Environmental Mutagenesis and Related Subjects* **1985**, *147* (1-2), 29-36. DOI: 10.1016/0165-1161(85)90015-9.

Fenselau, C.; Kan, M. N. N.; Rao, S. S.; Myles, A.; Friedman, O. M.; Colvin, M. Identification of aldophosphamide as a metabolite of cyclophosphamide *in vitro* and *in vivo* in humans. *Cancer Research* **1977,** *37* (8_Part_1), 2538–2543.

Flowers, J. L.; Ludeman, S. M.; Gamcsik, M. P.; Colvin, O. M.; Shao, K. L.; Boal, J. H.; Springer, J. B.; Adams, D. J. Evidence for a role of chloroethylaziridine in the cytotoxicity of cyclophosphamide. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2000**, *45* (4), 335–344. DOI: 10.1007/s002800050049.

Fraczek, J.; Bolleyn, J.; Vanhaecke, T.; Rogiers, V.; Vinken, M. Primary hepatocyte cultures for pharmaco-toxicological studies: at the busy crossroad of various anti-dedifferentiation strategies. *Archives of Toxicology* **2013**, *87* (4), 577–610. DOI: 10.1007/s00204-012-0983-3.

Frick, L. E.; Delaney, J. C.; Wong, C.; Drennan, C. L.; Essigmann, J. M. Alleviation of 1,N6-ethanoadenine genotoxicity by the Escherichia coli adaptive response protein AlkB. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104* (3), 755–760. DOI: 10.1073/pnas.0607377104.

Friedman, H. S.; Kerby, T.; Calvert, H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clinical Cancer Research* **2000**, *6* (7), 2585–2597.

Friedman, O. M.; Wodinsky I.; Myles, A. Cyclophosphamide (NSC-26271)-related phosphoramide mustards: recent advances and historical perspective. *Cancer Treatment Reports* **1976**, *60* (4), 337-346.

Fu, D.; Samson, L. D. Direct repair of 3,N(4)-ethenocytosine by the human ALKBH2 dioxygenase is blocked by the AAG/MPG glycosylase. *DNA Repair* **2012**, *11* (1), 46–52. DOI: 10.1016/j.dnarep. 2011.10. 004.

Gamcsik, M. P.; Dolan, M. E.; Andersson, B. S.; Murray, D. Mechanisms of resistance to the toxicity of cyclophosphamide. *Current Pharmaceutical Design* **1999**, *5* (8), 587–605.

Garcia, H., & Lijinsky, W. Studies of the tumorigenic effect in feeding of nitrosamino acids and of low doses of amines and nitrite to rats. *Cancer Research and Clinical Oncology* **1973** *79* (3), 141-144.

Gates, K. S.; Nooner, T.; Dutta, S. Biologically relevant chemical reactions of N7-alkylguanine residues in DNA. *Chemical Research in Toxicology* **2004**, *17* (7), 839–856. DOI: 10.1021/tx049965c.

Gavini, K.; Parameshwaran, K. Western Blot. *StatPearls Publishing* **2023**.

Geijer, M. E.; Gernaat, A. M.; Moelijker, N.; Brandsma, I.; Hendriks, G. An enhanced metabolization protocol for *in vitro* genotoxicity assessment of *N*-Nitrosamines in mammalian cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **2025**, *66* (4), 210–220. DOI: 10.1002/em.70009.

Gell, D.; Jackson, S. P. Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucleid Acids Research* **1999**, *27* (17), 3494-3502.DOI: 10.1093/nar/27.17.3494.

Giannattasio, M.; Follonier, C.; Tourrière, H.; Puddu, F.; Lazzaro, F.; Pasero, P.; Lopes, M.; Plevani, P.; Muzi-Falconi, M. Exo1 competes with repair synthesis, converts NER intermediates to long ssDNA gaps, and promotes checkpoint activation. *Molecular Cell* **2010**, *40* (1), 50–62. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.09.004.

Gilljam, K. M.; Feyzi, E.; Aas, P. A.; Sousa, M. M. L.; Müller, R.; Vågbø, C. B.; Catterall, T. C.; Liabakk, N. B.; Slupphaug, G.; Drabløs, F.; Krokan, H. E.; Otterlei, M. Identification of a novel, widespread, and functionally important PCNA-binding motif. *The Journal of Cell Biology* **2009**, *186* (5), 645–654. DOI: 10.1083/jcb.200903138.

Glaab, W. E.; Tindall, K. R.; Skopek, T. R. Specificity of mutations induced by methyl methanesulfonate in mismatch repair-deficient human cancer cell lines. *Mutation Research* **1999**, *427* (2), 67–78. DOI: 10.1016/s0027-5107(99)00091-3.

Glatt, H. R.; L. de Balle; F. Oesch. Ethanol- or acetone-pretreatment of mice strongly enhancesthebacterial mutagenicity of dimethylnitrosamine in assays mediated by liver subcellular fraction, but not in host-mediated assays. *Carcinogenesis*,**1981**, *2*, 1057–1061. DOI: 10.1093/Carcin/2.10.1057.

Goeder, A.; Nagel, G.; Kraus, A.; Dörsam, B.; Seiwert, N.; Kaina, B.; Fahrer, J. Lipoic acid inhibits the DNA repair protein O 6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and triggers its depletion in colorectal cancer cells with concomitant autophagy induction. *Carcinogenesis* **2015**, *36* (8), 817–831. DOI: 10.1093/carcin/bgv070.

Goeller, A. H.; Johanssen, S.; Zalewski, A.; Ziegler, V. Quantum chemical calculations of nitrosamine activation and deactivation pathways for carcinogenicity risk assessment. *Frontiers in Pharmacology* ***2024***, *15*. DOI: 10.3389/fphar.2024.1415266.

Gold, B.; Salmasi, S. Carcinogenicity tests of acetoxymethylphenylnitrosamine and benzenediazonium tetrafluoroborate in syrian hamsters. *Cancer Letters* **1982**, *15* (3), 289-300. DOI:10.1016/0304-3835(82)90130-6.

Gold, B.; Salmasi, S.; Linder, W.; Althoff, J. Biological and chemical studies involving methyl-t-butylnitrosamine, a non-carcinogenic nitrosamine. *Carcinogenesis* **1981**, *2* (6), 529–532. DOI: 10.1093/carcin/2.6.529.

Goldstein, M.; Roos, W. P.; Kaina, B. Apoptotic death induced by the cyclophosphamide analogue mafosfamide in human lymphoblastoid cells: contribution of DNA replication, transcription inhibition and Chk/p53 signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2008**, *229* (1), 20–32. DOI: 10.1016/j.taap.2008.01.001.

Gollapudi, B. B.; Jackson, K. M.; Stott W. T. Hepatic lacI and cII mutation in transgenic (lambdaLIZ) rats treated with dimethylnitrosamine. *Mutation Research* **1998**, *419* (1-3), 131 - 135. DOI: 10.1016/s1383-5718(98)00132-6.

Gómez-Lechón, M. J.; Lahoz, A.; Jiménez, N.; Vicente Castell, J.; Donato, M. T. Cryopreservation of rat, dog and human hepatocytes: influence of preculture and cryoprotectants on recovery, cytochrome P450 activities and induction upon thawing. *Xenobiotica* **2006**, *36* (6), 457–472. DOI: 10.1080/00498250600674352.

Goodall, C. M.; Lijinsky, W.; Tomatis, L.; Wenyon, C. E. Toxicity and oncogenicity of nitrosomethylaniline and nitrosomethylcyclohexylamine. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1970**, *17* (2), 426–432. DOI: 10.1016/0041-008X(70)90200-0.

Goodwin, J. F.; Knudsen, K. E. Beyond DNA repair: DNA-PK function in cancer. *Cancer Discovery* **2014**, *4* (10), 1126–1139. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0358.

Green, M. R.; Sambrook, J. Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols* **2020**. DOI: 10.1101/pdb. Prot100412.

Griskevicius, L.; Yasar, U.; Sandberg, M.; Hidestrand, M.; Eliasson, E.; Tybring, G.; Hassan, M.; Dahl, M. L. Bioactivation of cyclophosphamide: the role of polymorphic CYP2C enzymes. *European Journal of Clinical Pharmacology* **2003**, *59* (2), 103-109. DOI: 10.1007/s00228-003-0590-6.

Grombacher, T.; Eichhorn, U.; Kaina, B. p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O^6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents. *Oncogene* **1998**, *17* (7), 845–851. DOI: 10.1038/sj.onc.1202000.

Grombacher, T.; Mitra, S.; Kaina, B. Induction of the alkyltransferase (MGMT) gene by DNA damaging agents and the glucocorticoid dexamethasone and comparison with the response of base excision repair genes. *Carcinogenesis* **1996**, *17* (11), 2329–2336. DOI: 10.1093/carcin/17.11.2329.

Guo, X.; Seo, J. E.; Xu, H.; Yan, J.; Malhi, P.; Atrakchi, A. H.; Mcgovern, T.; Davis Bruno, K. L.; Heflich, R. H.; Chen, T. Integration of the rat liver micronucleus assay into a 28-day treatment protocol: testing the genotoxicity of four small-molecule nitrosamines with different carcinogenic potencies and tumor target specificities. *Toxicological Sciences* **2025**. DOI: 10.1093/toxsci/kfaf002.

Guo, Z.; Heydari, A.; Richardson, A. Nucleotide exzision repair of actively transcribed versus nontranscribed DNA in rat hepatocytes: Effect of age and dietary restriction. *Experimental Cell Research* **1998**, *245* (1), 228-238. DOI: 10. 1016/excr. 1998. 4269.

Gupta, R.; Schrooders, Y.; Hauser, D.; van Herwijnen, M.; Albrecht, W.; Braak, B. ter; Brecklinghaus, T.; Castell, J. V.; Elenschneider, L.; Escher, S.; Guye, P.; Hengstler, J. G.;

Ghallab, A.; Hansen, T.; Leist, M.; Maclennan, R.; Moritz, W.; Tolosa, L.; Tricot, T.; Verfaillie, C.; Walker, P.; van de Water, B.; Kleinjans, J.; Caiment, F. Comparing *in vitro* human liver models to *in vivo* human liver using RNA-Seq. *Archives of Toxicology* **2021**, *95* (2), 573–589. DOI: 10.1007/s00204-020-02937-6.

Gurtoo, H. L.; Hipkens, J. H.; Sharma, S. D. Role of glutathione in the metabolism-dependent toxicity and chemotherapy of cyclophosphamide. *Cancer Research* **1981**, *41*, 3584-3591.

Guttenplan, J. B. Effects of Tobacco Carcinogens *N'*-Nitrosonornicotine and Dibenzo [*a,l*]pyrene individually and in combination on DNA damage in human oral leukoplakia and on mutagenicity and mutation profiles in *lacI* mouse tongue. *Chemical Research in Toxicology* **2019**, *32*, 9, 1893–1899

Guttenplan, J. B. *N*-nitrosamines: bacterial mutagenesis and *in vitro* metabolism. *Mutation Research* **1987**, *186* (2), 81–134. DOI: 10.1016/0165-1110(87)90026-1.

Haas, H.; Mohr, U.; Krüger, F. W. Comparative studies with different doses of N-nitrosomorpholine, *N*-nitrosopiperidine, *N*-nitrosomethylurea, and dimethylnitrosamine in syrian golden hamsters. *Journal of the National Cancer Institute* **1973**, *51* (4), 1295–1301. DOI: 10.1093/jnci/51.4.1295.

Hammer, H.; Schmidt, F.; Marx-Stoelting, P.; Pötz, O.; Braeuning, A. Cross-species analysis of hepatic cytochrome P450 and transport protein expression. *Archives of Toxicology* **2021**, *95* (1), 117–133. DOI: 10.1007/s00204-020-02939-4.

Han, Y. S.; Lee, C. S. Antidepressants reveal differential effect against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in differentiated PC12 cells. *European Journal of Pharmacology* **2009**, *604* (1-3), 36–44. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.12.025.

Harris, L. C.; Potter, P. M.; Remack, J. S.; Brent, T. P. A Comparison of human O^6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter activity in mer^+ and mer^- cells. *Cancer Research* **1992**, *52* (22),6404-6406.

Harris, L. C.; Remack, J. S.; Houghton, P. J.; Brent, T. P. Wild-type p53 suppresses transcription of the human O^6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Research* **1996***, 56*, 2029–2032.

Harris, L. C.; Potter, P. M.; Tano, K.; Shiota, S.; Mitra, S.; Brent, T. P. Characterization of the promoter region of the human O^6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Nucleic Acids Research* **1991**, *19* (22), 6163–6167. DOI: 10.1093/nar/19.22.6163.

Hashizume, T.; Yoshitomi, S.; Asahi, S.; Matsumura, S.; Chatani, F.; Oda, H. *In vitro* micronucleus test in HepG2 transformants expressing a series of human cytochrome P450 isoforms with chemicals requiring metabolic activation. *Mutation Research,* **2009**, *677* (1-2), 1–7. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2009.03.009.

Hatsukami, D.; Zeller, M.; Gupta, P. C.; Parascandola, M.; Asma, S. Smokeless Tobacco and Public Health: A Global Perspective. US National Cancer Institute. **2014.**

Hayaishi, O.; Ueda, K. Poly(ADP-ribose) and ADP-ribosylation of proteins. *Annual Review of Biochemistry* **1977**, *46,* 95-116. DOI: 10.1146/annurev.bi.46.070177.000523.

Hecht, S. S. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Chemical Research in Toxicology* **1998,** *11* (6), 559–603. DOI: 10.1021/tx980005y.

Hecht, S. S. DNA adduct formation from tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Mutation research* **1999**, *424* (1-2), 127–142. DOI: 10.1016/s0027-5107(99)00014-7.

Hecht, S. S. *N*-nitroso-2-hydroxymorpholine, a mutagenic metabolite of *n*-nitrosodiethanolamine, *Carcinogenesis* **1984,** *5* (12) (1984) 1745–1747, https://doi.org/10.1093/carcin/5.12.1745.

Hecht, S. S. Progress and challenges in selected areas of tobacco carcinogenesis. *Chemical Research in Toxicology* **2008,** *21* (1), 160–171. DOI: 10.1021/tx7002068.

Hecht, S. S.; Chen, C. B.; Hirota, N.; Ornaf, R. M.; Tso, T. C.; Hoffmann, D. Tobacco-specific nitrosamines: formation from nicotine *in vitro* and during tobacco curing and carcinogenicity in strain A mice. *Journal of the National Cancer Institute* **1978**, *60* (4), 819–824. DOI: 10.1093/jnci/60.4.819.

Hecht, S. S.; Chen, C. B.; Ohmori, T.; Hoffmann, D. Comparative carcinogenicity in F344 rats of the tobacco-specific nitrosamines, *N'*-nitrosonornicotine and 4-(*N*-methyl-*N*-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Research* **1980**, *40* (2), 298–302.

Hecht, S. S.; Lijinsky, W.; Kovatch, R. M.; Chung, F. L.; Saavedra, J. E. Comparative tumorigenicity of N-nitroso-2-hydroxymorpholine, *N*-nitrosodiethanolamine and N-nitrosomorpholine in A/J mice and F344 rats. *Carcinogenesis* **1989**, *10* (8), 1475–1477. DOI: 10.1093/carcin/10.8.1475.

Hecht, S. S., Reiss, B., Lin, D., Williams, G.M. Metabolism of N'-nitrosonornicotine by cultured rat esophagus. *Carcinogenesis*. **1982**;3(4):453-6. doi: 10.1093/carcin/3.4.453. PMID: 7094208.

Hecht, S. S.; Trushin, N.; Castonguay, A.; Rivenson, A. Comparative tumorigenicity and DNA methylation in F344 rats by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and *N*-nitrosodimethylamine. *Cancer Research*, **1986**, *46*, 498–502.

Heflich, R. H.; Bishop, M. E.; Mittelstaedt, R. A.; Yan, J.; Guerrero, S. K.; Sims, A. M.; Mitchel, K.; Moore, N.; Li, X.; Mei, N.; Elespuru, R. K.; King, S. T.; Keire, D. A.; Kruhlak, N. L.; Dorsam, R. T.; Raw, A. S.; Davis Bruno, K. L.; McGovern, T. J.; Atrakchi, A. H. Optimizing the detection of *N*-nitrosamine mutagenicity in the Ames test. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2024**, *153*, 105709.

Hengstler, J. G.; Utesch, D.; Steinberg, P.; Platt, K. L.; Diener, B.; Ringel, M.; Swales, N.; Fischer, T.; Biefang, K.; Gerl, M.; Böttger, T. Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available *in vitro* model fort he evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. Drug *Metabolism Reviews* **2000**, *32* (1), 81-118. DOI: 10.1081/dmr-10010056.

Herzog, N.; Katzenberger, N.; Martin, F.; Schmidtke, K. U.; Küpper, J. H. Generation of cytochrome P450 3A4-overexpressing HepG2 cell clones for standardization of hepatocellular testosterone 6β-hydroxylation activity. *Journal of Cellular Biotechnology* **2015**, *1* (1), 15–26. DOI: 10.3233/JCB-15002.

Hewitt, N. J.; Hewitt, P. Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. *Xenobiotica* **2004,** *34* (3), 243–256. DOI: 10.1080/00498250310001657568.

Heyer, W. D.; Ehmsen, K. T.; Liu, J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual Review of Genetics* **2010***, 44*, 113-139. DOI: 10.1146/annurev-genet-051710-150955.

Hickman, D.; Wang, J. P.; Wang, Y.; Unadkat, J. D. Evaluation of the selectivity of *In vitro* probes and suitability of organic solvents for the measurement of human cytochrome P450 monooxygenase activities. *Drug Metabolism and Disposition* **1998**, *26* (3), 207–215.

Himo, F.; Demko, Z. P.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B. Mechanisms of Tetrazole formation by addition of azide to nitriles. *Journal of the Americal Chemical Society* **2002**,*124* (41):12210–12216.

Hoffmann, D.; Brunnemann, K. D.; Rivenson, A.; Hecht, S. S. *N*-nitrosodiethanolamine: analysis, formation in tobacco products and carcinogenicity in Syrian golden hamsters. *IARC scientific publications* **1982**, (41), 299–308.

Hoffmann, D.; Castonguay, A.; Rivenson, A.; Hecht, S. S. Comparative carcinogenicity and metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and *N*'-nitrosonornicotine in Syrian golden hamsters. *Cancer Research* **1981**, *41* (6), 2386–2393. DOI: 10.1021/ja0206644.

Hoy, C. A.; Thompson, L. H.; Mooney, C. L.; Salazar, E. P. Defective DNA cross-link removal in chinese hamster cell mutants hypersensitive to bifunctional alkylating agents. *Cancer Research* **1985**, *45* (4), 1737-1743.

Huang, Z.; Roy, P.; Waxman, D. J. Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. *Biochemical Pharmacology* **2000**, *59* (8), 961–972. DOI: 10.1016/S0006-2952(99)00410-4.

Huber, W. W.; Scharf, G.; Nagel, G.; Prustomersky, S.; Schulte-Hermann, R.; Kaina, B. Coffee and its chemopreventive components Kahweol and Cafestol increase the activity of O^6-methylguanine-DNA methyltransferase in rat liver--comparison with phase II xenobiotic metabolism. *Mutation Research* **2003**, *522* (1-2), 57–68. DOI: 10.1016/s0027-5107(02)00264-6.

IARC 2023 International Agency for Research on Cancer. Available from: https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2023/06/IARC_MONO_classification_2023_updated.png.**2023**.

IARC 2012 International Agency for Research on Cancer. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Personal Habits and Indoor Combustions. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 100E. N'-*

NITROSONORNICOTINE AND 4-(METHYLNITROSAMINO)-1-(3-PYRIDYL)-1-BUTANONE. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304392/. **2012.**

IARC 2007 International Agency for Research on Cancer. Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific *N*-Nitrosamines. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* **2007** *Volume 89*.

IARC 1978 International Agency for Research on Cancer. Some *N*-nitroso compounds. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans* 1978, *Volume 17*.

IARC 2000 International Agency for Research on Cancer. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Industrial Chemicals. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 77. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK390856/.**2000.**

ICH M7 2023 International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use M7 (R2). Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. EMA/CHMP/ICH/83812/2013. **2023**.

ICH M7 2023 International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use M7 (R2*)*. Questions and Answers on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. EMA/CHMP/ICH/321999/2020.**2023**.

ICH Topic Q3A (R2) 2006 International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use Q3A (R2) Impurities in new Drug Substances. CPMP/ICH/2737/99. **2006.**

Inami, K.; Shiino, J.; Hagiwara, S.; Takeda, K.; Mochizuki, M. Transnitrosation of non-mutagenic *N*-nitrosoproline forms mutagenic *N*-nitroso-*N*-methylurea. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, *23* (13), 3297–3302. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.04.058.

Ishibashi, T.; Kawabata, T. Formation of *N*-nitrosoproline by reacting nitrite with L-citrulline and L-arginine. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry* **1981**, *29* (5), 1098–1099. DOI: 10.1021/jf00107a054.

Ishinishi, N.; Tanaka, A.; Hisanaga, A.; Inamasu, T.; Hirata, M. Comparative study on the carcinogenicity of *N*-nitrosodiethylamine, *N*-nitrosodimethylamine, *N*-nitrosomorpholine, *N*-nitrosopyrrolidine and *N*-nitrosodi-*n*-propylamine to the lung of Syrian golden hamsters following intermittent instillations to the trachea. *Carcinogenesis* **1988**, *9* (6), 947–950. DOI: 10.1093/carcin/9.6.947.

Iwase, M.; Kurata, N.; Ehana, R.; Nishimura, Y.; Masamoto, T.; Yasuhara, H. Evaluation of the effects of hydrophilic organic solvents on CYP3A-mediated drug-drug interaction *in*

vitro. *Human & Experimental Toxicology* **2006**, *25* (12), 715–721. DOI: 10.1177/0960327106071979.

Jakszyn, P.; Bingham, S.; Pera, G.; Agudo, A.; Luben, R.; Welch, A.; Boeing, H.; Del Giudice, G.; Palli, D.; Saieva, C.; Krogh, V.; Sacerdote, C.; Tumino, R.; Panico, S.; Berglund, G.; Simán, H.; Hallmans, G.; Sanchez, M. J.; Larrañaga, N.; Barricarte, A.; Chirlaque, M. D.; Quirós, J. R.; Key, T. J.; Allen, N.; Lund, E.; Carneiro, F.; Linseisen, J.; Nagel, G.; Overvad, K.; Tjonneland, A.; Olsen, A.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Ocké, M. O.; Peeters, P. H.; Numans, M. E.; Clavel-Chapelon, F.; Trichopoulou, A.; Fenger, C.; Stenling, R.; Ferrari, P.; Jenab, M.; Norat, T.; Riboli, E.; Gonzalez, C. A. Endogenous versus exogenous exposure to N-nitroso compounds and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST) study. *Carcinogenesis* **2006**, *27* (7), 1497–1501. DOI: 10.1093/carcin/bgl019.

Jalas J. R. ; Hecht, S. S.; Murphy, S. E. Cytochrome P450 enzymes as catalysts of metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a tobacco specific carcinogen. *Chemical Research in Toxicology* **2005**, *18* (2), 95-110. DOI:10.1021/tx049847p.

Jancova, P.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherova, E. Phase II drug metabolizing enzymes, Biomedical Papers **2010**, *154* (2), 103–116. DOI: 10.5507/ bp.2010.017.

Ji, L., Schüürmann, G. Computational evidence for α-nitrosamino radical as initial metabolite for both the P450 dealkylation and denitrosation of carcinogenic nitrosamines. *The Journal of Physical Chemistry*. **2012**, *116* (2), 903–912. DOI: 10.1021/jp206570n.

Jing A.; Yue-Cheng, H.; Qing-Zhi, X.; Li-Jun, Z.; Zeng-Fu, S.; Bo. H.; Yu, W.; Xiao-Dan, L.; De-Chang, W.; Ping-Kun, Z. DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *Biochemistry and Molecular Biology* **2010**, *11* (18). DOI: 10.1186/1471-2199-11-18.

Johannessen, T. C.; Prestegarden, L.; Grudic, A.; Hegi, M. E.; Tysnes, B. B.; Bjerkvig, R. The DNA repair protein ALKBH2 mediates temozolomide resistance in human glioblastoma cells. *Neuro-Oncology* **2013**, *15 (3)*, 269–278. DOI: 10.1093/neuonc/nos301.

Johnson, G. E.; Dobo, K.; Gollapudi, B.; Harvey, J.; Kenny, J.; Kenyon, M.; Lynch, A.; Minocherhomji, S.; Nicolette, J.; Thybaud, V.; Wheeldon, R.; Zeller, A. Permitted daily exposure limits for noteworthy *N*-Nitrosamines. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **2021**, *62*, 293-305. DOI: 10.1002/em22446.

Jolly, R. A.; Cornwell, P. D.; Noteboom, J.; Sayyed, F. B.; Thapa, B.; & Buckley, L. A. Estimation of acceptable daily intake values based on modeling and in vivo mutagenicity of NDSRIs of fluoxetine, duloxetine and atomoxetine. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **2024**, *152*, DOI: 10.1016/j.yrtph.2024.105672.

Kaina, B.; Christmann, M.; Naumann, S.; Roos, W. P. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair* **2007,** *6* (8), 1079–1099. DOI: 10.1016/j.dnarep.2007.03.008.

Kanebratt, K. P.; Andersson, T. B. Evaluation of HepaRG cells as an *in vitro* model for human drug metabolism studies. *Drug Metabolism and Disposition* **2008**, *36* (7), 1444-1452. DOI: 10.1124/dmd.107. 020016.

Katsube, T.; Mori, M.; Tsuji, H.; Shiomi, T.; Wang, B.; Liu, Q.; Nenoi, M.; Onoda, M. Most hydrogen peroxide-induced histone H2AX phosphorylation is mediated by ATR and is not dependent on DNA double-strand breaks. *Journal of Biochemistry* **2014**, *156* (2), 85–95. DOI: 10.1093/jb/mvu021.

Kawashiro, T.; Yamashita, K.; Zhao, X. J.; Koyama, E.; Tani, M.; Chiba, K.; Ishizaki, T. A study on the metabolism of etoposide and possible interactions with antitumor or supporting agents by human liver microsomes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1998**, *286* (3), 1294–1300.

Kawate, H.; Sakumi, K.; Tsuzuki, T.; Nakatsuru, Y.; Ishikawa, T.; Takahashi, S.; Takano, H.; Noda, T.; Sekiguchi, M. Separation of killing and tumorigenic effects of an alkylating agent in mice defective in two of the DNA repair genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, *95* (9), 5116–5120. DOI: 10.1073/pnas.95.9.5116.

Kay, J. E.; Corrigan, J. J.; Armijo, A. L.; Nazari, I. S.; Kohale, I. N.; Torous, D. K.; Avlasevich, S. L.; Croy, R. G.; Wadduwage, D. N.; Carrasco, S. E.; Dertinger, S. D.; White, F. M.; Essigmann, J. M.; Samson, L. D.; Engelward, B. P. Excision of mutagenic replication-blocking lesions suppresses cancer but promotes cytotoxicity and lethality in nitrosamine-exposed mice. *Cell Reports* **2021**, *34* (11), 108864. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.108864.

Keefer, L. K.; Anjo, T.; Heur, Y. H.; Yang, C. S.; Mico, B. A. Potential for metabolic deactivation of carcinogenic *N*-nitrosodimethylamine *in vivo*. *IARC Scientific Publications* **1987**, 113–116.

Khatua, S.; Simal-Gandara, J.; Acharya, K. Understanding immune-modulatory efficacy *in vitro*. *Chemico-Biological Interactions* **2022,** *352*, 109776. DOI: 10.1016/j.cbi.2021.109776.

Khoury, L.; Zalko, D.; Audebert, M. Validation of high-throughput genotoxicity assay screening using γH2AX in-cell western assay on HepG2 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **2013**, *54* (9), 737–746. DOI: 10.1002/em.21817.

Kimura, H.; Hokari, R.; Miura, S.; Shigematsu, T.; Hirokawa, M.; Akiba, Y.; Kurose, I.; Higuchi, H.; Fujimori, H.; Tsuzuki, Y.; Serizawa, H.; Ishii, H. Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut* **1998**, *42* (2), 180–187. DOI: 10.1136/gut.42.2.180

Kirsch-Volders M.; Sofuni, T.; Aardema, M.; Albertini, S.; Eastmond, D.; Fenech, M.; Ishidate, M. Jr.; Kirchner, S.; Lorge, E.; Morita, T.; Norppa, H.; Surrallés, J.; Vanhauwaert, A.; Wakata, A. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research* **2003**, *540* (2),153-63. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2003.07.005.

Klungland, A.; Lindahl, T. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: Reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO Journal* **1997**, *16*, 3341–3348. DOI: 10.1093/emboj/16.11.3341

Knasmüller, S.; Parzefall, W.; Sanyal, R.; Ecker, S.; Schwab, C.; Uhl, M.; Mersch-Sundermann, V.; Williamson, G.; Hietsch, G.; Langer, T.; Darroudi, F.; Natarajan, A. T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research* **1998**, *402* (1-2), 185–202. DOI: 10.1016/s0027-5107(97)00297-2.

Knasmüller, S.; Stehlik, G.; Mohn, G. Studies on the metabolic activation of diethanolnitrosamine in animal-mediated and *in vitro* assays using Escherichia coli K-12 343 /113 as an indicator. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **1986**, *112*, 266-271. DOI: 10.1007/BF00395921.

Koepke, S. R.; Kroeger-Koepke, M. B.; Michejda, C. J. Evidence for an unstable DNA adduct from *N*-nitroso-*N*-methylaniline. *Chemical Research in Toxicology* **1990,** *3* (1), 17–20. DOI: 10.1021/tx00013a003.

Koike, G.; Maki, H.; Takeya, H.; Hayakawa, H.; Sekiguchi, M. Purification, structure, and biochemical properties of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *Journal of Biolgical Chemistry* **1990**, *265*, 14754–14762.

Kondo, N.; Takahashi, A.; Ono, K.; Ohnishi, T. DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. *Journal of Nucleic Acids* **2010**, *2010* (543531). DOI: 10.4061/2010/543531.

Korkmaz, A.; Topal, T.; Oter, S. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biology and Toxicology* **2007**, *23* (5), 303-12. DOI: 10.1007/s10565-006-0078-0

Krasikova, Y.; Rechkunova, N.; Lavrik, O. Nucleotide Excision Repair: From Molecular Defects to Neurological Abnormalities. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (12). DOI: 10.3390/ijms22126220.

Kraus, A.; McKeague, M.; Seiwert, N.; Nagel, G.; Geisen, S. M.; Ziegler, N.; Trantakis, I. A.; Kaina, B.; Thomas, A. D.; Sturla, S. J.; Fahrer, J. Immunological and mass spectrometry-based approaches to determine thresholds of the mutagenic DNA adduct O^6-methylguanine *in vivo*. *Archives of Toxicology* **2019**, *93* (2), 559–572. DOI: 10.1007/s00204-018-2355-0.

Kroeger-Koepke, M. B.; Koepke, S. R.; McClusky, G. A.; Magee, P. N.; Michejda, C. J. alpha-Hydroxylation pathway in the *in vitro* metabolism of carcinogenic nitrosamines: *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitroso-*N*-methylaniline. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1981**, *78* (10), 6489–6493. DOI: 10.1073/pnas.78.10.6489.

Kroes, R. ; Renwick, A. G.; Cheeseman, M. A.; Kleiner, J.; Mangelsdorf, I.; Piersma, A.; Schilter, B.; Schlatter, J.; Van Schothorst, F.; Vos, J. G.; Würtzen, G. Structure-based thresholds of toxicological concern (TTC): Guidance for application to substances present at low

levels in the diet. *Food and Chemical Toxicology* **2004**, *42***,** 65–83. DOI: 10.1016/j.fct.2003.08.006.

Krokan, H. E.; Bjørås, M. Base excision repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2013**, *5* (4), a012583. DOI: 10.1101/cshperspect.a012583

Krüger, F. W. Metabolismus von Nitrosaminen in vivo I. Über die β-Oxidation aliphatischer Di-*n*-alkylnitrosamine: Die Bildung von 7-Methylguanin neben 7-Propyl- bzw. 7-Butylguanin nach Applikation von Di-*n*-propyl- oder Di-*n*-butylnitrosamin. *Zeitschrift für Krebsforschung und klinische Onkologie*. *Cancer Research and Clinical Oncology* **1971**, *76* (2), 145–154. DOI: 10.1007/BF00284425.

Kruhlak, N. L., Schmidt, M., Froetschl, R., Graber, S., Haas, B., Horne, I.; Horne, S.; King, S. T.; Koval, I. A.; Kumaran, G.; Langenkamp, A.; McGovern, T. J.; Peryea, T.; Sanh, A.; Ferreira, A. S.; Van Aerts, L.; Vespa, A.; Whomsley, R. Determining recommended acceptable intake limits for *N*-nitrosamine impurities in pharmaceuticals: development and application of the Carcinogenic Potency Categorization Approach (CPCA). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2024**, *150*- DOI: 10.1016/j.yrtph.2024.105640.

Krupina, K., Goginashvili, A., & Cleveland, D. W. Causes and consequences of micronuclei. *Current Opinion in Cell Biology*, **2021**, *70*, 91-99. DOI: 10.1016/j.ceb.2021.01.004.

Kuo, L. J.; Yang, L. X. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* **2008**, *22* (3), 305–309.

Kuroki, T.; Drevon, C.; Montesano, R. Microsome-mediated mutagenesis in V79 Chinese Hamster cells by various Nitrosamines. *Cancer Research* **1977**, *37*, 1044-1050.

Kusumoto, R.; Masutani, C.; Sugasawa, K.; Iwai, S.; Araki, M.; Uchida, A.; Mizukoshi, T.; Hanaoka, F. Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair *in vitro*. *Mutation Research* **2001**, *485* (3), 219–227. DOI: 10.1016/s0921-8777(00)00082-3.

Langelier, M. F.; Planck, J. L.; Roy, S.; Pascal, J. M. Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286* (12), 10690–10701. DOI: 10.1074/jbc.M110.202507.

Lao, Y.; Villalta, P. W.; Sturla, S. J.; Wang, M.; Hecht, S. S. Quantitation of pyridyloxobutyl DNA adducts of tobacco-specific nitrosamines in rat tissue DNA by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* **2006**, *19*, 674–682. DOI: 10.1021/tx050351x.

Latriano, L.; Goldstein, B. D.; Witz, G. Formation of muconaldehyde, an open-ring metabolite of benzene, in mouse liver microsomes: an additional pathway for toxic metabolites.

Proceedings of the National Academy of Sciences **1986**, *83* (21), 8356–8360. DOI: 10.1073/pnas.83.21.8356.

LCDB, 2016 Lhasa. Carcinogenicity Database. https://carcdb.lhasalimited.org/. **2016**.

Lee, F. Y. F. Glutathione diminishes the anti-tumour activity of 4-hydroxyperoxycyclophosphamide by stabilizing its spontaneous breakdown to alkylating metabolites. *British Journal of Cancer* **1991**, *63* (1), 45-50. DOI: 10.1038/bjc.1991.10.

Lee, M.; Ishizaki, H.; Brady, J. F.; Yang, C. S. Substrate Specificity and Alkyl Group Selectivity in the Metabolism of N-Nitrosodialkylamines, *Cancer Research* **1989** *49*, 1470–1474 (accessed June 30, 2021), https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov /2924300/.

Levin, D. S.; McKenna, A. E.; Motycka, T. A.; Matsumoto, Y.; Tomkinson, A. E. Interaction between PCNA and DNA ligase I is critical for joining of Okazaki fragments and long-patch base-excision repair. *Current biology* **2000**, *10* (15), 919–922. DOI: 10.1016/s0960-9822(00)00619-9.

Lewin, M. H.; Bailey, N.; Bandaletova, T.; Bowman, R.; Cross, A. J.; Pollock, J.; Shuker, D. E. G.; Bingham, S. A. Red meat enhances the colonic formation of the DNA adduct O^6-carboxymethyl guanine: implications for colorectal cancer risk. *Cancer Research* **2006**, *66* (3), 1859–1865. DOI: 10.1158/0008-5472.

Lewis, D. F. V.; Ito, Y. Human CYPs involved in drug metabolism: structures, substrates and binding affinities. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **2010**, *6* (6), 661–674. DOI: 10.1517/17425251003674380.

Lhasa. Carcinogenicity Database. https://carcdb.lhasalimited.org/.

Li, D., Han, Y., Meng, X., Sun, X., Yu, Q., Li, Y., Wan, L.; Huo, Y.; Guo, C. Effect of regular organic solvents on cytochrome P450-mediated metabolic activities in rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition,* **2010** *38* (11), 1922-1925. doi:10.1124/dmd.110.033894

Li, L.; Perdigao, J.; Pegg, A. E.; Lao, Y.; Hecht, S. S.; Lindgren, B. R.; Reardon, J. T.; Sancar, A.; Wattenberg, E. V.; Peterson, L. A. The influence of repair pathways on the cytotoxicity and mutagenicity induced by the pyridyloxobutylation pathway of tobacco-specific nitrosamines. *Chemical Research in Toxicology* **2009**, *22* (8), 1464-1472. DOI: 10.1021/tx9001572

Li, X.; He, X.; Le, Y.; Guo, X.; Bryant, M. S.; Atrakchi, A. H.; McGovern, T. J.; Davis-Bruno, K. L.; Keire, D. A.; Heflich, R. H.; Mei, N. Genotoxicity evaluation of nitrosamine impurities using human TK6 cells transduced with cytochrome P450s. *Archives of Toxicology* **2022**, *96* (11), 3077–3089. DOI: 10.1007/s00204-022-03347-6.

Li, X.; Le, Y.; Guo, X.; King, S. T.; Dorsam, R. T.; Atrakshi, A. H.; McGovern, T. J.; Davis-Bruno, K. L.; Keire, D. A.; Heflich, R. H.; Mei, N. Mutagenicity and genotoxicity evaluation of 15

nitrosamine drug substance-related impurities in human TK6 cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2024**, *154*. DOI: 10.1016/j.yrtph.2024.105730.

Li, X.; Ye, Z.; Wang, J.; Lin, P.; Zhang, X.; Xie, S.; Chen, C. Intake of tobacco nitrosamines of smokers in various provinces of China and their cancer risk: A meta-analysis. *Journal of Environmental Sciences* **2024**, *141*, 249–260. DOI: 10.1016/j.jes.2023.05.018.

Li, Y.; Hecht, S. S. Metabolism and DNA adduct formation of tobacco-specific *N*-Nitrosamines. *International Journal of Molecular Sciences*, **2022**, *23* (9), 5109. DOI:10.3390/ijms23095109

Lieber, M. R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry* **2010**, *79*, 181-211. DOI: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131.

Lijinsky, W. *N*-Nitroso compounds in the diet. *Mutation Research* **1999**, *443* (1-2), 129–138. DOI: 10.1016/s1383-5742(99)00015-0.

Lijinsky, W. Structure-activity relations in carcinogenesis by *N*-nitroso compounds. *Cancer Metastasis Reviews* **1987**, *6*(3), 301-356. DOI:10.1007/BF00144269.Lijinsky, W. Species differences in nitrosamine carcinogenesis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **1984**, *108* (1), 46–55. DOI: 10.1007/BF00390972.

Lijinsky, W. The metabolism and cellular interactions of some aliphatic nitrogenous carcinogens. *Cancer Letters* **1985**, *26* (1), 33–42. DOI: 10.1016/0304-3835(85)90170-3.

Lijinsky, W.; Losikoff, A M, Sansone, E. B. Penetration of rat skin by N-Nitrosodiethanolamine and *N*-Nitrosomorpholine **1981**, *66* (1): 125-7.

Lijinsky, W.; Reuber, M. D.; Manning, W. B. Potent carcinogenicity of nitrosodiethanolamine in rats. *Nature* **1980**, *288* (5791), 589–590. DOI: 10.1038/288589a0.

Liu, L.; Li, J.; Ke, Y.; Zeng, X.; Gao, J.; Ba, X.; Wang, R. The key players of parthanatos: opportunities for targeting multiple levels in the therapy of parthanatos-based pathogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2022**, *79* (1), 60. DOI: 10.1007/s00018-021-04109

Liu, Y.; Glatt, H. Mutagenicity of *N*-nitrosodiethanolamine in a V79-derived cell line expressing two human biotransformation enzymes. *Mutation Research* **2008**, *643* (1-2), 64–69. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2008.06.003.

Loechler, E. L.; Green, C. L.; Essigmann, J. M. *In vivo* mutagenesis by O^6-methylguanine built into a unique site in a viral genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1984**, *81* (20), 6271–6275. DOI: 10.1073/pnas.81.20.6271.

Loeppky, R. N.; Fuchs, A.; Janzowski, C.; Humberd, C.; Goelzer, P.; Schneider, H.; Eisenbrand, G. Probing the mechanism of the carcinogenic activation of *N*-nitrosodiethanolamine with deuterium isotope effects: *in vivo* induction of DNA single-strand breaks and related *in*

vitro assays. *Chemical Research in Toxicology* **1998**, *11* (12), 1556–1566. DOI: 10.1021/tx9801716.

Loeppky, R. N.; Goelzer, P. Microsome-mediated oxidation of *N*-nitrosodiethanolamine (NDELA), a bident carcinogen. *Chemical Research in Toxicology* **2002**, *15* (4), 457–469. DOI: 10.1021/tx000267b.

Loeppky, R. N.; Ye, Q.; Goelzer, P.; Chen, Y. DNA adducts from *N*-nitrosodiethanolamine and related beta-oxidized nitrosamines *in vivo*: (32)P-postlabeling methods for glyoxal- and O^6-hydroxyethyldeoxyguanosine adducts. *Chemical Research in Toxicology* **2002**, *15* (4), 470–482. DOI: 10.1021/tx0101393.

Longhin, E. M.; El Yamani, N., Rundén-Pran, E.; Dusinska, M. The alamar blue assay in the context of safety testing of nanomaterials. *Frontiers in Toxicology* **2022**, *4*. Doi: 10.3389/ftox.2022.981701.

Lonsdale, R.; Houghton, K. T.; Żurek, J.; Bathelt, C. M.; Foloppe, N.; Groot, M. J. de; Harvey, J. N.; Mulholland, A. J. Quantum mechanics/molecular mechanics modeling of regioselectivity of drug metabolism in cytochrome P450 2C9. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (21), 8001–8015. DOI: 10.1021/ja402016p.

López-Terrada, D.; Cheung, S. W.; Milton, MBA.; Finegold, J.; Knowles, B.B. HepG2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Human Pathology* **2009**, *40* (10), 1512-1515. DOI: 10.1016/j.humanpath. 2009. 07. 003.

Lorr, N. A.; Tu, Y.Y.; Yang, C. S. The nature of nitrosamine denitrosation by rat liver microsomes. *Carcinogenesis* **1992***, 3* (1), 1039-1042.

Lovejoy, C. A.; Cortez, D. Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA Repair* **2009**, *8* (9), 1004–1008. DOI: 10.1016/j.dnarep.2009.04.006.

Lundberg, J. O.; Weitzberg, E. Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract. *Gut* **2013**, *62* (4), 616–629. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301649.

Lundin, C.; North, M.; Erixon, K.; Walters, K.; Jenssen, D.; Goldman, A. S. H.; Helleday, T. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable *in vivo* DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research* **2005**, *33* (12), 3799–3811. DOI: 10.1093/nar/gki681.

Lunn, J. C.; Kuhnle, G.; Mai, V.; Frankenfeld, C.; Shuker, D. E. G.; Glen, R. C.; Goodman, J. M.; Pollock, J. R. A.; Bingham, S. A. The effect of haem in red and processed meat on the endogenous formation of N-nitroso compounds in the upper gastrointestinal tract. *Carcinogenesis* **2007**, *28* (3), 685–690. DOI: 10.1093/carcin/bgl192.

Lynch, A. M., Howe, J.; Hildebrand, D.; Harvey, J. S.; Burman, M.; Harte, D. S. G.; Chen, L.; Kmett, C.; Shi, W.; McHugh, C. F.; Patel, K. K.; Junnotula, V.; Kenny, J.; Haworth, R.; Wills, J. W. *N*-Nitrosodimethylamine investigations in muta mouse define point-of-departure values and demonstrate less-than-additive somatic mutant frequency accumulations. *Mutagenesis* **2024**, *39*: 96–118. DOI: 10.1093/mutage/geae001.

MacAllister, S. L.; Choi, J.; Dedina, L.; O'Brien, P. J. Metabolic mechanisms of methanol/formaldehyde in isolated rat hepatocytes: carbonyl-metabolizing enzymes versus oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions* **2011**, *191* (1-3), 308–314. DOI: 10.1016/j.cbi.2011.01.017.

Magee, P. N.; Barnes, J. M. The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *British Journal of Cancer 10* (1) **1956**, *10* (1), 114–122. DOI:10.1038/bjc.1956.15.

Magee, P. N.; Lee K. Y. Cellular injury and carcinogenesis. Alkylation of ribonucleid acid of rat liver by diethylnitrosamine and *n*-butylmethylnitrosamine *in vivo*. *Biochemical Journal* **1964**, *91* (1), 35-42. DOI: 10.1042/bj0910035.

Mahmood, L. The metabolic processes of folic acid and Vitamin B12 deficiency. *Journal of Health Research and Reviews* **2014**, *1*(1), 5-9. DOI: 10.4103/2394-2010.143318.

Maizel, J. V. SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Trends in Biochemical Sciences* **2000**, 590-592. DOI: 10.1016/s0968-0004(00)01693-5.

Mangerich, A.; Bürkle, A. Pleiotropic cellular functions of PARP1 in longevity and aging: Genome maintenance meets inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2012**, *12* (1). DOI: 10.1155/2012/321653.

Mäntele, W.; Deniz, E. UV-VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2017**, *173,* 965-968. DOI: 10.1016/j. saa.2016.09. 037.

Margison, G. P.; Povey, A. C.; Kaina, B.; Santibáñez Koref, M. F. Variability and regulation of O^6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* **2003**, *24* (4), 625–635. DOI: 10.1093/carcin/bgg005.

Marí, M.; Cederbaum, A. I. Induction of catalase, alpha, and microsomal glutathione S-transferase in CYP2E1 overexpressing HepG2 cells and protection against short-term oxidative stress. *Hepatology* **2001**, *33* (3), 652–661. DOI: 10.1053/jhep.2001.22521

Maron, D. M.; Ames, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research* **1983**, *113* (3-4), 173-215.

Maron, D. M.; J. Katzenellenbogen, B. N. Ames. Compatibility of organic solvents with the salmonella/ microsome test. *Mutation Research* **1981**, *88*, 343-350.

Martignoni, M.; Groothuis, G. M. M.; De Kanter, R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **2006**, *2* (6), 875–894. DOI: 10.1517/17425255.2.6.875.

Mazon, G.; Philippin, G.; Cadet, J.; Gasparutto, D.; Fuchs, R. P. The alkyltransferase-like ybaZ gene product enhances nucleotide excision repair of O^6-alkylguanine adducts in E. coli. *DNA Repair* **2009**, *8* (6), 697–703. DOI: 10.1016/j.dnarep.2009.01.022.

McIntee, E. J.; Hecht, S. S. Metabolism of N-Nitrosonornicotine Enantiomers by Cultured Rat Esophagus and in vivo in Rats. *Chemical Research in Toxicology* **2000**, *13*, 3, 192–199. DOI: 10.1021/tx990171l.

Meftahi, G. H.; Bahari, Z.; Zarei Mahmoudabadi, A.; Iman, M.; Jangravi, Z. Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochemistry and Molecular Biology Education* **2021**, *49* (4), 509–517. DOI: 10.1002/bmb.21516.

Meimberg, H.; Schrenk, C.; Steinberg, C.; Klarenberg, A.; Kettrup, A. The suitability of gastropods as biomarkers: Induction of ethoxy-, pentoxy- and benzoxyresorufin-O-dealkylase in limnetic gastropods via aroclor 1254. *Environmental Science and Pollution Research* **1997**, *4* (4), 183–188. DOI: 10.1007/BF02986340.

Merk, O.; Speit, G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **1999**, *33* (2), 167–172. DOI: 10.1002/(sici)1098-2280(1999)33:2 < 167:aid-em9>3.0.co;2-d.

Michejda, C. J.; Koepke, S. R.; Kroeger-Koepke, M. B.; Bosan, W. Recent findings on the metabolism of beta-hydroxyalkylnitrosamines. *IARC Scientific Publications* **1987**, (84), 77–82.

Michejda, C. J.; Kroeger-Koepke, M. B.; Koepke, S. R.; Sieh, D. H. Activation of nitrosamines to biological alkylating agents. *American Chemical Society* **1981**, *174*. DOI: 10.1021/bk-1981-0174.ch001.

Mijal, R. S.; Thomson, N. M.; Fleischer, N. L.; Pauly, G. T.; Moschel, R. C.; Kanugula, S.; Fang, Q.; Pegg, A. E.; Peterson, L. A. The repair of the tobacco specific nitrosamine derived adduct O^6-4-Oxo-4-(3-pyridyl)butylguanine by O^6-alkylguanine-DNA alkyltransferase variants. *Chemical Research in Toxicology* **2004**, *17* (3), 424–434. DOI: 10.1021/tx0342417.

Miller, B. M.; Zitzelsberger H. F.; Weier H. U.; Adler, I. D. Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis* **1991**, *6* (4), 297-302. DOI: 10.1093/mutage/6.4.297.

Mills, K. A.; Chess-Williams, R.; McDermott, C. Novel insights into the mechanism of cyclophosphamide-induced bladder toxicity: chloroacetaldehyde's contribution to urothelial dysfunction *in vitro*. *Archives of Toxicology* **2019**, *93* (11), 3291-3303. DOI: 10.1007/s00204-019-02589-1.

Mirvish, S. S.; Ramm, M. D. Demonstration of *in vivo* formation of the nitrosamine *N*-nitroso-*N*-methylaniline from amyl nitrite. *Cancer Letters* **1987**, *36* (2), 125–129. DOI: 10.1016/0304-3835(87)90083-8.

Mishina, Y.; Yang, C.G.; He, C. Direct repair of the exocyclic DNA adduct 1, N^6-ethenoadenine by the DNA repair AlkB proteins. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (42), 14594–14595. DOI: 10.1021/ja055957m.

Mizumoto, K.; Glascott, P. A. Jr.; Farber, J. L. Roles for oxidative stress and poly(ADP-ribosyl)ation in the killing of cultured Hepatocytes by methyl methanesulfonate. *Biochemical Pharmacology* **1993**, *46* (10), 1811-1818. DOI: 10.1016/0006-2952(93)90587-m.

Mochizuki, M.; Irving, C. C.; Anjo, T.; Wakabayashi, Y.; Suzuki, E.; Okada, M. Synthesis and mutagenicity of 4-(N-Butylnitrosamino)-4-hydroxybutyric acid lactone, a possible activated metabolite of the proximate bladder carcinogen N-Butyl-N-(3-carboxypropyl)nitrosamine. *Cancer Research* **1980**, *40* (1), 162–165.

Mohan, M.; Akula, D.; Dhillon, A.; Goyal, A.; Anindya, R. Human RAD51 paralogue RAD51C fosters repair of alkylated DNA by interacting with the ALKBH3 demethylase. *Nucleic Acids Research* **2019**, *47* (22), 11729–11745. DOI: 10.1093/nar/gkz938.

Mojas, N.; Lopes, M.; Jiricny, J. Mismatch repair-dependent processing of methylation damage gives rise to persistent single-stranded gaps in newly replicated DNA. *Genes & Development* **2007**, *21* (24), 3342–3355. DOI: 10.1101/gad.455407.

Mori, Y.; Yamazaki, H.; Toyoshi, K.; Emi, Y., Uchida, K.; Tsutsumi, M. & Konishi, Y. Inhibitory effect of organic solvents on the mutagenicity of N-nitrosodialkylamines in salmonella. Mutation Research Letters **1985**, 142 (4), 153-158. DOI:10.1016/0165-7992(85)90015-6.

Mukherjee, A.; Misra, S.; Howlett, N. G.; Karmakar, P. Multinucleation regulated by the Akt/PTEN signaling pathway is a survival strategy for HepG2 cells. *Mutation Research* **2013**, *755* (2), 135–140. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2013.06.009.

Muniandy, P. A.; Liu, J.; Majumdar, A.; Liu, S.; Seidman, M. M. DNA interstrand crosslink repair in mammalian cells: step by step. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **2010**, *45* (1), 23–49. DOI: 10.3109/10409230903501819.

Murcia, J. M. de; Niedergang, C.; Trucco, C.; Ricoul, M.; Dutrillaux, B.; Mark, M.; Oliver, F. J.; Masson, M.; Dierich, A.; LeMeur, M.; Walztinger, C.; Chambon, P.; Murcia, G. de. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94* (14), 7303–7307. DOI: 10.1073/pnas.94.14.7303.

Murphy, S. E.; Spina, D. A. Evidence for a high-affinity enzyme in rat esophageal microsomes which alpha-hydroxylates N'-nitrosonornicotine. *Carcinogenesis* **1994**, *15* (12), 2709–2713. DOI: 10.1093/carcin/15.12.2709.

Nahon, E.; Israelson, A.; Abu-Hamad, S.; Varda, S.B. Fluoxetine (Prozac) interaction with the mitochondrial voltage-dependent anion channel and protection against apoptotic cell death. *FEBS Letters* **2005**, *579* (22), 5105–5110. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.08.020.

Nakamura, A.; Nakajima, M.; Yamanaka, H.; Fujiwara, R.; Yokoi, T. Expression of UGT1A and UGT2B mRNA in human normal tissues and various cell lines. *Drug Metabolism and Disposition* **2008**, *36* (8), 1461-1464. DOI: 10.1124/dmd.108.021428.

Napalkov, N. P.; Pozharisski, K. M. Morphogenesis of experimental tumors of the esophagus. *Journal of the National Cancer Institute* **1969**, *42* (6), 927–940.

Natarajan, A. T.; Darroudi, F. Use of human hepatoma cells for *in vitro* metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. *Mutagenesis* **1991**, *6* (5), 399–403. DOI: 10.1093/mutage/6.5.399.

Nay, S. L.; Lee, D. H.; Bates, S. E.; O'Connor, T. R. Alkbh2 protects against lethality and mutation in primary mouse embryonic fibroblasts. *DNA Repair* **2012**, *11 (5)*, 502–510. DOI: 10.1016/j.dnarep.2012.02.005.

NCI, CDC. National Cancer Institute and Centers for Disease Control and Prevention. *Smokeless Tobacco and Public Health: A Global Perspective*. Bethesda, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health, National Cancer Institute. NIH Publication No. 14-7983; **2014**.

Nedelcheva, V.; Gut, I. P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica* **1994**, *24* (12), 1151–1175. DOI: 10.3109/00498259409038673.

Ngo, L. P.; Owiti, N. A.; Swartz, C.; Winters, J.; Su, Y.; Ge, J.; Xiong, A.; Han, J.; Recio, L.; Samson, L. D.; Engelward, B. P. Sensitive CometChip assay for screening potentially carcinogenic DNA adducts by trapping DNA repair intermediates. *Nucleic Acids Research* **2020**, *48* (3), e13. DOI: 10.1093/nar/gkz1077.

Nikolova, T.; Roos, W. P.; Krämer, O. H.; Strik, H. M.; Kaina, B. Chloroethylating nitrosoureas in cancer therapy: DNA damage, repair and cell death signaling. *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer* **2017**, *1868* (1), 29–39. DOI: 10.1016/j.bbcan.2017.01.004.

Nirogi, R.; Kandikere, V.; Bhyrapuneni, G.; Ponnamaneni, R. K.; Palacharla, R. c.; Manoharan, A. Effect of dimethyl sulfoxide on *in vitro* cytochrome P450 1A2 mediated phenacetin O-deethylation in human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition* **2011**, *39* (11), 2162–2164. DOI: 10.1124/dmd.111.04116

Niture, S. K.; Velu, C. S.; Smith, Q. R.; Bhat, G. J.; Srivenugopal, K. S. Increased expression of the MGMT repair protein mediated by cysteine prodrugs and chemopreventative natural products in human lymphocytes and tumor cell lines. *Carcinogenesis* **2007**, *28* (2), 378–389. DOI: 10.1093/carcin/bgl155.

Nixon, J. E., J.H. Wales, R. A. Scanlan, D. D. Bills, R. O. Sinnhuber. Null carcinogenic effect of large doses of nitrosoproline and nitrosohydroxyproline in wistar rats. *Food and Cosmetics Toxicology* **1976,***14* (2), 133-135. DOI:10.1016/S0015-6264 (76) 80257-X.

Norat, T.; Bingham, S.; Ferrari, P.; Slimani, N.; Jenab, M.; Mazuir, M.; Overvad, K.; Olsen, A.; Tjonneland, A.; Clavel, F.; Boutron-Ruault, M.C.; Kesse, E.; Boeing, H.; Bergmann, M.M.; Nieters, A.; Linseisen, J.; Trichopoulou, A.; Trichopoulos, D.; Tountas, Y.; Berrino, F.; Palli, D.; Panico, S.; Tumino, R.; Vineis, P.; Bueno-de Mesquita; H.B.; Peeters, P.H.; Engeset, D.; Lund, E.; Skeie, G.; Ardanaz, E.; Gonzalez, C.; Navarro, C.; Quiros, J.R.; Sanchez, M.J.; Berglund, G.; Mattisson, I.; Hallmans, G.; Palmqvist, R.; Day, N.E.; Khaw, K.T.; Key, T.J.; San Joaquin, M.; Hemon, B.; Saracci, R.; Kaaks, R.; Riboli, E. Meat, fish,

and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J. Natl. Cancer Inst.* **2005**, *97*, 906e916.

O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry* **2000**, *267* (17), 5421–5426. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.

O'Brien, P. J .; Ellenberger, T. Dissecting the broad substrate specificity of human 3-methyladenine-DNA glycosylase. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (11), 9750-9757.

Ochs, K.; Kaina, B. Apoptosis induced by DNA damage O^6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Research* **2000**, *60* (20), 5815–5824.

OECD 2020 Organisation for Economic Co-operation and Development Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. *OECD Publishing* **2020**. DOI: 10.1787/9789264071247-en.

OECD 2020 Organisation for Economic Co-operation and Development. Test No 471: Bacterial Reverse Mutation Test. Ninth Addendum to OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 4. *OECD Publishing* **2020**.

OECD 2023 Organisation for Economic Co-operation and Development. Test No. 487*: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. OECD Publishing* **2023.** DOI: 10.1787/9789264264861-en.

OECD TG 489 Organisation for Economic Co-operation and Development. Test No. 489*: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. OECD Publishing* **2016.** DOI: 10.1787/9789264264885-en.

OECD 2011 Organisation for Economic Co-operation and Development. Test No. 488: *Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*. *OECD Publishing* **2011**. .

Ogino, M. H.; Tadi, P. Cyclophosphamide **2023**, StatPearls Publishing.

Ohshima, H.; Bereziat, J. C.; Bartsch, H. Measurement of endogenous N-nitrosation in rats and humans by monitoring urinary and faecal excretion of *N*-nitrosamino acids. *IARC Scientific Publications* **1982**, *41*, 397-411.

Okada, M.; Suzuki, E. M.; Mochizuki, M. Possible important rŏle of urinary *N*-methyl-N(3-carboxypropyl)nitrosamine in the induction of bladder tumors in rats by *N*-methyl-N-dodecylnitrosamine. *Generative Adversarial Networks* **1976**, *67* (5), 771–772.

Olave, M. C.; Graham, R. P. Mismatch repair deficiency: The what, how and why it is important. *Genes Chromosomes & Cancer* **2021**, *61*(6), 314-321. DOI: 10.1002/gcc.23015.

Olive, P. L.; Banáth, J. P. Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. *Experimental Cell Research* **1995**, *221* (1), 19-26. DOI: 10.1006/excr.1995.1348.

Olive, P. L.; Banáth, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* **2006**, *1*, 23-29. DOI: 10.1038/nprot. 2006. 5.

Otto, M.; Hansen, S. H.; Dalgaard, L.; Dubois, J.; Badolo, L. Development of an *in vitro* assay for the investigation of metabolism-induced drug hepatotoxicity. *Cell Biology and Toxicology* **2008**, *24* (1), 87–99. DOI: 10.1007/s10565-007-9018-x.

Ou, Y. H.; Chung, P. H.; Sun, T. P.; Shieh, S. Y. P53 C-terminal phosphorylation by CHK1 and CHK2 participates in the regulation of DNA-damage-induced C-terminal acetylation. *Molecular Biology of the Cell* **2005**, *16* (4), 1684–1695. DOI: 10.1091/mbc.E04-08-0689.

Ovejero, S.; Soulet, C.; Moriel-Carretero, M. The alkylating agent methyl methanesulfonate triggers lipid alterations at the Inner nuclear membrane that are independent from Its DNA-damaging ability. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22* (14), 7461. DOI: 10.3390/ijms22147461.

Package 'magrittr', 2022.

Padma, R. R.; Amonkar, A. J.; Bhide, S. V. Mutagenic and cytogenetic studies of N-Nitrosonornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Letters* **1989**, *46* (3), 173-180. DOI: 10.1016/0304-3835(89)90127-4.

Padma, R. R.; Lalitha, V. S.; Amonkar, A. J.; Bhide, S. V. Carcinogenicity studies on the two tobacco-specific *N*-nitrosamines, *N'*-nitrosonornicotine and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, *Carcinogenesis* **1989**, *10* (11), 1997–2002. DOI: 10.1093/carcin/10.11.1997.

Panier, S.; Boulton, S. J. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2013**, *15*, 7-18. DOI: 10.1038/nrm3719.

Pang, J.; Xi, C.; Dai, Y.; Gong, H.; Zhang, T. M. Altered expression of base exzision repair genes in response to high glucose-induced oxidative stress in HepG2 hepatocytes. *Medical Science Monitor* **2012**, *18* (7), 281-285. DOI: 10.12659/MSM. 883206.

Paranjpe, A.; Zhang, R.; Ali-Osman, F.; Bobustuc, G. C.; Srivenugopal, K. S. Disulfiram is a direct and potent inhibitor of human O^6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in brain tumor cells and mouse brain and markedly increases the alkylating DNA damage. *Carcinogenesis* **2014**, *35* (3), 692–702. DOI: 10.1093/carcin/bgt366.

Pascucci, B.; Russo, M. T.; Crescenzi, M.; Bignami, M.; Dogliotti, E. The accumulation of MMS-induced single strand breaks in G1 phase is recombinogenic in DNA polymerase beta defective mammalian cells. *Nucleic Acids Research* **2005**, *33* (1), 280–288. DOI: 10.1093/nar/gki168

Patil, P. G.; Kamble, S. H.; Shah, T. S.; Iyer, K. R. Effect of water miscible organic solvents on p-Nitrophenol Hydroxylase (CYP2E1) activity in rat liver microsomes. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2015**, *77* (3), 283–289. DOI: 10.4103/0250-474x.159613.

Patten, C. J.; Smith, T. J.; Friesen, M. J.; Tynes, R. E.; Yang, C. S.; Murphy, S. E. Evidence for cytochrome P450 2A6 and 3A4 as major catalysts for N'-nitrosonornicotine alpha-

hydroxylation by human liver microsomes. *Carcinogenesis* **1997**, *18* (8), 1623–1630. DOI: 10.1093/carcin/18.8.1623.

Paull, T. T. Mechanisms of ATM Activation. *Annual Review of Biochemistry* **2015**, *84*, 711–738. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-034335.

Pegg A- E. Mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylating carcinogenic and therapeutic agents. *Cancer Research* **1990** *50* (19), 6119-29.

Pegg, A. E. Multifaceted roles of alkyltransferase and related proteins in DNA repair, DNA damage, resistance to chemotherapy, and research tools. *Chemical Research in Toxicology* **2011**, *24* (5), 618–639. DOI: 10.1021/tx200031q.

Pegg, A. E.; Hui, G. Formation and subsequent removal of O^6-methylguanine from deoxyribonucleic acid in rat liver and kidney after small doses of dimethylnitrosamine. *Biochemical Journal* **1978**, *173* (3), 739–748. DOI: 10.1042/bj1730739.

Pensabene, J. W.; Feinberg, J. I.; Piotrowski, E. G.; Fiddler, W. Occurrence and determination of N-Nitrosoproline and N-Nitrosopyrrolidine in cured meat products. *Journal of Food Science* **1979**, *44* (6), 1700–1702. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1979.tb09119.x.

Petermann, E.; Ziegler, M.; Oei, S. L. ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair. *DNA Repair* **2003**, *2*, 1101–1114. DOI: 10.1016/S1568-7864(03)00117-4.

Peterson, L. A. Formation, repair, and genotoxic properties of bulky DNA adducts formed from tobacco-specific nitrosamines. *Journal of Nucleic Acids*, **2010** (2010), DOI: 10.4061/2010/284935.

Peterson, L. A.; Liu, X. K.; Hecht, S. S. Pyridyloxobutyl DNA adducts inhibit the repair of O^6-methylguanine. *Cancer Research* **1993**, *53*, 2780–2785.

Peto, R., Gray, R.; Brantom, P.; Grasso, P. Dose and time relation ships for tumor induction in the liver and esophagus of 4080 inbred rats by chronic ingestion of N-nitrosodiethylamine or *N*-nitrosodimethylamine. *Cancer Research* **1991**, *51*, 6452–6469.

Phang, J. M. Proline Metabolism in Cell Regulation and Cancer Biology: Recent Advances and Hypotheses. *Antioxidants & Redox Signaling* **2019**, *30* (4), 635-649. DOI: 10.1089/ars.2017.7350.

Phillipson, C. E.; Ioannides, C. A comparative study of the bioactivation of nitrosamines to mutagens by various animal species including man. *Carcinogenesis* **1984**, *5* (8), 1091–1094. DOI: 10.1093/carcin/5.8.1091.

Physicians Desk reference, 59th edition Thomson PDR, Montvale, **2005**.

Povirk, L. F.; Shuker, D. E. DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. *Mutation Research* **1994**, *318* (3), 205–226. DOI: 10.1016/0165-1110(94)90015-9.

Preussmann, R.; Habs, M.; Habs, H. Carcinogenicity of N-Nitrosodiethanolamine in Rats at Five Different Dose Levels. *Cancer Res* **1982**, *42*, 5167-5171.

Preussmann, R.; Spiegelhalder, B. Environmental N-nitroso carcinogens problems and solutions. *Interdisciplinary Science Reviews* **1989**, *14* (3), 248-253. DOI: 10.1179./isr.1989.14. 3. 248.

Preussmann, R., & Stewart, B. W. *N*-Nitroso Carcinogens **1984**. In C. E. Searle (Ed.), *Chemical Carcinogens* (2nd ed. ed., pp. 643-828). Washington D.C.: American Chemical Society.

Proast | RiVM. https://www.rivm.nl/en/proast (accessed 2025-03-01).

Qian, X.; von Wronski, M. A.; Brent, T. P. Localization of methylation sites in the human O^6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter: Correlation with gene suppression. *Carcinogenesis* **1995**, *16*, 1385–1390. DOI: 10.1093/carcin/16. 6.1385.

Qian, X. C.; Brent, T. P. Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O^6-methylguanine-DNA methyl transferase gene. *Cancer Research* **1997**, *57*, 3672–3677.

Quan, Z.; Khan, S.; O'Brien, P. J. Role of cytochrome P-450IIE1 in *N*-nitroso-*N*-methylaniline induced hepatocyte cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions* **1992**, *83* (3), 221–233. DOI: 10.1016/0009-2797(92)90099-7.

Quiros, S.; Roos, W. P.; Kaina, B. Processing of O^6-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles. *Cell Cycle*. **2010**, *9*, 168–178

R Core Team (2023) R A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. - References - *Scientific Research Publishing*. https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=3582659 (accessed 2025-03-01).

Ramos, A. A.; Pedro, D. F.; Lima, C. F.; Collins, A. R.; Pereira-Wilson, C. Development of a new application of the comet assay to assess levels of O^6-methylguanine in genomic DNA (CoMeth). *Free Radical Biology and Medicine* **2013**, *60*, 41−48. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.028.

Rao, T. K., Young, J. A., Lijinsky, W., Epler, J. L., Mutagenicity of aliphatic nitrosamines in Salmonella typhimurium. *Mutatation Research* **1979**, *66* (1), 1–7. DOI: 10.1016/0165-1218(79)90002-8.

Reitmann, F. A.; Shertzer, H. G.; Berger, M. L. Toxicity of methylating agents in isolated hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* **1988**, *37* (16), 3183-3188. DOI: 10.1016/0006-2952(88)90318-8.

Ren, S.; Yang, J. S.; Kalhorn, T. F.; Slattery, J. T. Oxidation of cyclophosphamide to 4-hydroxycyclophosphamide and deschloroethylcyclophosphamide in human liver microsomes. *Cancer Research* **1997**, *57* (19), 4229–4235.

Reynolds, E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *The Lancet Neurology* **2006**, *5* (11), 949-960.

Ringvoll, J.; Nordstrand, L. M.; Vågbø, C. B.; Talstad, V.; Reite, K.; Aas, P. A.; Lauritzen, K. H.; Liabakk, Bjørk, A. A.; Doughty, R. W.; Falnes, P. Ø.; Krokan, H. E.; Klungland, A. Repair deficient mice reveal mABH2 as the primary oxidative demethylase for repairing 1meA and 3meC lesions in DNA. *The Embo Journal* **2006**, *25*, 2189–2198. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601109.

Roe, A. L.; Snawder, J. E.; Benson, R. W.; Roberts, D. W.; Casciano, D. A. HepG2 cells: an *in vitro* model for P450-dependent metabolism of acetaminophen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1993**, *190* (1), 15–19. DOI: 10.1006/bbrc.1993.1003.

Roos, W. P.; Kaina, B. DNA damage-induced cell death: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Letters* **2013**, *332* (2), 237-248. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.01.007.

Roos, W. P.; Nikolova, T.; Quiros, S.; Naumann, S. C.; Kiedron, O.; Zdzienicka, M. Z.; Kaina, B. Brca2/Xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O^6-methylguanine triggered apoptosis, DSBs and chromosomal aberrations by a process leading to SCEs. *DNA Repair* **2009**, *8* (1), 72–86. DOI: 10.1016/j.dnarep.2008.09.003.

Roper, J. M.; Griffin, T. R.; Johnson, G. E., Kostal, J.; Nudelman, R.; Ott, G. R.; Voutchkova-Kostal, A.; Niddam-Hildesheim, V. Using *N*-Nitrosodiethanolamine (NDELA) and N-Nitrosopiperidine (NPIP) transgenic rodent gene mutation data and quantum mechanical modeling to derive potency-based acceptable intake limits for NDSRIs lacking robust carcinogenicity data. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **2025**, *66*, 155-171.

Rothkamm, K.; Löbrich, M. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100* (9), 5057-5062. DOI: 10.1073/pnas.0830918100.

Roy, P.; Yu, L. J.; Crespi, C. L.; Waxman, D. J. Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metabolism and Dispositions* **1999**, *27* (6), 655–666.

Rydberg, B.; Lindahl, T. Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor *S*-Adenosyl-*L*-Methionine is a potentially mutagenic reaction. *The EMBO Journal* **1982**, *1* (2), 211–216. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1982.tb01149.x.

Salam, T.; Lyngdoh, R. H. D. Clues to the non-carcinogenicity of certain *N*-Nitroso compounds: Role of alkylated DNA bases. *Biophysical Chemistry* **2021**, *271*, 106539. DOI: 10.1016/j.bpc.2020.106539.

Saldivar, J. C.; Cortez, D.; Cimprich, K. A. The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* **2017**, *18* (10), 622–636. DOI: 10.1038/nrm.2017.67.

Sassanfar, M.; Dosanjh, M. K.; Essigmann, J. M.; Samson, L. Relative efficiences of the bacterial, yeast, and human DNA methyltransferases for the repair of O^6-methylguanine and O^4-methylthymine. Suggestive evidence for O^4-methylthymine repair by repair by eucaryotic methyltransferases. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266* (5), 2767–2771.

Scharer, O. D. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2013**, *5* (10). DOI: 10.1101/cshperspect.a012609.

Schaub J. M.; Best Q. A.; Zhao, C.; Haack R. A.; Ruan, Q. Three sample-sparing techniques to estimate the molar absorption coefficient of luminescent dyes. *Biochemistry and Biophysics Report* **2025**, *42*. DOI: 10.1016/j.bbrep.2025.101971.

Scherer, E.; Timmer, A. P.; Emmelot, P. Formation by diethylnitrosamine and persistence of O^4-ethylthymidine in rat liver DNA *in vivo*. *Cancer Letters* **1980**, *10* (1) 1–6. DOI: 10.1016/0304-3835(80)90058-0.

Scherlach, K.; Boettger, D.; Remme, N.; Hertweck, C. The chemistry and biology of cytochalasans. *Natural Product Reports* **2010**, *27* (6), 869–886. DOI: 10.1039/b903913a.

Schmähl, D. Investigations on esophageal carcinogenicity by methyl-phenyl-nitrosamine and ethyl alcohol in rats. *Cancer Letters* **1976**, *1* (4), 215–218. DOI: 10.1016/s0304-3835(75)96970-0.

Schothorst, R. C.; Somers, H. H. J. Determination of *N*-nitrosodiethanolamine in cosmetic products by LC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *381* (3), 681–685. DOI: 10.1007/s00216-004-2914-5.

Schulte-Hubbert, R.; Kuepper, J. H.; Thomas, A. D.; Schrenk., D. Estragole: DNA adduct formation in primary rat hepatocytes and genotoxic potential in HepG2-CYP1A2 cells. *Toxicology* **2020**, *444* DOI: 10.1016/j.tox.2020.152566.

Schwarzenbach, C.; Tatsch, L.; Brandstetter Vilar, J.; Rasenberger, B.; Beltzig, L.; Kaina, B.; Tomicic, M. T.; Christmann, M. Targeting c-IAP1, c-IAP2, and Bcl-2 Eliminates Senescent Glioblastoma Cells Following Temozolomide Treatment. *Cancers* **2021**, *13* (14). DOI: 10.3390/cancers13143585.

Scordo, M. G.; Spina, E.; Dahl, M.L.; Gatti, G.; Perucca, E. Influence of CYP2C9, 2C19 and 2D6 genetic polymorphisms on the steady-state plasma concentrations of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **2005**, *97* (5), 296–301. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2005.pto_194.x.

Scully, R.; Xie, A. Double strand break repair functions of histone H2AX. *Mutation Research* **2013**, *750* (1-2), 5–14. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2013.07.007.

Sedgwick, B.; Bates, P. A.; Paik, J.; Jacobs, S. C.; Lindahl, T. Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair* **2007**, *6* (4), 429–442. DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.10.005

Seglen, P. O. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods in Cell Biology* **1976**, *13*, 29–83. DOI: 10.1016/s0091-679x(08)61797-5.

Seo, J. E.; He, X.; Bryant, M.; Atrakchi, A. H.; McGovern, T.; Bruno, K. L. D.; Heflich, R. H.; Guo, X. Comparative DNA damage induced by eight nitrosamines in primary human and macaque hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions* 416, **2025**, DOI: 10.1016/j.cbi.2025.111538.

Seo, J. E.; Le, Y.; Revollo, J.; Miranda-Colon, J.; Xu, H.; McKinzie, P.; Mei, N.; Chen, T.; Heflich, R. H.; Zhou, T.; Robison, T.; Bonzo, J. A.; Guo, X. Evaluating the mutagenicity of *N*-nitrosodimethylamine in 2D and 3D HepaRG cell cultures using error-corrected next generation sequencing. *Archives of Toxicology* **2024**, *98* (6), 1919–1935. DOI: 10.1007/s00204-024-03731-4.

Seo, J. E.; Li, X.; Le,Y.; Mei, N; Zhou, T.; Guo, X. High-troughput micronucleus assay using three-dimensional HepaRG spheroids for *in vitro* genotoxicity testing. *Archives of Toxicology* **2023**, *97* (4), 1163-1175. DOI: 10.1007/s00204-023-03461-z

Seo, J. E.; Tryndyak, V.; Wu, Q.; Dreval, K.; Pogribny, I.; Bryant, M.; Zhou, T.; Robison, T. W.; Mei, N.; Guo, X. Quantitative comparison of *in vitro* genotoxicity between metabolically competent HepaRG cells and HepG2 cells using the high-throughput high-content CometChip assay. *Archives of Toxicology* **2019**, *93* (5), 1433–1448. DOI: 10.1007/s00204-019-02406-9.

Seo, J. E.; Wu, Q.; Bryant, M.; Ren, Lijun; Shi, Q.; Robison, T.W.; Mei, N.; Manjanatha, M.G.; Guo, X. Performance of high-troughput CometChip assay using primary human hepatocytes: a comparison of DNA damage responses with *in vitro* human hepatoma cell lines. *Archives of Toxicology* **2020**, *94* (6*)*, 2207-2224. DOI:10.1007/s00204-020-02736-z.

Seo, J. E.; Xu, H.; Li, X.; Atrakchi, A. H.; McGovern, T.; Bruno, K. L. D.; Keire, D. A.; Mei, N.; Heflich, R. H.; Guo, X. Genotoxicity evaluation of ten nitrosamine drug substance-related impurities using 2D and 3D HepaRG cell models. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2025**,162. DOI: 10.1016/j.yrtph.2025.105906.

Seo, J. E.; Yu, J. Z.; Xu, H.; Li, X.; Atrakchi, A. H.; McGovern, T. J.; Bruno, K. L. D.; Mei, N.; Heflich, R. H.; Guo, X. Genotoxicity assessment of eight nitrosamines using 2D and 3D HepaRG cell models. *Archives of Toxicology* **2023**, *97* (10), 2785–2798. DOI: 10.1007/s00204-023-03560-x.

Shapiro, K. B.; Hotchkiss, J. H.; Roe, D. A. Quantitative relationship between oral nitrate-reducing activity and the endogenous formation of *N*-nitrosoamino acids in humans. *Food and Chemical Toxicology* **1991**, *29* (11), 751–755. DOI: 10.1016/0278-6915(91)90183-8.

Shu, L.; Hollenberg, P. F. Role of cytochrome P450 in DNA damage induced by *N*-nitrosodialkylamines in cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis* **1996**, *17* (3), 569–576. DOI: 10.1093/carcin/17.3.569.

Shulman-Roskes, E. M.; Noe, D. A.; Gamcsik, M. P.; Marlow, A. L.; Hilton, J.; Hausheer, F. H.; Colvin, O. M.; Ludeman, S. M. The partitioning of phosphoramide mustard and its

aziridinium ions among alkylation and P-N bond hydrolysis reactions. *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41* (4), 515–529. DOI: 10.1021/jm9704659.

Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* **1988**, *175* (1), 184–191. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.

Singleton, B. K.; Torres-Arzayus, M. I.; Rottinghaus, S. T.; Taccioli, G. E.; Jeggo, P.A. The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *The Journal of Molecular Cell Biology* **1999**, *19* (5), 3267-3277. DOI: 10.1128/MCB.19.5.3267.

Sinha, D.; Agarwal, N.; Gupta, P. Prevalence of Smokeless Tobacco Use and Number of Users in 121 Countries. *British Journal of Medicine & Medical Research* **2015**, *9* (6), 1–20. DOI: 10.9734/BJMMR/2015/16285.

Sitarek, K.; Gromadzińska, J.; Stetkiewicz, J.; Lutz, P.; Król, M.; Domeradzka-Gajda, K.; Wąsowicz, W. Developmental toxicity of *N*-methylaniline following prenatal oral administration in rats. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* **2016**, *29* (3), 479–492. DOI: 10.13075/ijomeh.1896.00571.

Sladek, N. E. Metabolism of oxazaphosphorines. *Pharmacology & Therapeutics* **1988**, *37* (3), 301–355. DOI: 10.1016/0163-7258(88)90004-6.

Sleeth, K. M.; Robson, R. L.; Dianov, G. L. Exchangeability of mammalian DNA ligases between base excision repair pathways. *Biochemistry* **2004**, *43* (40), 12924–12930. DOI: 10.1021/bi0492612.

Slob, W. A general heory of effect size, and its consequences for defining the benchmark response (BMR) for continuous endpoints. *Critical Reviews in Toxicology* **2017**, *47* (4), 342-351. DOI: 10.1080/10408444.2016.1241756

Slob, W. Joint project on benchmark dose modelling with RIVM. *EFSA Supporting Publications* **2018**, *15* (12). DOI: 10.2903/sp.efsa.2018.EN-1497.

Slob, W. _proast70.3: Benchmark dose modelling_. R package version 0.01. **2021**.

Slob, W., & Setzer, R. W. Shape and steepness of toxicological dose-response relationships of continuous endpoints. *Critical Reviews in Toxicology* **2014**, 44(3), 270-297. DOI:10.3109/10408444.2013.853726

Smith, C. C.; O'Donovan, M. R.; Martin, E. A. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis*, **2006**, *21* (3) 185–190. DOI: 10.1093/mutage/gel019.

Smith, C. M.; Nolan, C. K.; Edwards, M. A.; Hatfield, J. B.; Stewart, T. W.; Ferguson, S. S.; Lecluyse, E. L.; Sahi, J. A comprehensive evaluation of metabolic activity and intrinsic clearance in suspensions and monolayer cultures of cryopreserved primary human hepatocytes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2012**, *101* (10), 3989–4002. DOI: 10.1002/jps.23262.

Smith, H. L.; Southgate, H.; Tweddle, D. A.; Curtin, N. J. DNA damage checkpoint kinases in cancer. *Expert Reviews in Molecular Medicine* **2020**, *22*. DOI: 10.1017/erm.2020.3.

So, Sairei; Davis, A. J.; Chen, D. J. Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites. *Journal of Cell Biology* **2009**, *187* (7), 977-990. DOI: 10.1083/jcb.200906064.

Sobol, R. W.; Kartalou, M.; Almeida, K. H.; Joyce, D. F.; Engelward, B. P.; Horton, J. K.; Prasad, R.; Samson, L. D.; Wilson, S. H. Base excision repair intermediates induce p53-independent cytotoxic and genotoxic responses. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278* (41), 39951–39959. DOI: 10.1074/jbc.M306592200.

Soergel, F.; Kinzig, M.; Abdel-Tawab, M.; Bidmon, C.; Schreiber, A.; Ermel, S.; Wohlfart, J.; Besa, A.; Scherf-Clavel, O.; Holzgrabe, U. The contamination of valsartan and other sartans, part 1: New findings. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2019**, *172*, 395–405. DOI: 10.1016/j.jpba.2019.05.022.

Soldatow, V. Y.; Lecluyse, E. L.; Griffith, L. G.; Rusyn, I. *In vitro* models for liver toxicity testing. *Toxicology Research* **2013**, *2* (1), 23–39. DOI: 10.1039/C2TX20051A.

Sommer, S.; Buraczewska, I.; Kruszewski, K. Micronucleus Assay. The state of the art and further directions. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21* (4), 1534. DOI: 10.3390/ijms21041534.

Souza, M. E.; Polizello, A. C.; Uyemura, S. A.; Castro-Silva, O.; Curti, C. Effect of fluoxetine on rat liver mitochondria. *Biochemical Pharmacology* **1994**, *48* (3), 535–541. DOI: 10.1016/0006-2952(94)90283-6.

Spassova, M. K.; Golovinsky, E. V. Pharmacobiochemistry of arylalkyltriazenes and their application in cancer chemotherapy. *Pharmacology and Therapeutics* **1985**, *27*, 333–352.

Spivak, G. Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair* **2015**, *36*, 13–18. DOI: 10.1016/j.dnarep.2015.09.003.

Srivastava, D. K.; Berg, B. J.; Prasad, R.; Molina, J. T.; Beard, W. A.; Tomkinson, A. E.; Wilson, S. H. Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273* (33), 21203–21209. DOI: 10.1074/jbc.273.33.21203.

Srivenugopal, K. S.; Shou, J.; Mullapudi, S.R.; Lang, F.F., Jr.; Rao, J.S.; Ali-Osman, F. Enforced expression of wild-type p53 curtails the transcription of the O^6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in human tumor cells and enhances their sensitivity to alkylating agents. *Clinical Cancer Research* **2001**, *7* (5), 1398–1409.

Stedman, G. Mechanism of the azide–nitrite reaction. Part II. *Journal of the Chemical Society* **1959**, 2949–2954. DOI: 10.1039/JR9590002949.

Steinbrecht, S.; König, R.; Schmidtke, K.U.; Herzog, N.; Scheibner, K.; Krüger-Genge, A.; Jung, F.; Kammerer, S.; Küpper, J.H. Metabolic activity testing can underestimate acute drug

cytotoxicity as revealed by HepG2 cell clones overexpressing cytochrome P450 2C19 and 3A4. *Toxicology* **2019**, *412*, 37–47. DOI: 10.1016/j.tox.2018.11.008.

Steinbrecht, S.; Pfeifer, N.; Herzog, N.; Katzenberger, N.; Schulz, C.; Kammerer, S.; Küpper, J.-H. HepG2-1A2 C2 and C7: Lentivirus vector-mediated stable and functional overexpression of cytochrome P450 1A2 in human hepatoblastoma cells. *Toxicology Letters* **2020**, *319*, 155–159. DOI: 10.1016/j.toxlet.2019.11.006.

Stepanov, I.; Hecht, S. S. Mitochondrial DNA adducts in the lung and liver of F344 rats chronically treated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and (S)-4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol. *Chemical Research in Toxicology* **2009**, *22* (2), 406–414. DOI: 10.1021/tx800398x.

Stevens, M. F.; Hickman, J. A.; Langdon, S. P.; Chubb, D.; Vickers, L.; Stone, R., Baig, G.; Goddard, C.; Gibson, N. W.; Slack, J. A.; Newton, C.; Lunt, E.; Fizames, C.; Lavelle, F. Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo [5, 1-d]-1, 2, 3, 5-tetrazin-4 (3 H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer Research* **1987**, *47* (22), 5846-5852.

Stiborová, M.; Asfaw, B.; Frei, E.; Schmeiser, H. H.; Wiessler, M. Benzenediazonium ion derived from Sudan I forms an 8-(phenylazo)guanine adduct in DNA. *Chemical Research in Toxicology* **1995**, *8* (4), 489–498. DOI: 10.1021/tx00046a002.

Stiborová, M.; Hansíková, H.; Frei, E. Metabolism of carcinogenic *N*-nitroso-*N*-methylaniline by purified cytochromes P450 2B1 and P450 2B2. *Cancer Letters* **1996**, *110* (1-2), 11–17. DOI: 10.1016/S0304-3835(97)89405-0.

Stiborová, M.; Schmeiser, H. H.; Wiessler, M.; Frei, E. Direct evidence for the formation of deoxyribonucleotide adducts from carcinogenic *N*-nitroso-*N*-methylaniline revealed by the 32P-post labeling technique. *Cancer Letters*. **1999**, *138* (1−2), 61−66. DOI: 10.1016/S0304-3835(98)00369-3.

Stracker, T. H.; Petrini, J. H. J. The MRN11 complex: starting from the ends. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2011**, *12* (2), 90-103. DOI: 10.1038/nrm3047.

Stratenwerth, B.; Geisen, S. M.; He, Y.; Beltzig, L.; Sturla, S. J.; Kaina, B. Molecular dosimetry of temozolomide: quantification of critical lesions, correlation to cell death responses, and threshold doses. *Molecular Cancer Therapeutics* **2021**, *20* (10), 1789–1799. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-21-0228.

Streeter, A. J.; Nims, R. W.; Sheffels, P. R.; Heur, Y. H.; Yang, C. S.; Mico, B. A.; Gombar, C. T.; Keefer, L. K. Metabolic denitrosation of *N*-nitrosodimethylamine *in vivo* in the rat. *Cancer Research* **1990**, *50* (4), 1144–1150.

Ström, C. E.; Johansson, F.; Uhlén, M.; Szigyarto, C. A.K.; Erixon, K.; Helleday, T. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate. *Nucleic Acids Research* **2011**, *39* (8), 3166–3175. DOI: 10.1093/nar/gkq1241.

Struck, R. F.; Kirk, M. C.; Witt, M. H.; Laster, W. R. Isolation and mass spectral identification of blood metabolites of cyclophosphamide: evidence for phosphoramide mustard as the biologically active metabolite. *Biomedical Mass Spectrometry* **1975**, *2* (1), 46–52. DOI: 10.1002/bms.1200020109.

Stucki, M.; Pascucci, B.; Parlanti, E.; Fortini, P.; Wilson, S. H.; Hübscher, U.; Dogliotti, E. Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene* **1998**, *17* (7), 835–843. DOI: 10.1038/sj.onc.1202001.

Sugimura, T. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* **2000**, *21* (3), 387-395. DOI: 10.1093/carcin/21.3.387

Sun, Y.; Xu, Y.; Roy, K.; Price, BD. DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. Mol.Cell.Biol **2007,** *27***,** 8502-9.

Suzuki, E.; Mochizuki, M.; Okada, M. Metabolic fate of *N*-methyl-*N*-dodecylnitrosamine in the rat, in relation to its carcinogenicity to the urinary bladder.*Japanese Journal of Cancer Research* **1981**, *72*, 713–716.

Svejstrup, J. Q. Rescue of arrested RNA polymerase II complexes. *Journal of Cell Science* **2003**, *116* (Pt 3), 447–451. DOI: 10.1242/jcs.00271.

Swedmark, S.; Romert, L.; Beije, B.; Diaz-Pohl, C.; Bäckbro, A. Dag Jenssen, Comparison of co-cultivation of V79 cells with rat hepatocytes and rat H4IIE hepatoma cells for studying nitrosamine-induced *hprt* gene mutations, *Mutagenesis* **1994**, *9* (4), 281–287. DOI: 10.1093/mutage/9.4.281.

SwissMedic, Potential nitrosamine contamination, (n.d.) https://www.swissmedic.ch/swissmedic/en/home/news/mitteilungen/aufforderung-zlinhaberinnen-ham.html, (accessed June 22, **2021**).

Symington, L. S.; Gautier, J. Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annual Review of Genetics* **2011**, 45, 247-271. DOI:10.1146//annurev-genet-110410-132435.

Synder, S.; Hsu, I. C.; Trump, B. F. Comparison of metabolic activation of carcinogens in human, rat, and hamster hepatocytes. *Mutation Research* **1987**, *182* (1), 31–39. DOI: 10.1016/0165-1161(87)90005-7.

Tang, J.; Chu, G. Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein. *DNA Repair* **2002**,*1* (8), 601-616. DOI: 10.1016/s1568-7864(02)00052-6.

Tano, K.; Shiota, S.; Collier, J.; Foote, R.S.; Mitra, S. Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O^6-alkylguanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1990**, *87*, 686–690. DOI: 10.1073/pnas.87.2.686.

Taylor, A. M. R.; Groom, A.; Byrd, P. J. Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)- its clinical resentation and molecular basis. *DNA Repair* **2004**, *3* (8-9),1219-1225. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.04.009.

Taylor, R. M.; Wickstead, B.; Cronin, S.; Caldecott, K. W. Role of a BRCT domain in the interaction of DNA ligase III-alpha with the DNA repair protein XRCC1. *Current Biology* **1998**, *8* (15), 877–880. DOI: 10.1016/s0960-9822(07)00350-8.

Teng, S.; Beard, K.; Pourahmad, J.; Moridani, M.; Easson, E.; Poon, R.; O'Brien, P. J. The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions* **2001**, *130-132* (1-3), 285–296. DOI: 10.1016/s0009-2797(00)00272-6.

Theodoropoulos, P. A.; Gravanis, A.; Tsapara, A.; Margioris, A. N.; Papadogiorgaki, E.; Galanopoulos, V.; Stournaras, C. Cytochalasin B may shorten actin filaments by a mechanism independent of barbed end capping. *Biochemical Pharmacology* **1994**, *47*, 1875–1881.

Thomas, D. N.; Wills, J. W.; Tracey, H.; Baldwin, S. J.; Burman, M.; Williams, A. N.; Harte, D. S. G.; Buckley, R. A.; Lynch, A. M. Ames test study designs for nitrosamine mutagenicity testing: qualitative and quantitative analysis of key assay parameters. *Mutagenesis* **2024**, *39* (2), 78-95. DOI: 10.1093/mutage/gead033.

Thomson, N. M.; Kenney, P. M.; Peterson, L. A. The pyridyloxobutyl DNA adduct, O^6-[4-oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanine, is detected in tissues from 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-treated A/J mice. *Chemical Research in Toxicology* **2003**, *16* (1), 1–6. DOI: doi.org/10.1021/tx025585k

Thresher A.; Foster R.; Ponting DJ.; Stalford SA.; Tennant RE.; Thomas R. Are all nitrosamines concerning? A review of mutagenicity and carcinogenicity data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2020**, *116*. doi: 10.1016/j.yrtph. 2020.104749.

Tomicic, M. T.; Aasland, D.; Naumann, S. C.; Meise, R.; Barckhausen, C.; Kaina, B.; Christmann, M. Translesion polymerase eta is upregulated by cancer therapeutics and confers anticancer drug resistance. *Cancer Research* **2014**, *74*, 5585–5596. DOI: 10.1158/0008-5472. CAN-14-0953.

Toni, L. S.; Garcia, A. M.; Jeffrey, D. A.; Jiang, X.; Stauffer, B. L.; Miyamoto, S. D.; Sucharov, C. C. Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. *MethodsX* **2018**, 599-608. DOI: 10.1016/j. mex. 2018.05.011.

Trefts, E.; Gannon, M.; Wassermann, D. H. The liver. *Current Biology* **2017**, *27* (21), 1147-1151. DOI: 10. 1016/j.cub. 2017. 09. 019.

Trewick, S. C.; Henshaw, T. F.; Hausinger, R. P.; Lindahl, T.; Sedgwick, B. Oxidative demethylation by Escherichia coli AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature* **2002**, *419* (6903), 174–178. DOI: 10.1038/nature00908.

Tricker, A. R. *N*-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids. *European Journal of Cancer Prevention* **1997**, *6* (3), 226–268.

Trucco, C.; Oliver, F. J.; De Murcia, G. ; Ménissier-de Murcia, J. DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Research* **1998**, *26* (11), 2644–2649. DOI: 10.1093/nar/26.11.2644.

Tsai, C. K.; Huang, L. C.; Wu, Y. P.; Kan, I. Y.; Hueng, D. Y. SNAP reverses temozolomide resistance in human glioblastoma multiforme cells through down-regulation of MGMT. *The Federation of American Societies for Experimental Biology* **2019**, *33*, 14171–14184.DOI: 10.1096/fj.201901021RR.

Tuesuwan, B.; Vongsutilers, V. Nitrosamine contamination in pharmaceuticals: threat, impact, and control. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2021**, *110* (9), 3118–3128. DOI: 10.1016/j.xphs.2021.04.021.

Urban, A. M.; Upadhyaya, P.; Cao, Q.; Peterson, L. A. Formation and repair of pyridyloxobutyl DNA adducts and their relationship to tumor yield in A/J mice. *Chemical Research in Toxicology* **2012**, *25*, 2167–2178. DOI: 10.1021/tx300245w.

Uziel, T.; Lerenthal, Y.; Moyal, L.; Andegeko, Y.; Mittelman, L.; Shiloh, Y. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *The EMBO Journal* **2003**, *22* (20), 5612-5621. DOI: 10.1093/emboj/cdg541.

Van Gijssel, H.E.; Maassen, C. B.; Mulder, G. J., Meerman, J. H. p53 protein expression by hepatocarcinogens in the rat liver and its potential role in mitoinhibition of normal

Valentin-Severin, I.; Le Hegarat, L.; Lhuguenot, J. C.; Le Bon, A. M.; Chagnon, M. C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutation Research* **2003**, *536* (1-2), 79–90. DOI: 10.1016/s1383-5718(03)00031-7.

Verma, A.; Verma, M.; Singh, A. Animal tissue culture principles and applications. *Animal Biotechnology* **2020**, 269–293. DOI: 10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4.

Vidicevic-Novakovic, S.; Stanojevic, Z.; Tomonjic, N.; Karapandza, K.; Zekovic, J.; Martinovic, T.; Grujicic, D.; Ilic, R.; Raicevic, S.; Tasic, J.; Isakovic, A. Proapoptotic and proautophagy effect of H1-receptor antagonist desloratadine in human glioblastoma cell lines. *Medical Oncology (Northwood, London, England)* **2023**, *40* (8), 241. DOI: 10.1007/s12032-023-02117-3.

Vogel, M. Carlsson, C. Skowron, C. Felske, S. E. Escher, J. Fahrer. Nitrosamine Drug Substance-Related Impurities cause DNA methylation adducts *in vitro* and in primary hepatocytes upon Cytochrome P450-dependend metabolic activation. *Regul Toxicol Pharmacol*. **2026** May;167:106036. doi: 10.1016/j.yrtph.2026.106036. Epub 2026 Jan 20. PMID: 41571032.

Völker, G.; Dräger, U.; Groß, P.; Hohorst, H. J. Studies on the spontaneous decomposition of 4-hydroxyphosphamide and 4-hydroperoxyphosphamide by means oft hin-layer chromatography. *Drug Research* **1974**, *24* (8), 1172-1176.

Völcker, G.; Giera, H. P.; Jäger, L.; Hohorst, H. J. Zur Bindung von Cyclophosphamid und Cyclophosphamid-Metaboliten an Serum-Albumin. *Zeitschrift fur Krebsforschung und*

klinische Onkologie. *Cancer Research and Clinical Oncology* **1978**, *91* (2), 127–142. DOI: 10.1007/BF00284020.

Walker, P.; van de Water, B.; Kleinjans, J.; Caiment, F. Comparing *in vitro* human liver models to *in vivo* human liver using RNA-Seq. *Archives of Toxicology* **2021**, *95* (2), 573–589. DOI: 10.1007/s00204-020-02937-6.

Wang, H.; Guan, J.; Perrault, A. R.; Wang, Y,.; Iliakis, G, Replication protein A2 phosphorylation after DNA damage by the coordinated action of ataxiatelangiectasia-mutated and DNA-dependent protein kinase, *Cancer Research* **2001**,*61* (23). 8554–8563.

Wang L., Spratt T. E, Pegg A. E, Peterson L. A. Synthesis of DNA oligonucleotides containing site-specifically incorporated O6-[4-oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanine and their reaction with O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Chemical Research in Toxicology* **1999,** *12*(2),127-31. DOI: 10.1021/tx980251.

Wani, A. A.; Wani, G.; D'Ambrosio, S. M. A human DNA repair activity specific for O^4-ethylthymine: identification and partial characterization. *Carcinogenesis* **1990**, *11*. 1419–1424, DOI: 10.1093/carcin/11.8.1419.

Ward, I. M.; Chen, J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (51), 47759–47762. DOI: 10.1074/jbc.C100569200.

Warren, A. J.; Ihnat, M. A.; Ogdon, S. E.; Rowell, E. E.; Hamilton, J. W. Binding of nuclear proteins associated with mammalian DNA repair to the mitomycin C-DNA interstrand crosslink. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **1998**, *31* (1), 70–81.

Westerink, W. M. A.; Schoonen, W. G. E. J. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicology In Vitro* **2007**, *21* (8), 1581-1591. DOI: 10.1016/j.tiv.2007.05.014.

Westerink, W. M. A.; Schoonen, W. G. E. J. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicology In Vitro* **2007**, *21* (8), 1592-1602. DOI: 10.1016/j.tiv.2007.06.017.

White, E. H., & Roswell, D. F. Chemiluminescence of organic hydrazides. *Accounts of Chemical Research* **1970**, *3* (2), 54-62.

White, P. A.; Long, A. S.; Johnson, G. E. Quantitative interpretation of genetic toxicity dose-response data for risk assessment and regulatory decision-making: current status and emerging priorities. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **2020**, *61* (1), 66–83. DOI: 10.1002/em.22351.

Whomsley, K. G. Safety profile of ranitidine. A review. *Drugs*. **1993**. *46* (6): 976–985.

WHO, IARC, 2004 World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to hmans. Volume 83. Tobacco

smoke and involuntary smoking. *IARC* **2004**, *83*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK316407/

Wickham, H. Data Analysis. *ggplot2* **2016**, 189–201. DOI: 10.1007/978-3-319-24277-4_9.

Wilkening, S.; Bader, A. Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **2003**, *17* (4), 207–213. DOI: 10.1002/jbt.10085.

Wilkening, S.; Stahl, F.; Bader, A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metabolism and Disposition* **2003**, *31* (8), 1035–1042. DOI: 10.1124/dmd.31.8.1035.

Williams, R. S.; Williams, J. S.; Tainer, J. A. Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochemsitry and Cell Biology* **2007***, 85* (4), 509-20. DOI: 10.1139/O07-069.

Wills, J. W.; Johnson, G. E.; Doak, S. H.; Soeteman-Hernández, L. G.; Slob, W.; White, P. A. Empirical analysis of BMD metrics in genetic toxicology part I: *in vitro* analyses to provide robust potency rankings and support MOA determinations. *Mutagenesis* **2016**, *31* (3), 255–263. DOI: 10.1093/mutage/gev085.

Wills, J. W.; Long, A. S.; Johnson, G. E.; Bemis, J. C.; Dertinger, S. D.; Slob, W.; White, P. A. Empirical analysis of BMD metrics in genetic toxicology part II: *in vivo* potency comparisons to promote reductions in the use of experimental animals for genetic toxicity assessment. *Mutagenesis* **2016**, *31* (3), 265–275. DOI: 10.1093/mutage/gew009.

Winter, H. K.; Ehrlich, V. A.; Grusch, M.; Lackner, A.; Schulte-Hermann, R.; Grasl-Kraupp, B.; Mikulits, W.; Knasmüller, S. Use of four new human-derived liver-cell lines for the detection of genotoxic compounds in the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutation Research* **2008**, *657* (2), 133–139. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2008.08.012.

Wogan, G. N.; Paglialunga, S.; Archer, M. C.; Tannenbaum, S. R. Carcinogenicity of nitrosation products of ephedrine, sarcosine, folic acid, and creatinine. *Cancer Research* **1975,** *35* (8), 1981–1984.

Wong, H. L.; Murphy, S. E.; Hecht, S. S. Cytochrome P450 2A-catalyzed metabolic activation of structurally similar carcinogenic nitrosamines: *N'*-nitrosonornicotine enantiomers, *N*-nitrosopiperidine, and *N*-nitrosopyrrolidine. *Chemical Research Toxicology* **2005**, *18* (1), 61–69. DOI: 10.1021/tx0497696.

Wu, D.; Ramin, S. A.; Cederbaum, A. I. Effect of pyridine on the expression of cytochrome P450 isozymes in primary rat hepatocyte culture. *Molecular and Cellular Biochemistry* **1997**, *173* (1-2), 103–111. DOI: 10.1023/a:1006831811622.

Wu, Y.; Adeel, M. M.; Xia, D.; Sancar, A.; Li, W. Nucleotide exzision repair of aflatoxin-induced DNA damage within the 3D human genome organization. *Nucleic Acids Research* **2024**, *52*, 11704-11719. DOI: 10.1093/nar/gkae755.

Xie H. J.; Yasar, U.; Lundgren, S.; Griskevicius, L.; Terelius, Y.; Hassan, M. Role of polymorphic CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation. *Pharmacogenomics Journal* **2003**, *3*, 53-61. DOI:10.1038/js.tpj.6500157.

Xu-Welliver, M.; Pegg, A. E. Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O^6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* **2002**, *23* (5), 823–830. DOI: 10.1093/carcin/23.5.823.

Yahagi, T.; Nagao, M., Seino, Y., Matsushima, T.; Sugimura, T.; & Okada, M. Mutagenicities of *N*-nitrosamines on salmonella. *Mutation Research* **1977**, *48* (2), 121-129. doi:10.1016/0027-5107(77)90151-8.

Yamazaki, H.; Inui, Y.; Yun, C. H.; Guengerich, F. P.; Shimada, T. Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of *N*-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* **1992** *13* (10), 1789–1794. DOI: 10.1093/carcin/13.10.1789.

Yamazaki, H.; Oda, Y.; Funae, Y.; Imaoka, S.; Inui, Y.; Guengerich, F. P.; & Shimada, T. Participation of rat liver cytochrome P450 2E1 in the activation of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylainine to products genotoxic in an acetyltransferase–overexpressing Salmonella typhimurium. *Carcinogenesis* **1992**, *13* (6), 979-985. DOI: 10.1093/carcin/13.6.979.

Yang, M.; Wang, C.; Zhou, M.; Bao, L.; Wang, Y.; Kumar, A.; Xing, C.; Luo, W.; Wang, Y. KDM6B promotes PARthanatos via suppression of O^6-methylguanine DNA methyltransferase repair and sustained checkpoint response. *Nucleic Acids Research* **2022**, *50* (11), 6313–6331. DOI: 10.1093/nar/gkac471.

Yasui, M.; Koyama, N.; Koizumi, T.; Senda-Murata, K.; Takashima, Y.; Hayashi, M.; Sugimoto, K.; Honma, M. Live cell imaging of micronucleus formation and development. *Mutation Research* **2010**, *692* (1-2), 12–18. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2010.07.009.

Yi-Hung, O.; Pei-Han, C.; Te-Ping, S.; Sheau-Yann, S. P53 C-terminal phosphorylation by CHK1 and CHK2 participates in the regulation of DNA-damage-induced C-terminal acetylation. *Journal of Molecular Cell Biology* **2005**, *16*(4),1684-1695. DOI: 10.1091/mbc.e04-08-0689.

Yoshimoto, K.; Mizoguchi, M.; Hata, N.; Murata, H.; Hatae, R.; Amano, T.; Nakamizo, A.; Sasaki, T. Complex DNA repair pathways as possible therapeutic targets to overcome temozolomide resistance in glioblastoma. *Frontiers in Oncology* **2012**, *2*, (186). DOI: 10.3389/fonc.2012.00186.

You, Z.; Bailis, J. M.; Johnson, S. A.; Dilworth, S. M.; Hunter, T. Rapid activation of ATM on DNA flanking double strand breaks. *Nature Cell Biology* **2007**, *9*, 1311-1318. DOI: 10.1038/ncb1651.

Yu, L., Waxman, D. J. Role of cytochrome P450 in oxazaphosphorine metabolism: deactivation via N-dechloroethylation and activation via 4-hydroxylation catalyzed by distinct subsets of rat liver cytochromes P450. *Drug Metabolism and Disposition* **1996**, *24* (11), 1254-1262.

Yuan, J. M.; Knezevich, A. D.; Wang, R.; Gao, Y. T.; Hecht, S. S.; Stepanov, I. Urinary levels of the tabacco- specific carcinogen *N'*-Nitrosonornicotine and its glucoronide are strongly associated with esophageal cancer risk in smokers. *Carcinogenesis* **2011**, *32* (9), 1366-1371. DOI: 10.1093/carcin/bgr125.

Yurochko, A. D.; Mayo M. W.; Poma E. E.; Baldwin A. S. Jr.; Huang E. S. Induction of the transcription factor Sp1 during human cytomegalovirus infection mediates upregulation of the p65 and p105/p50 NF-kappaB promoters. *Journal of Virology* **1997**, *71* (6), 4638-48. Doi: 10.1128/JVI.71.6.4638-4648.1997.

Zak, P.; Kleibl, K.; Laval, F. Repair of O^6-methylguanine and O^4-methylthymine by the human and rat O^6-methylguanine-DNA methyltransferases. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269* (1)730–733.

Zarth, A. T.; Upadhyaya, P.; Yang, J.; Hecht, S. S. DNA Adduct formation from metabolic 5'-Hydroxylation of the tobacco-specific carcinogen *N'*-Nitrosonornicotine in Hhman enzyme systems and in rats. *Chemical Research in Toxicology* **2016**, *29* (3), 380–389. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.5b00520.

Zeller, A.; Duran-Pacheco, G.; Guérard, M. An appraisal of critical effect sizes for the benchmark dose approach to assess dose–response relationships in genetic toxicology. *Archives of Toxicol*ogy **2017**, *91*, 3799–3807. DOI:10.1007/s00204-017-2037-3

Zhang, J.; Stevens, M. F. G.; Bradshaw, T. D. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current Molecular Pharmacology* **2012**, *5* (1), 102–114. DOI: 10.2174/1874467211205010102.

Zhang, S.; Wang, M.; Villalta, P. W.; Lindgren, B. R.; Upadhyaya, P.; Lao, Y.; Hecht, S.S. Analysis of pyridyloxobutyl and pyridylhydroxybutyl DNA adducts in extra-hepatic tissue of F344 rats treated chronically with 4-(Methylnitrosamino)1-(3-pyridyl)-1-butanone and Enantiomers of 4-(Methylnitrosamino)1-(3-pyridyl)-1-butanol. *Chemical Research in Toxicology* **2010**, *22* (5), 926-936. DOI: 10.1021/tx900015d.

Zhang, Z.; Heng, Z.; He, F.; Pang, X. Detection of DNA crosslinks with comet assay. *Wei sheng yan jiu = Journal of Hygiene Research* **2001**, *30* (3), 146–148.

Zielenska, M.; Guttenplan, J. Mutagenic activity and specifity of *N*-Nitrosomethylaniline and *N*-Nitrosodiphenylamine in Salmonella. *Mutation Research*, **1988**, *202*, 269-276. DOI: 10.1016/0027-5107(88)90189-3.

Zijno, P.; Leopardi, P.; Marcon, F.; Crebelli, R. Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence in situ hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Research* **1996**, *372* (2), 211-219. DOI: 10.1016/s0027-5107(96)00141-8.

Zurlo, J.; Arterburn, L. M. Characterization of a primary hepatocyte culture system for toxicological studies. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* **1996**, *32* (4), 211–220. DOI: 10.1007/BF02722948.

Anhang

Der Anhang befindet sich zusammen mit der PDF-Datei dieser Arbeit in elektronischer Form auf dem mit der Druckversion abgegebenen Datenträger. Die folgende Auslistung gibt einen Überblick über die Reihenfolge der dort abgelegten Daten.

A1: Auswertungen mit GraphPad Prism

A1.1 Metabolische Kompetenz

A1.2 Zellviabilität

A1.3 Western Blot

A1.4 Comet Assay

A1.5 DNA-Adduktmessungen

A1.6 Mikrokern Assay

A2: Auswertungen mit Excel

A2.1 Metabolische Kompetenz

A2.2 Zellviabilität

A2.3 Western Blot

A2.4 Comet Assay

A2.5 DNA-Adduktmessungen

A2.6 Mikrokern Assay

A3: Rohdaten

A3.1 Lichtmikroskopie

A3.2 Metabolische Kompetenz

A3.3 Zellviabilität

A3.4 Western Blot

A3.5 Comet Assay

A3.6 DNA-Adduktmessungen

A3.7 Mikrokern Assay

Danksagung

Mein erster Dank geht an Herrn Prof. Dr. Jörg Fahrer für die Möglichkeit, diese Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Ich bedanke mich für die hilfreichen Anregungen, Ihre Hilfsbereitschaft sowie für Ihre Unterstützung und für das entgegengebrachte Vertrauen. Vielen Dank für die abwechslungsreichen und spannenden Themen, die ich im Rahmen meines Forschungspraktikums, meiner Masterarbeit und dieser vorliegenden Arbeit bearbeiten durfte. Ich bedanke mich für die in diesem Zusammenhang erlernten Methoden.

Ich bedanke mich bei meinen Kollegen Max Carlsson und Melanie-Abel Beckmann für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei den Perfusionen. Ich danke herzlichst Tina Kostka für die Anregungen organisatorischer und fachlicher Art sowie für die angenehmen Unterhaltungen und Diskussionen. Ich bedanke mich bei Manuel Haas, Simon Wittmann, Philipp Demuth und Gabriel Ackermann die mir sehr viel von ihren Laborkenntnissen vermittelt haben. Vielen Dank für Eure Hilfe bei den unterschiedlichsten Fragestellungen und für Eure Geduld. Ich bedanke mich bei allen Doktoranden der AG Fahrer sowie der AG Kostka für die friedliche Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und die angeregten Gespräche.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Elke Richling für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Antonio Pierik für die Tätigkeit als Drittprüfer im Rahmen meiner Aussprache.

Meinen Dank richte ich an Herrn Prof. Dr. Manolikakes für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ich bedanke mich bei meinen Kooperationspartnern des EMA Projektes: Prof. Dr. Christina Ziemann, Michelle Djuari, Anke Londenberg, Dr. Sylvia Escher, Leroy Elenschneider, Dr. Roland Frötschl, Dr. Bodo Haas, Dr. George Johnson, Arianna Bassan, Dr. Kevin Cross, Prof. Dr. Josef Fangmann und Rhys Whomsley für den wissenschaftlichen Austausch und die gute Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei Dr. Matthias Vogel für die LC-MS Messungen der zellulären Metabolite und DNA-Addukte.

Ich bedanke mich außerdem von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden für Eure Geduld, Euer Verständnis und Eure Unterstützung.

Lebenslauf

Christina Marie Felske

Akademischer Bildungsweg

Seit 04/2022	**Promotion Toxikologie** Rheinland-Pfälzisch Technische Universität Kaiserslautern-Landau Fachbereich Lebensmittelchemie und Toxikologie • Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Jörg Fahrer
10/2019-02/2022	***Master of Science* Toxikologie** Rheinland-Pfälzisch Technische Universität Kaiserslautern-Landau Fachbereich Lebensmittelchemie und Toxikologie • Masterarbeit: Rheinland-Pfälzisch Technische Universität Kaiserslautern-Landau Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Jörg Fahrer • Thema: „Impact of CPI-613 on oncogenic signaling in human colorectal cancer cells“
05/2019 -10/2019	**Wissenschaftliche Mitarbeiterin** Universitätsklinikum des Saarlandes, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Markus Meyer
10/2015-04/2019	***Bachelor of Science* Angewandte Pharmazie** Hochschule Kaiserslautern, Fachbereich Angewandte Logistik- und Polymerwissenschaften • Bachelorarbeit: Universitätsklinikum des Saarlandes, Fachrichtung Experimentelle und Klinische Toxikologie, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Markus Meyer • Thema: „Application of *in vivo* and *in vitro* methods for the identification of the new psychoactive substances *N*-ethyl-*N*-propyltryptamine, 2-amino-indane and *N*-methyl-2-aminoindane“

Weiterbildungen

06/2025	**Weiterbildung zur Fachtoxikologin der DGPT** Absolvierter Kurs: Klinische Toxikologie, Universitäts-Klinikum des Saarlandes, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie

02/2025 **Weiterbildung auf dem Gebiet der Versuchstierkunde**
Absolviertes Seminar „Weiterbildung nach §3 Tierschutzversuchstierverordnung“, Universitätsmedizin Mainz, Translational Animal Research Center

09/2024 **Weiterbildung zur Fachtoxikologin der DGPT**
Absolvierter Kurs: 3Rs in Toxicity Testing, Universität Konstanz, Fachrichtung Ernährungstoxikologie

02/2022 **Weiterbildung auf dem Gebiet der Versuchstierkunde**
Absolviertes Modul: „Tierexperimentelle Eingriffe an Versuchstieren“, Universitätsmedizin Mainz, Translational Animal Research Center

Mitgliedschaften

- Gesellschaft für Toxikologie (GT) in der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT)
- Gesellschaft für Umwelt – Mutationsforschung e.V. (GUM)
- Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V. (GDCh) Fachgruppe Lebensmittelchemische Gesellschaft (LChG)

Publikationsliste

- M. Vogel; M. J. Carlsson; C. Skowron; **C. Felske**; Whomsley, R.; Fahrer, J. Nitrosamine Drug Substance-Related Impurities cause DNA methylation Adducts *in vitro* and in primary hepatocytes upon Cytochrome P450-dependent metabolic activation. Regulatory Toxicology and Pharmacology 106036 2026. DOI: 10.1016/j.yrtph.2026.106036.

- Carlsson, M. J.; Herzog, N.; **Felske,C.**; Ackermann, G.; Regier, A.; Wittmann, S.; Cereijo, R. F.; Sturla, S. J.; Küpper, J. H.; Fahrer, J. The DNA Repair Protein MGMT protects against the genotoxicity of *N*-Nitrosodimethylamine, but not *N*-*N*itrosodiethanolamine and *N*-Nitrosodimethylaniline, in Human HepG2 Liver Cells with CYP2E1 Expression. *Chemical Research in Toxicology* **2025,** *38* (6). DOI: 10.1021/acs.chemrestox.5c00133.
- Rief, V.; **Felske, C.**; Scharinger, A.; Krumbügel, K.; Stegmüller, S.; Breitling-Utzmann, C. M.; Richling, E.; Walch, S. G.; Lachenmeier, D. W. Indirect Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopic Determination of Acrylamide in Coffee Using Partial Least Squares (PLS) Regression. *Beverages* **2021,** *7* (31). **2021**, DOI: 10.3390/beverages 7020031.
- Wagmann, L.; Manier, S. K.; **Felske, C.**; Gampfer, T.; Richter, M. J.; Eckstein, N.; Meyer, M. R. Flubromazolam-Derived Designer Benzodiazepines: Toxicokinetics and Analytical Toxicology of Clobromazolam and Bromazolam. *Journal of Analytical Toxicology* **2020***, 45* (9). DOI: 10.1093/jat/bkaa161.
- Manier, S. K.; **Felske, C.**; Zapp, J.; Eckstein, N.; Meyer, M. R.: Studies on the *In Vitro* and *In Vivo* Metabolic Fate of the New Psychoactive Substance *N*-Ethyl-*N*-Propyl-Tryptamine (EPT) for Analytical Purposes. *Journal of Analytical Toxicology* **2020** *45* (2). DOI:10.1093/jat/bkaa060.
- Wagmann, L.; Manier, S. K.; Bambauer, T. P.; **Felske, C.**; Eckstein, N.; Flockerzi, V.; Meyer, M. R. Toxikokinetics and Analytical Toxicology of Flualprazolam: Metabolic Fate, Isoenzyme Mapping, Human Plasma Concentration and Main Urinary Excretion Products. *Journal of Analytical Toxicology,* **2020,** *44* (6). DOI: 10.1093/jat/bkaa019.

- Manier, S. K.; **Felske, C.;** Eckstein, N.; Meyer, M. R. The metabolic fate of the two new psychoactive substances 2-aminoindane and *N*-methyl-2-aminoindane studied *in vitro* and *in vivo* to support drug testing. *Drug Testing and Analysis* **2019**,*12* (1), DOI: 10.1002/dta.2699.

Kongressteilnahme

- 25.03.-28.03.2025: 91. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) - Hannover Deutschland, Posterpräsentation
- 20.03.-22.03.2024: 34. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung (GUM) - Kaiserslautern, Deutschland, Posterpräsentation
- 05.03.-06.03.2024: Regionalverbandstagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (LChG) – Kaiserslautern, Deutschland, Posterpräsentation