Fachbereich Chemie
Fachrichtung Lebensmittelchemie und
Umwelttoxikologie
Prof. Dr. G. Eisenbrand

Charakterisierung DNA-schädigender Wirkungen mittels Comet Assay und *hPRT*-Genmutations-Assay: Ein Vergleich zwischen α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen, Epoxiden und *N*-Nitroso-verbindungen

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation
(D386)

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin
Silke Thielen geb. Fritzen

Betreuer: Prof. Dr. G. Eisenbrand
Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 13. Dezember 2007

Kaiserslautern 2007

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen August 2003 und August 2006 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern

---

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 13. Dezember 2007

Prüfungskommission
Vorsitzender: Prof. Dr. S. Ernst
1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand für die Überlassung des interessanten Themas sowie ihm und Herrn Dr. M. Baum für die Anregungen und die Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
AA-Cys-Hb	Acrylamid-Cystein-Addukte
AA-Val-Hb	Acrylamid-Valin-Addukte
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolinsulfonat
Ac	Acrolein
α-Acetoxy NDELA	α-Acetoxy-*N*-Nitroso-diethanolamin
Ac-AA-Cys	N-Acetyl-S-(2-aminocarbonylethyl)-cystein
Ac-2GA-Cys	N-Acetyl-S-(1-aminocarbony-2-hydroxylethyl)-cystein
Ac-3GA-Cys	N-Acetyl-S-(2-aminocarbony-2-hydroxylethyl)-cystein
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADI	„acceptable daily intake"; duldbare tägliche Aufnahme
AlDH	Aldehyddehydrogenase
ALS	alkali-labile Stellen
AP Stellen	apurinische /apyrimidinische Stellen
B[a]P	Benzo[a]pyren
BER	„base excision repair"; engl. für Basenausschneidereparatur
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BPDE	Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid
BSO	DL-Buthionin-[S,R]-Sulfoximin
CE	cloning efficiency
cEH	cytosolische Epoxidhydrolase
CENU	Chloro-ethyl-nitrosoharnstoffe
CYP450	Cytochrom P450
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
dTP(he)	(2'-Deoxythymidin)-3'-(2-hydroxyethyl)-phosphat
EDI	„estimated daily intake"; engl. für geschätzte täg-liche Aufnahme
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EH	Epoxidhydrolase
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
ESB	DNA-Einzelstrangbruch
FaPy	Formamido-pyrimidin
FEN-1	Flap-Endonuklease-1
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FPG	Formamido-pyrimidin-DNA-glykosylase
GA	Glycidamid
GA-Cys-Hb	Glycidamid-Cystein-Addukte
GA-Val-Hb	Glycidamid-Valin-Addukte
GD	Glyceramid
GGR	globale Genom-Reparatur
GMP	Guanosin-5’-monophosphat (Guanylat)
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
GST	Glutathion-S-Transferase
(he)pdT	(2’-Deoxythymidin)-5’-(2-hydroxyethyl)-phosphat
HENU	*N*-(2-hydroxyethyl)-N-nitroso-urea (-Harnstoff)
Hex	2-Hexenal
HPBS	phosphatgepufferte Salzlösung + Hepes
hPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-transferase
IMP	Inosin-5’-monophosphat
i. p.	Intra-peritoneal
KG	Körpergewicht
LD_{50}	mittlere letale Dosis
LMA	low melting agarose
LOD	„limit of Detection“; Nachweisgrenze
MCE	Mittelwert der Kolonienzahlen der CE
mEH	mikrosomale Epoxidhydrolase
2-Me-NOZ-5	2-Methyl-*N*-Nitroso-oxazolidin-5-on
4-Me-NOZ-5	4-Methyl-*N*-Nitroso-oxazolidin-5-on
MF	Mutationsfrequenz
MF_0	Spontanmutationsfrequenz
MGMT	O^6-Methyl-Guanin-Methyltransferase
MNG	1-Methyl-2-nitroso-guanidin
MNNG	*N*-Methyl-N’-Nitro-N-nitrosoguanidin

MNU	*N*-Methyl-N-nitroso-urea (-Harnstoff)
n	Anzahl unabhängiger Versuche
NAPA	N-(3,3-dimethylbutyl)-L-α-aspartyl-L-phenylalanin
NDELA	*N*-Nitroso-diethanolamin
n. e.	nicht-enzymatisch
NER	„nucleotid excision repair“, engl. für Nukleotidausschneidereparatur
NMA	normal melting agarose
N-Medium	FKS-haltiges Zellkulturmedium
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
NOZ-2	*N*-Nitroso-oxazolidin-2-on
NOZ-5	*N*-Nitroso-oxazolidin-5-on
NPRO	Nitrosoprolin
p.a.	pro analysi = analysenrein
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	„phosphate saline buffer“; engl. für phosphatgepufferte Salzlösung
PJ	Propidiumjodid
Pol	Polymerase
PRPP	Phosphoribosyl-α-pyrophosphat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen/Minute
RT	Raumtemperatur
SCE	“sister chromatid exchange”; engl. für: Schwester-Chromatid-Austausch
SCF	Scientific Committee on Food
SCGE	„single-cell-gel-electrophoresis“; Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay)
S-Medium	serumfreies Zellkulturmedium
TCR	“transcription-coupled repair”; engl. für Transkriptions-gekoppelte Reparatur
TI (%)	„Tail Intensity“; engl. für Schweifintensität
tk-Gen	Thymidin-Kinase-Gen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
UDS Assay	unscheduled DNA synthesis assay
WHO	World Health Organisation

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung ... 1
2. Problemstellung ... 3
3. Theoretische Grundlagen ... 6
3.1. Prinzipien der Risikobewertung ... 6
3.2. Chemische Kanzerogenese ... 8
3.2.1. Mehrstufenmodell der Kanzerogenese ... 8
3.2.2. Biochemische Grundlagen der DNA ... 9
3.2.3. DNA-Alkylierung und -Reparatur ... 10
3.2.4. N-Alkylierung ... 11
3.2.4.1. N^7-Guanin-Addukte ... 11
3.2.4.1.1. Apurinische / apyrimidinische Stellen (AP Stellen) ... 11
3.2.4.1.2. Imidazol-Ringöffnung zu Formamido-pyrimidinen (FaPy) ... 13
3.2.4.2. Base Excision Repair (BER) ... 14
3.2.5. O-Alkylierung ... 16
3.2.5.1. O^6-Guanin-Addukte ... 16
3.2.5.2. Reparatur durch O^6-Methyl-Guanin-Methyl-Transferase (MGMT) ... 17
3.2.6. „Bulky adducts“ ... 18
3.2.6.1. Nucleotid Excision Repair (NER) ... 18
3.3. Mutationen ... 20
3.3.1. Genmutationen ... 20
3.4. α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen ... 21
3.4.1. Acrylamid ... 21
3.4.1.1. Verwendung und Vorkommen von Acrylamid ... 21
3.4.1.2. Acrylamid in Lebensmitteln ... 22
3.4.1.2.1. Expositionsabschätzung ... 24
3.4.1.3. Toxikokinetik von Acrylamid ... 24
3.4.1.3.1. Aufnahme und Verteilung ... 24
3.4.1.3.2. Metabolismus von Acrylamid ... 25
3.4.1.3.3. Interaktion mit Makromolekülen ... 26
3.4.1.3.4. Ausscheidung ... 28
3.4.1.4. Toxikologie von Acrylamid ... 32
3.4.1.4.1. Neurotoxizität ... 32
3.4.1.4.2. Reproduktionstoxizität ... 32
3.4.1.4.3. Genotoxizität und Mutagenität ... 33
3.4.1.4.4. Kanzerogenität ... 35

3.4.2. 2-Alkenale (Acrolein und 2-Hexenal) 38
3.4.2.1. Vorkommen und Gehalte in Lebensmitteln 38
3.4.2.2. Biotransformation 38
3.4.2.3. Cytotoxizität 39
3.4.2.4. Genotoxizität und Mutagenität 40
3.4.2.5. Interaktion mit der DNA 40
3.5. Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) 42
3.5.1. Benzo[a]pyren (B[a]P) 42
3.5.1.1. Aufnahme, Verteilung und Exkretion 43
3.5.1.2. Metabolismus 43
3.5.1.3. DNA-Interaktion 45
3.5.1.4. Mutagenität 46
3.6. N-Nitrosoverbindungen 48
3.6.1. *N*-Nitrosamine 48
3.6.1.1. Entstehung und Vorkommen 48
3.6.1.2. Aufnahme und Verteilung 50
3.6.1.3. Metabolismus 50
3.6.1.4. *N*-Nitroso-diethanolamin (NDELA) 51
3.6.1.4.1. Metabolismus und Interaktion mit der DNA 51
3.6.1.4.2. Toxizität 53
3.6.1.4.3. α-Acetoxy-NDELA 54
3.6.1.5. *N*-Nitroso-oxazolidinone 55
3.6.1.5.1. Mögliche Entstehung und Vorkommen 55
3.6.1.5.2. Endogene Nitrosierung 57
3.6.1.5.3. Metabolismus und Interaktion mit der DNA 58
3.6.1.6. N-(3,3-dimethylbutyl)-L-α-aspartyl-L-phenylalanin (NAPA) 60
3.6.2. *N*-Nitrosamide 61
3.6.2.1. *N*-Nitrosoharnstoffe 61
3.6.2.2. *N*-Nitrosoguanidine (*N*-Methyl-N'-Nitro-N-nitrosoguanidin; MNNG) 62
3.7. Methodische Grundlagen 64
3.7.1. Blut 64
3.7.2. V79 Zellen 66
3.7.3. Einzelzell-Gelelektrophorese (SCGE; Comet Assay) 67
3.7.3.1. Modifikation des pH-Wertes 69
3.7.3.2. Formamido-pyrimidin-DNA-glykosylase (FPG) 69
3.7.4. Prinzip des *hPRT*-Genmutations-Assay 70
4. Ergebnisse und erste Diskussion 73

4.1. Genotoxizität in Vollblut und isolierten Lymphozyten 74
4.1.1. Induktion von DNA-Schäden in humanem Vollblut 74
4.1.2. Induktion von DNA-Schäden in humanen isolierten Lymphozyten 84
4.1.3. Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse in humanem Vollblut und isolierten Lymphozyten 88
4.2. Genotoxizität in V79 Zellen 90
4.2.1. Induktion von DNA-Schäden in V79 Zellen 90
4.2.2. Kinetik der Abnahme von DNA-Schäden in V79 Zellen 104
4.2.3. Induktion von Mutationen am *hPRT*-Locus in V79 Zellen 110
4.2.4. Einfluss von GSH auf die Induktion von DNA-Schäden in V79 Zellen 116
4.2.5. Bestimmung des Verhältnisses von AP Stellen und FaPy mit Hilfe des Comet Assays bei pH >13 und 12,1 120
4.2.6. Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse in V79 Zellen 124
4.3. Induktion von DNA-Schäden in primären Rattenhepatozyten 131
4.3.1. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse in Hepatozyten 133
5. Zusammenfassung und Diskussion 135
I) Genotoxizität in Vollblut und isolierten Lymphozyten 135
II) Genotoxizität in V79 Zellen 138
III) Induktion von DNA-Schäden in primären Rattenhepatozyten 143
6. Abschlussdiskussion 145
7. Material und Methoden 148
7.1. Blutentnahme, Lymphozytenisolierung und Zellkultur 148
7.1.1. Blutentnahme 148
7.1.2. Lymphozytenisolierung 148
7.1.3. Kultivierung der V79-Zelllinie 149
7.1.3.1. Grundlagen 149
7.1.3.2. Mediumwechsel 149
7.1.3.3. Subkultivierung (Passage) 150
7.1.3.4. Bestimmung der Zellzahl und Viabilität 150
7.1.3.5. Einfrieren der Zellen 150
7.1.3.6. Auftauen der Zellen 150
7.1.3.7. Mykoplasmentest 151
7.1.4. Isolierung und Kultivierung parenchymaler Leberzellen 151
7.1.4.1. *In-situ* Perfusion einer Rattenleber und Präparation von Hepatozyten 151
7.1.4.2. Bestimmung von Zellzahl und Viabilität 152
7.1.4.3. Herstellung der Kollagenlösung 152
7.1.4.4. Kollagenierung von Gewebekulturschalen 153

7.1.4.4.1. Kultivierung von Hepatozyten auf kollagenierten Gewebekulturschalen ... .153
7.2. Einzelzell-Gelelektrophorese (SCGE; Comet Assay) 153
7.2.1. Vorbereitung der Objektträger 154
7.2.2. Inkubation 154
7.2.2.1. Vollblut 154
7.2.2.2. Lymphozyten 154
7.2.2.3. V79 Zellen 155
7.2.2.4. Primäre Rattenhepatozyten 155
7.2.2.5. Reduktion der DNA-Schäden in V79-Zellen 156
7.2.3. Inkubation mit FPG 156
7.2.4. Elektrophorese 156
7.2.5. Neutralisation, Anfärbung der DNA und mikroskopische Auswertung 156
7.3. hPRT-Genmutations-Assay 157
7.3.1. Durchführung des hPRT-Genmutations-Assay 157
7.3.2. Anhaltspunkte zur Etablierung des Testablaufs 158
7.3.3. Auswertung 159
7.4. Reagenzien, Materialien und Geräte 160
7.4.1. Reagenzien 160
7.4.2. Geräte 164
7.4.3. Verbrauchsmaterialien 164
8. Literatur 166

1. Einleitung

Krebs ist neben kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Im Jahr 1999 waren in etwa 25% aller Todesfälle auf die Bildung von Krebs zurückzuführen [Quelle: Statistisches Bundesamt, 2000].

Die Entstehung von Krebs wird überwiegend mit der Einwirkung einer Vielzahl exogener Kanzerogene assoziiert, denen der Mensch in seinem natürlichen Umfeld, am Arbeitsplatz oder durch die Aufnahme von Lebensmitteln ausgesetzt ist. Im Mehrstufenprozess der chemischen Kanzerogenese wirken exogene Risikofaktoren hauptsächlich in den Stufen Initiation und Promotion. Die folgenden Schritte der Progression können in zunehmendem Maß auch unabhängig von exogenen Faktoren verlaufen. Der Prozess der Tumorentstehung wird also meist durch äußere Einflüsse initiiert und verläuft dann zunehmend autonom.

Kanzerogene Stoffe werden in zwei Hauptgruppen unterteilt. Für die Einteilung entscheidend ist ihr Verhalten gegenüber der DNA.

Die erste Gruppe umfasst die genotoxischen Kanzerogene. Sie sind in der Lage, die DNA zu schädigen und in der Folge Mutationen auszulösen. Unterschieden werden direkt wirkende genotoxische Kanzerogene, die aufgrund ihrer Struktur direkt mit der DNA interagieren sowie indirekt wirkende genotoxische Kanzerogene, die erst nach metabolischer Aktivierung reaktiv gegenüber der DNA sind.

Zur zweiten Gruppe zählen die epigenetischen Kanzerogene, welche nicht mit der DNA interagieren, sondern durch andere biologische Wirkungen das selektive Wachstum von Tumorvorstufen fördern. Dazu zählen u. a. Cytotoxizität, die eine gesteigerte Zellproliferation auslöst, chronische Entzündungsreaktionen, hormonelle und immunologische Einflüsse [Marquardt und Pfau, 2004].

Zur Risikoabschätzung von Kanzerogenen ist die Charakterisierung des zugrunde liegenden Wirkmechanismus entscheidend.

Konservativ betrachtet wird eine lineare Beziehung zwischen der Exposition mit genotoxischen Kanzerogenen, der Induktion von DNA-Schäden sowie der Manifestation mutagener Veränderungen zugrunde gelegt [Henderson et al., 2000].

Allerdings besitzen Säugerzellen *in-vivo* verschiedene Schutzmechanismen, die - sofern sie nicht überlastet sind - der Entstehung und Manifestation dieser Veränderungen entgegenwirken können.

Dazu zählt die chemische Detoxifizierung von Kanzerogenen durch deren Interaktion mit anderen nukleophilen Zellbestandteilen als der DNA, wie z.B. Glutathion (GSH) oder Proteine.

Ist die Bindung des Kanzerogens an die DNA favorisiert, sind die Zellen ferner in der Lage, die veränderten Nukleotid-Basen durch verschiedene DNA-Reparaturmechanismen aus der DNA zu entfernen.
Daraus ergibt sich theoretisch ein Schwellenwert, unterhalb dessen experimentell kein signifikanter Anstieg der Mutationsrate detektierbar sein sollte [Baum et al., 2005a; Jenkins et al., 2005].
Für nicht-genotoxische Kanzerogene konnte die Existenz solcher Schwellenwerte gezeigt werden. Im Gegensatz dazu, wird für genotoxische Kanzerogene angenommen, dass aufgrund der direkten Interaktion mit der DNA und dem damit verbundenen Potential zur Bildung von Mutationen, kein Schwellenwert existiert. Da das Risiko der Krebsinzidenz zwar mit abnehmender Dosis einer genotoxisch-kanzerogenen Substanz unwahrscheinlicher, allerdings theoretisch niemals gleich null wird, kann für genotoxische Kanzerogene kein Schwellenwert angegeben werden [Kirsch-Volders et al., 2000; Barlow et al., 2006].

Unter der Annahme, dass Säugerzellen *in-vivo* allerdings bis zu einem gewissen Maß in der Lage sind, genotoxische Kanzerogene zu entgiften bzw. durch DNA-Reparatur die Weitergabe der fehlerhaften Information an die Tochterzelle und damit die Entstehung von Mutationen zu unterbinden, wird vermutet, dass auch für genotoxische Kanzerogene ein Dosisbereich existiert, in welchem der biologische Effekt nicht signifikant wird.

2. Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Genotoxizität von Acrylamid (AA) und dessen reaktivem Metaboliten Glycidamid (GA) im Vergleich zu bekannten Kanzerogenen und genotoxischen Agentien mit Hilfe verschiedener Modifikationen des Comet Assays sowie mittels *hPRT*-Genmutations-Assay zu prüfen. Vergleichend untersucht wurden das potente Kanzerogen (±)-Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (±-BPDE), die α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen Acrolein (Ac) und 2-Hexenal (Hex), die die DNA direkt alkylieren sowie verschiedene *N*-Nitrosoverbindungen, welche durch metabolische oder hydrolytische Aktivierung in DNA-alkylierende Intermediate überführt werden.

Insbesondere sollte der Zusammenhang zwischen DNA-Alkylierung, Detoxifizierung, DNA-Reparatur (Comet Assay) und der Entstehung von Mutationen (*hPRT*-Genmutations-Assay) untersucht werden.

Die Selektivität des Comet Assays wurde durch verschiedene Modifikationen gesteigert. Dies sind im Einzelnen die Variation des pH-Wertes während DNA-Entwindung und Elektrophorese sowie die zusätzliche Verwendung des DNA-Reparaturenzyms Formamido-pyrimidin-DNA-glykosylase (FPG).

Als Zellsysteme wurden humanes Vollblut, isolierte Lymphozyten sowie fibroblastoide V79 Zellen aus dem Lungengewebe des männlichen chinesischen Hamsters verwendet. Die Bestimmung der Genotoxizität von *N*-Nitrosoverbindungen, die durch Phase I Enzyme des Fremdstoffmetabolismus aktiviert werden, erfolgte in primären Rattenhepatozyten.

Abb. 1 zeigt das der Arbeit zugrunde liegende Arbeitskonzept.

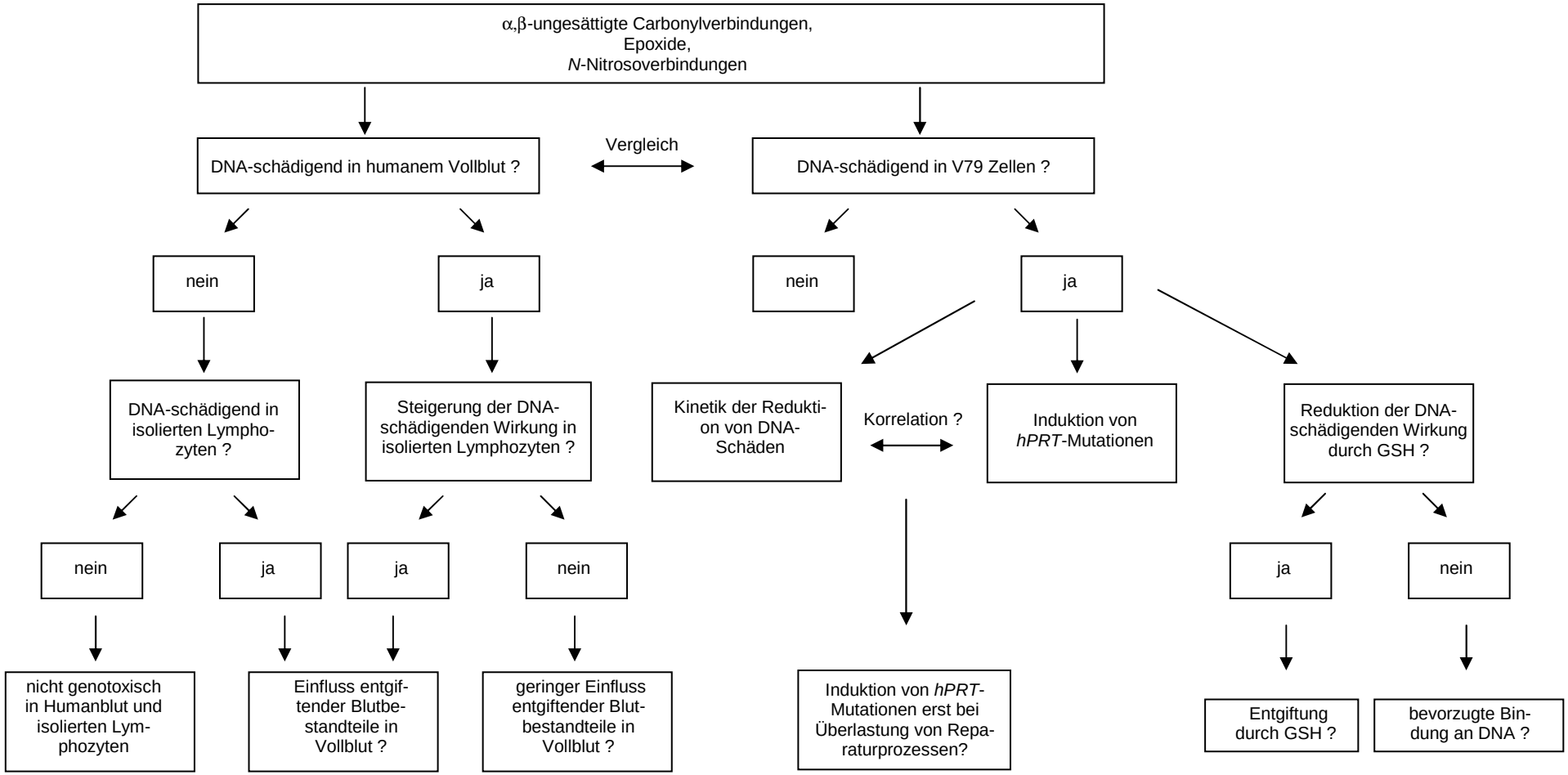


Abb. 1: Arbeitskonzept

Im Einzelnen sollten folgende Aspekte im Rahmen der Arbeit berücksichtigt werden:

- In humanem Vollblut sollte die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch AA und GA im Vergleich zu den α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen Acrolein und 2-Hexenal, den *N*-Nitroso-verbindungen α-Acetoxy-NDELA, MNU sowie vier verschiedenen *N*-Nitroso-oxazolidinonen und dem potenten Kanzerogen ±-Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (±-BPDE) mit Hilfe des alkalischen Comet Assays (± FPG) bestimmt werden.
- In isolierten Lymphozyten sollte im Vergleich zu Vollblut untersucht werden, ob das DNA-schädigende Potential der Substanzen in Abwesenheit detoxifizierender Verbindungen verstärkt wird.
- Im Vergleich zu humanem Vollblut wurde in V79 Zellen die Induktion von DNA-Schäden durch die oben genannten Verbindungen sowie durch das *N*-Nitrosamid HENU mit Hilfe des alkalischen Comet Assays (± FPG) untersucht.
- Durch Co-Inkubation mit Glutathion (GSH) sollte in V79 Zellen geklärt werden, ob ausgewählte Substanzen durch GSH entgiftet oder im Fall von MNNG aktiviert werden und dadurch das DNA-schädigende Potential beeinflusst werden kann. Auch hier wurde der alkalische Comet Assay (± FPG) verwendet.
- Die Variation des pH-Wertes während der DNA-Entwindung und Elektrophorese im Comet Assay kann Informationen über die Art der erhaltenen DNA-Strangbrüche geben und erlaubt u. a. die Unterscheidung in DNA-Einzel- (ESB) und Doppelstrangbrüche (DSB) sowie insbesondere alkali-labile Stellen. Es wurden daher vergleichend zu den Ergebnissen des alkalischen Comet Assays, ausgewählte Verbindungen auf ihre DNA-Strangbruch-Induktion im Comet Assay bei pH 12,1 untersucht. Durch diese Modifikation sowie den zusätzlichen Einsatz von FPG sollten Aussagen darüber getroffen werden, ob DNA-Addukte an der N^7-Position von Guanin bevorzugt depuriniert oder zum Formamido-pyrimidin ring-geöffnet werden.
- Da die Mutagenität von Fremdstoffen mit der Fähigkeit zur Reparatur von DNA-Modifikationen eng verbunden ist, wurde neben der Bestimmung des mutagenen Potentials mittels *hPRT*-Genmutations-Assay auch die Persistenz der induzierten DNA-Schäden bestimmt. Dies erfolgte mit Hilfe des alkalischen Comet Assays (± FPG) durch Bestimmung der Kinetik der Reduktion von DNA-Strangbrüchen durch Nachkultivierung der inkubierten V79 Zellen in serumhaltigem Zellkulturmedium.

3. Theoretische Grundlagen

3.1. Prinzipien der Risikobewertung

Die Regulatorische Toxikologie setzt sich mit Konzepten der Risikoabschätzung und des Risikomanagements von Stoffen mit potentiell toxischen Wirkungen auseinander. Unter Risikoabschätzung wird der Prozess von der Identifizierung des Gefährdungspotentials bis zur quantitativen Charakterisierung der Risiken bezeichnet. Der National Research Council hat die Risikoabschätzung in folgende Teilschritte untergliedert:

- Beschreibung der toxischen Stoffeigenschaften (Hazard Identification),
- Dosis-/Wirkungsabschätzung (Dose-Response Assessment)
- Expositionsabschätzung (Exposure Assessment)
- Risiko-Charakterisierung (Risk Characterization) und Risikoabschätzung.

Risikoabschätzungen für den Menschen auf der Basis von tierexperimentellen Befunden sind meist auf Extrapolationen verschiedener Art angewiesen:

a) von experimentell hohen zu niedrigen Dosen
b) vom Tier zum Menschen
c) von kurzer auf lange Expositonsdauer.

Je besser der toxische Wirkmechanismus bekannt ist, desto genauer können diese Faktoren abgeschätzt werden.
Zu unterscheiden sind Sicherheits- und Risikobeurteilung. Ziel der Sicherheitsbeurteilung ist die Erstellung von Expositionsrichtwerten. Als Anhaltspunkte dienen der NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) oder eine „benchmark“ Dosis, deren extrapolierter Wert einem akzeptablen Risiko entspricht. Im Gegensatz dazu erfolgt die Risikoabschätzung im Zusammenhang mit erhöhten Expositionen. Durch Vergleich der Expositionsdosen mit dem Verlauf der Dosis-Wirkungskurve kann das Maß einer Gefährdung eingestuft werden.
Derzeit werden für Stoffe mit toxikologisch abgeleitetem Schwellenwert (NOEL = No Observed Effect Level) zwei unterschiedliche Konzepte zur Risikoabschätzung diskutiert, das Grenzwertkonzept und das Konzept des Sicherheitsabstandes (Margin of Safety = MOS). Bei ersterem wird der experimentell ermittelte NOAEL durch Sicherheitsfaktoren (meist 10 oder 100) dividiert und somit für den Menschen gesundheitlich duldbare Werte, z.B. der ADI (Acceptable Daily Intake)-Wert ermittelt. Der ADI-Wert beziffert die maximale tägliche Aufnahmemenge einer Substanz von Fremdstoffen in Lebensmitteln, der ein Mensch über die gesamte Lebensspanne ausgesetzt sein kann, ohne gesundheitliche

Schäden davonzutragen. Im Gegensatz zum Grenzwertkonzept beruht das MOS-Konzept nicht auf der Festlegung von akzeptablen Mengen, sondern auf der Bewertung und Abschätzung des Abstandes (Margin of Safety) zwischen der im Experiment noch toxischen und der für den Menschen zu erwartenden einwirkenden Dosis. Beide Konzepte berücksichtigen neben Intensität und Art der Schädigung auch die Dosis-Wirkungsbeziehung sowie die Variabilität der Kinetik innerhalb der untersuchten Spezies.

Im Gegensatz dazu, beruht die Risikobewertung genotoxischer Kanzerogene auf dem so genannten Minimierungskonzept. Da das Risiko der Krebsinzidenz zwar mit abnehmender Dosis einer genotoxischen und kanzerogenen Substanz unwahrscheinlicher, allerdings theoretisch niemals gleich null wird, kann für genotoxische Kanzerogene kein Schwellenwert angegeben werden. Ziel des Minimierungskonzeptes ist daher die Minimierung der Exposition des Verbrauchers auf ein gesellschaftlich tolerierbares Risiko.

Ende 2005 legte die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) einen Entwurf zu einer harmonisierten Strategie für die Risikobewertung von genotoxischen Kanzerogenen vor. Zuvor wurde in diesem Zusammenhang meist zur Anwendung des ALARA (as low as reasonably achievable)-Prinzips geraten. Der Gehalt einer genotoxischen und kanzerogenen Substanz in einem Produkt soll danach auf ein Niveau verringert werden, wie dies mit vertretbarem (technologischen) Aufwand möglich ist. Da dieses Prinzip insbesondere im Hinblick auf die nicht mögliche Unterscheidung verschiedener Risikoniveaus, deutliche Defizite aufweist, empfahl die EFSA die Einführung eines Margin of Exposure (MOE). Dieser wird als Abstand zwischen zwei Größen berechnet und stellt damit das Verhältnis zwischen einer kanzerogenen Effektdosis, abgeleitet aus der Dosis-Wirkungskurve im Tierversuch, und der abgeschätzten menschlichen Aufnahme dar [BfR, 2005].

Als geeigneten Bezugspunkt sieht die EFSA die untere statistische Vertrauensgrenze einer Benchmark-Dosis ("Benchmark Dose Lower Confidence Limit", BMDL), also die Dosis, die im Tierversuch eine Tumorinzidenz von 10% bewirkt. Liegt die MOE bei ≥10.000, schätzt die EFSA das vorliegende kanzerogene Risiko eher niedrig ein. Je weiter die MOE dagegen unter 10.000 liegt, desto größer scheint das Risiko und desto dringlicher werden Minimierungsmaßnahmen erforderlich. Im Fall von Acrylamid (AA) liegt die MOE bei 1000. Im Vergleich dazu wird für Aflatoxine und flüchtige Nitrosamine ein Wert von 100.000 erreicht, für Nitrofurane liegt die MOE bei 1.000.000.

Der Vorteil des MOE-Ansatzes besteht darin, dass zwischen Risiken verglichen werden kann, die durch diese Substanzen hervorgerufen werden, und auf der jeweiligen Wirkungsstärke der Substanz sowie der möglichen Expositionsniveaus in der Bevölkerung beruhen. Der MOE-Ansatz bietet daher die Möglichkeit, Maßnahmen zu definieren, um die Exposition gegenüber diesen Substanzen so niedrig wie möglich zu halten.

3.2. Chemische Kanzerogenese

3.2.1. Mehrstufenmodell der Kanzerogenese

Die Tumorentstehung (Kanzerogenese) stellt einen mehrstufigen Prozess dar, der in die Phasen Initiation, Promotion und Progression unterteilt wird [Marquardt und Pfau, 2004; Schulte-Hermann et al., 2004].

Neben erblichen Faktoren werden hauptsächlich äußere Einflüsse, so genannte Krebsrisikofaktoren für die Tumorinitiation verantwortlich gemacht, die letztlich einen genetischen Schaden (Mutation) in der betroffenen Zelle bewirken. Zu den Krebsrisikofaktoren zählen neben Strahlung und Viren insbesondere die Exposition mit kanzerogenen Fremdstoffen.

Wird ein in Folge genotoxischer Wirkungen entstandener DNA-Schaden nicht repariert sondern manifestiert, so entsteht eine Mutation [Lutz, 1990; Ashby, 1995]. Eine Mutation ist das Initiationsereignis hin zur Malignisierung einer Zelle, wobei mehrere Initiationsereignisse zusammenwirken können. Als Folge einer Aktivierung von Protoonkogenen oder der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen erhält die Zelle dadurch einen Wachstumsvorteil.

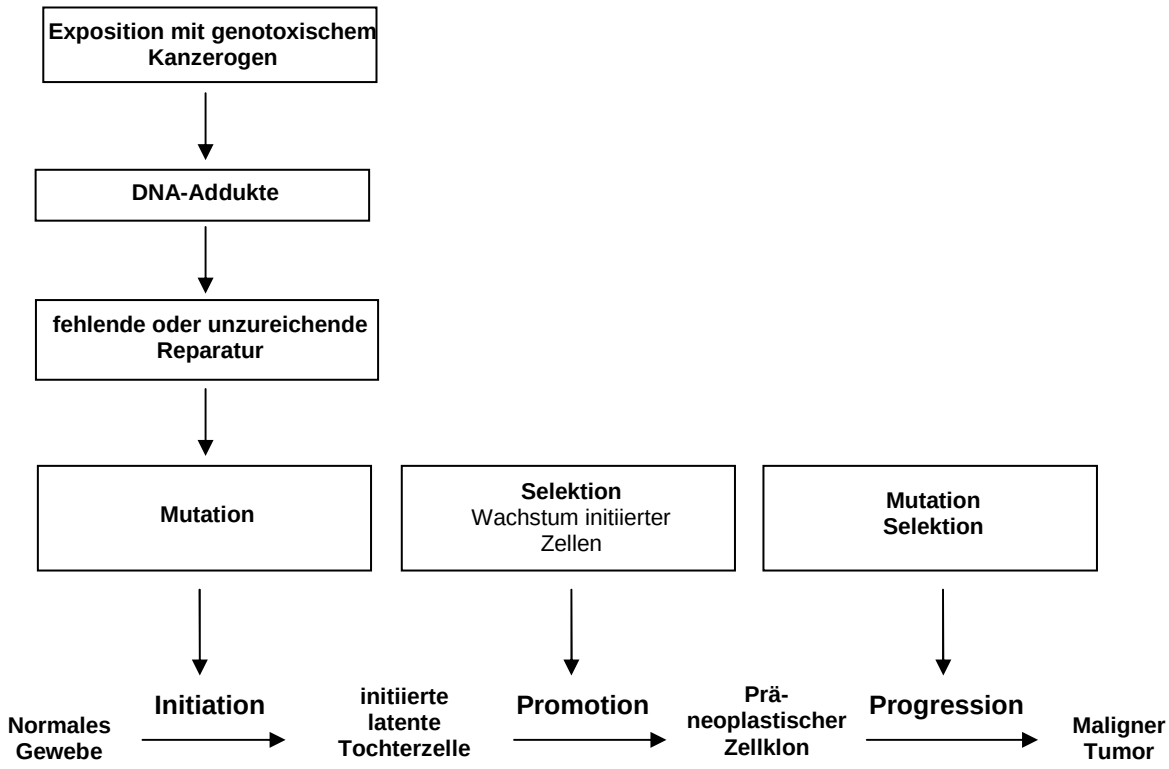


Abb. 2: Mehrstufenmodell der Kanzerogenese [modifiziert nach Marquardt und Pfau, 2004; Schulte-Hermann et al., 2004]

Im ersten Schritt, der **Initiation**, erfolgt eine irreversible Konversion einer Normalzelle in einen „prämalignen“ Zustand. Prinzipiell ist die Initiation ein seltenes Ereignis und betrifft nur einzelne, im Gewebe verstreut liegende Zellen; ihre phänotypischen Auswirkungen sind zunächst gering. Die Initiation kann bereits nach einmaliger Applikation eines genotoxischen Agens erfolgen, dies allerdings nur in proliferationsfähigen Zellen.

Erst durch den Einfluss bestimmter wachstumsstimulierender Faktoren tritt die Kanzerogenese in die **Promotion**sphase ein, in der sich die initiierte Zelle zu teilen beginnt (selektive, klonale Expansion). Zur Promotion ist stets ein längerer Zeitraum erforderlich, der bis zu mehreren Jahren andauern kann. Ein bedeutendes Merkmal der Promotion ist die selektive Expansion initiierter Zellen, welche zur Vergrößerung der präneoplastischen Zellpopulation, zur Bildung gutartiger Tumore und zum erhöhten Risiko für die Progression maligner Tumore führt.

Der finale Schritt der mehrstufigen Kanzerogenese ist die **Progression**. Hierbei werden die während der beiden vorangegangenen Stufen gebildeten Präneoplasien und gutartige Tumore in maligne Tumore umgewandelt. Wesentliche Ursache der Progression ist die genetische Instabilität der Tumorzelle („Mutator-Phänotyp“), die vor allem auf dem Verlust oder der Beschädigung von an der DNA-Reparatur beteiligten Genen beruht. Phänotypische Eigenschaften, die während der Promotion erworben werden, sind das uneingeschränkte Vermehrungspotential maligner Zellen, eine Umprogrammierung des Stoffwechsels zugunsten wachstumsfördernder Faktoren und Metastasierung [Schulte-Hermann et al., 2004].

3.2.2. Biochemische Grundlagen der DNA

In Säugerzellen liegt die DNA als Doppelstrang von zwei Ketten aus Desoxyribosemolekülen vor, die über ihre 3’- und 5’-Hydroxylgruppen mit Phosphorsäure verestert sind (**Abb. 3**). Jede Desoxyribose trägt über eine glykosidische Bindung eine der beiden Purinbasen Guanin oder Adenin bzw. eine der Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin. Im Doppelstrang ist jede Base des einen Strangs über Wasserstoffbrücken mit einer Base des komplementären Strangs verknüpft. Ein Nukleotidpaar besteht aus einem Purin und einem Pyrimidin (GC und AT), wobei AT-Basenpaare mit zwei und GC-Basenpaare mit drei Wasserstoffbrücken gekoppelt sind.

Bei der Replikation der DNA, welche in der S-Phase des Zellzyklus erfolgt, wird der Doppelstrang in die beiden Einzelstränge getrennt. Jeder einzelne dient daraufhin als Matrize für die Synthese eines neuen komplementären Strangs.

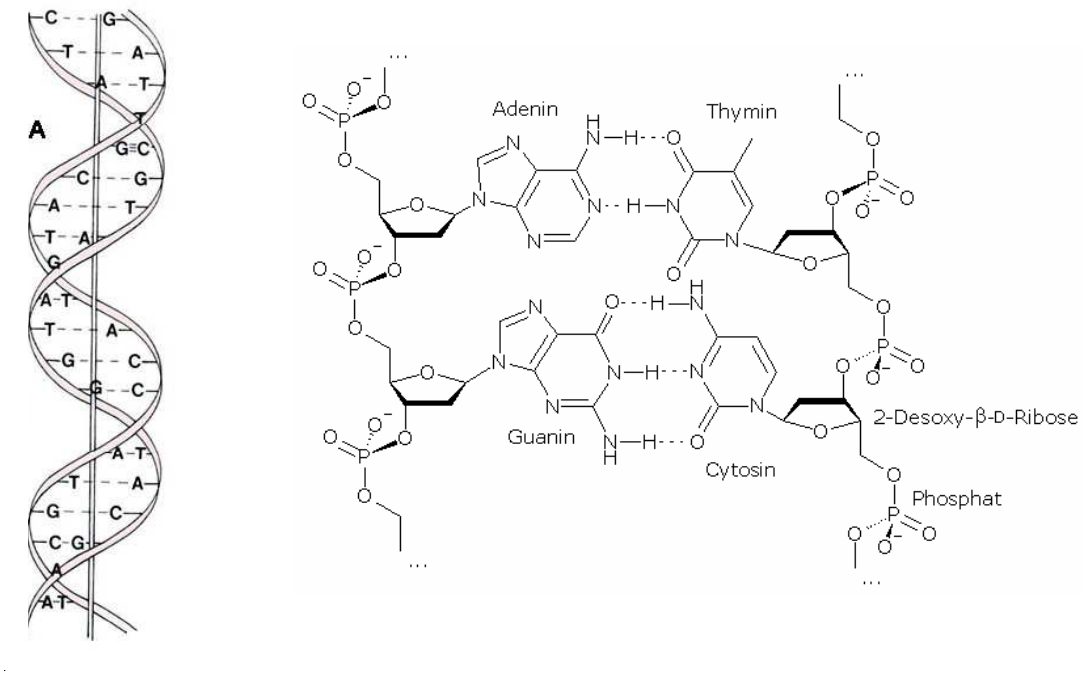


Abb. 3: Helikale und chemische Struktur der DNA

3.2.3. DNA-Alkylierung und -Reparatur

Genotoxische Verbindungen können entweder direkt oder nach metabolischer Aktivierung als elektrophile Spezies mit der DNA interagieren. Diese Alkylierung kann sowohl mono- als auch bifunktionell (inter- oder intrastrand crosslink) sein. Monofunktionell alkylierende Agentien bilden an verschiedenen Positionen der DNA-Basen und / oder an der Phosphatgruppe des DNA-Rückgrates N- bzw. O-alkylierte DNA-Addukte. In **Abb. 4** sind die Angriffspunkte monofunktionell alkylierender Agentien an der DNA dargestellt. Hierbei sind anhand von Nummerierungen und Pfeilen die bevorzugten Positionen der DNA-Alkylierung angegeben.

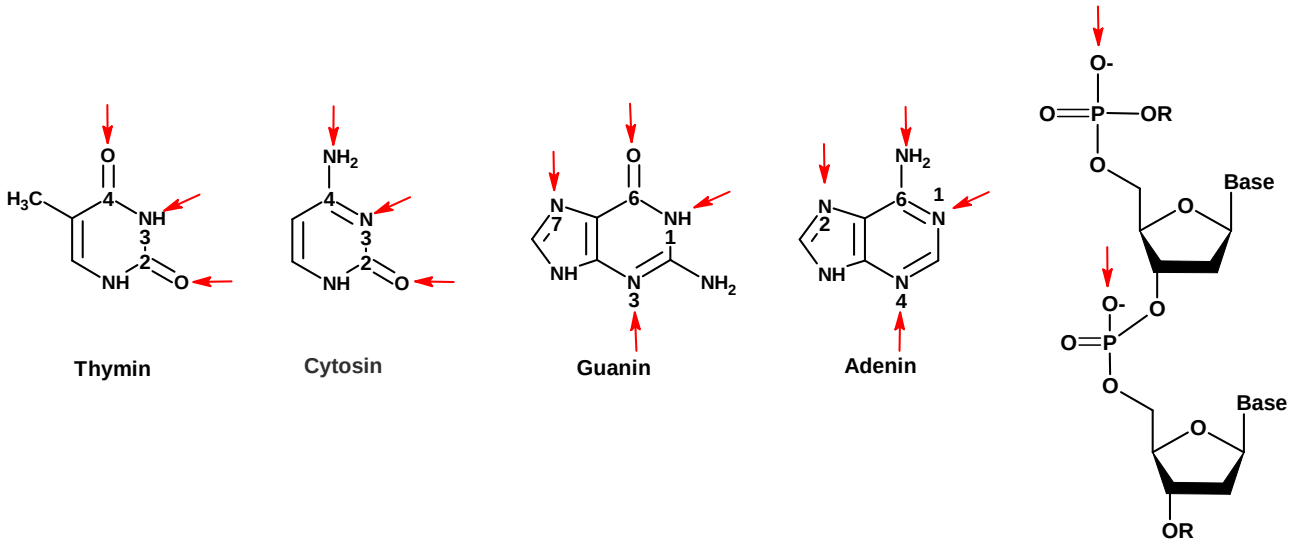


Abb. 4: Nukleophile Zentren der DNA

Ein bedeutender Unterschied der durch Alkylierung induzierten DNA-Addukte ist ihre Stabilität. Während stabile Addukte, wie z.B. O^6-alkyl-Guanin nur bei der DNA-Reparatur entfernt werden können, führt u. a. die Bindung von Alkylantien an die N^7- oder N^3-Position der Purinbasen durch Destabilisierung der glykosidischen Bindung zu instabilen DNA-Addukten. Durch spontane Abspaltung der veränderten Base (Depurinierung) wird der DNA-Strang an dieser Stelle geschwächt und es kann zum DNA-Strangbruch kommen.

Im Folgenden werden die Eigenschaften von für diese Arbeit wesentlichen DNA-Addukten sowie die jeweils relevanten Reparaturmechanismen dargestellt.

3.2.4. N-Alkylierung

3.2.4.1. N^7-Guanin-Addukte

Die N^7-Position am Guanin ist die nukleophilste Stelle der heterozyklischen DNA-Basen und bietet somit für Elektrophile geeignete Vorraussetzungen zur kovalenten Bindung [Gates et al., 2004 (rev.)]. Für das mutagene und cytotoxische Potenzial des N^7-Guanin-Addukts sind insbesondere die daraus resultierenden Folgeprodukte apurinische / apyrimidinische Stellen (AP Stellen) und Formamido-pyrimidine (FaPy) relevant [Loeb et al., 1986; Tudek et al., 2003].

3.2.4.1.1. Apurinische / apyrimidinische Stellen (AP Stellen)

Durch Alkylierung der N^7-Position erhält der Guanin-Ring eine formal positive Ladung. Diese wandelt die Base in eine gute Abgangsgruppe im Rahmen einer Hydrolyse des S_N1-Typs um und führt somit zur Schwächung der glykosidischen Bindung (**Abb. 5**).

Ausgehend von dieser Depurinierung entstehen apurinische / apyrimidinische Stellen (AP Stellen), die toxisch und mutagen sind [Loeb et al., 1986].
In vergleichbarer Weise verhalten sich auch DNA-Addukte an N^3-G, N^7-A oder N^3-A [Gates et al., 2004 (rev.)].

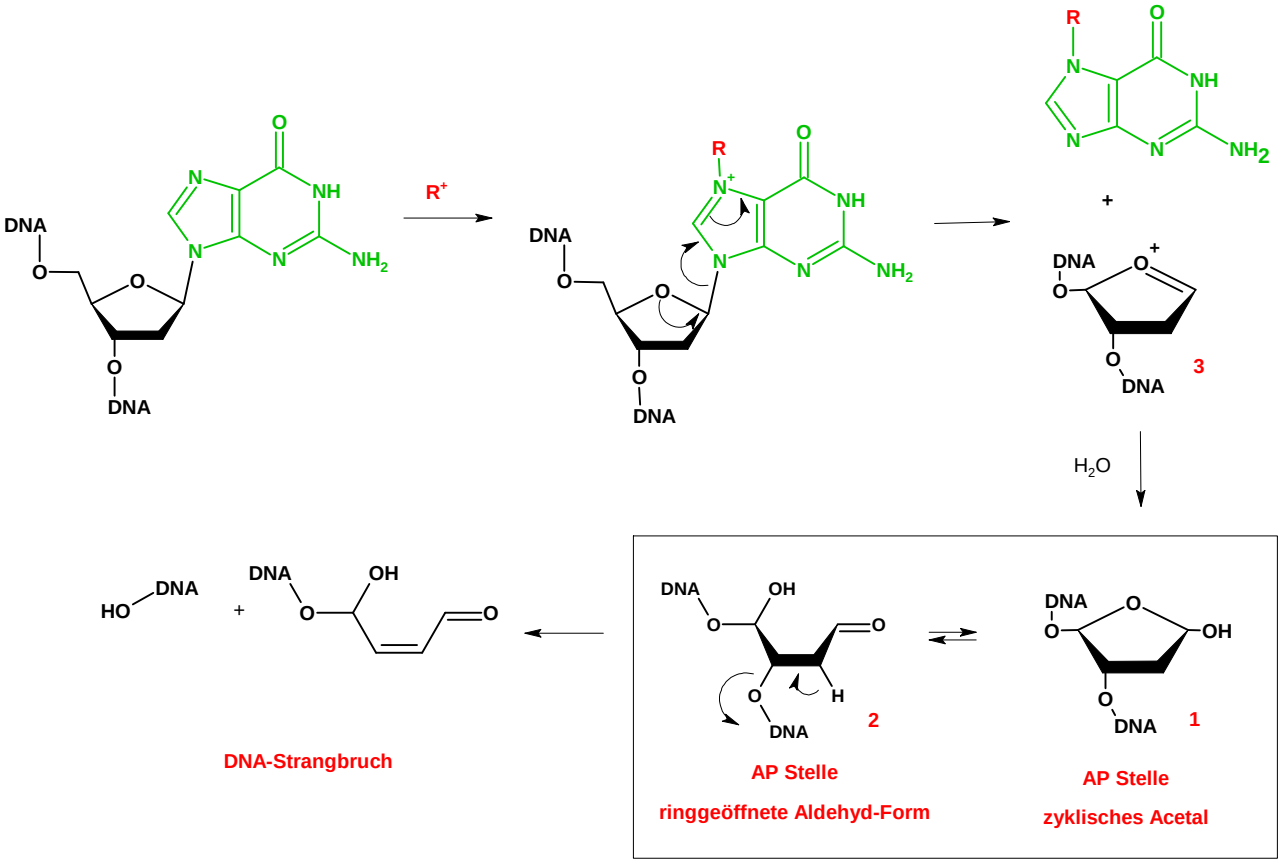


Abb. 5: Bildung von AP Stellen aus N^7-G-Addukten

AP Stellen kommen hauptsächlich als zyklisches Acetal **1** vor, welches im Gleichgewicht mit der ring-geöffneten Aldehyd-Form **2** steht. Der Verlust des aziden α-Protons in Nachbarschaft zur Carbonyl-Gruppe in **2** kann zu einem DNA-Strangbruch via Eliminierung der 3'-Phosphat-Gruppe führen [Lindahl et al., 1972].
Unter physiologischen Bedingungen ist die Depurinierung von N^7-G-Addukten die dominante Reaktion. Allerdings ist die Geschwindigkeit der Depurinierung von N^7-Alkylguanin je nach Art der Alkylierung stark unterschiedlich (zwischen 3 und 150 h bei 37°C, pH 7) [Gates et al., 2004 (rev.)]:

i) Elektronenziehende Gruppen erleichtern die Depurinierung, indem sie die Eigenschaft der alkylierten Base als Abgangsgruppe verbessern

ii) Elektronenziehende Substituenten am Zucker (wie OMe, 2'-OH) destabilisieren den Oxocarbeniumion-ähnlichen Übergangszustand **3**, welcher zur Depurinierung führt und verlangsamen somit diesen Reaktionsweg

iii) Depurinierung ist langsamer in Doppelstrang- als in Einzelstrang-DNA

3.2.4.1.2. Imidazol-Ringöffnung zu Formamido-pyrimidinen (FaPy)

Ein weiteres Folgeprodukt alkylierter N^7-G-Addukte sind Formamido-pyrimidine (FaPy). Deren Bildung wird durch basische Bedingungen begünstigt. N^7-Alkylguanine unterliegen häufig einem Angriff von Hydroxiden am C^8 des Guanins. Hierbei kommt es zur Bildung von FaPy, in welchem der Imidazolring des alkylierten Guanins geöffnet ist [Chetsanga et al., 1982].

Der mögliche zugrunde liegende Mechanismus ist **Abb. 6** schematisch dargestellt.

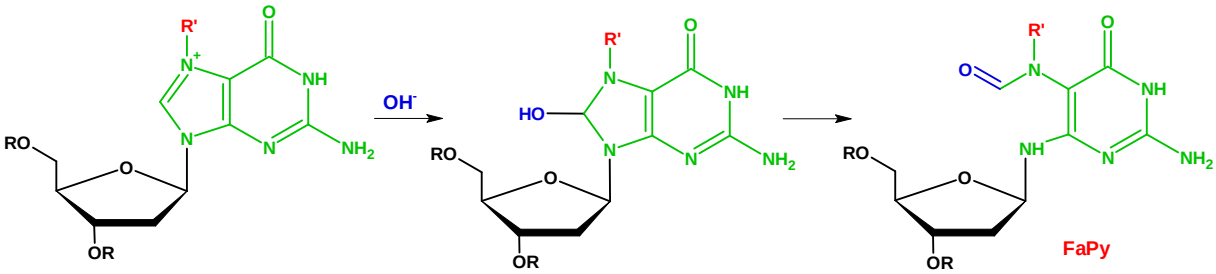


Abb. 6: Bildung von FaPy aus N^7-G-Addukten

Unter physiologischen Bedingungen ist die glykosidische Bindung im FaPy chemisch stabil [Chetsanga et al., 1982]. Dies bedeutet, dass FaPy nicht wie N^7-Alkyl-G hydrolytisch aus der DNA entfernt wird. Tatsächlich konnte *in-vivo* nachgewiesen werden, dass die Läsionen über längere Zeit persistent in der DNA vorliegen können [Kadlubar et al., 1984]. Die Persistenz ist auch von biologischer Bedeutung, da FaPy als cytotoxisch und mutagen angesehen wird [Tsuda et al., 2003].

Die Ringöffnung wird ähnliche wie die Depurinierung durch die Anwesenheit elektronenziehender Gruppen am N^7 begünstigt, allerdings sind die Substituenteneffekte bei der Ringöffnung bedeutend größer als bei der Depurinierung. Im Gegensatz zur Depurinierung begünstigen elektronenziehende Gruppen am Zucker die Umwandlung von N^7-Alkylguanin in FaPy [Gates et al., 2004 (rev.)].

3.2.4.2. Base Excision Repair (BER)

Schäden an DNA-Basen als Folge von Deaminierung, Oxidation und Alkylierung werden hauptsächlich durch Enzyme der Base Excision Repair (BER) entfernt. BER wird durch DNA-Glykosylasen initiiert, die beschädigte Basen erkennen, diese durch Hydrolyse der glykosidischen Bindung zwischen der Base und dem Zucker-Phosphat-Rückgrat aus der DNA herausschneiden und so eine AP Stelle als Produkt hinterlassen (**Abb. 9**) [Christmann et al., 2003 (rev.); Schärer, 2003]. Man unterscheidet hierbei Typ I-Glykosylasen, die die veränderte Base unter Einführung einer AP Stelle abspalten, sowie bifunktionelle Typ II-Glykosylasen [Christmann et al., 2003 (rev.)]. Diese schneiden nach Entfernen der modifizierten DNA-Base durch ihre zusätzliche 3'-Endonuklease-Aktivität die AP Stelle unter Einführung eines DNA-Strangbruchs aus der DNA. Beispiele für Typ II-Glykosylasen sind das *E. coli* Reparaturenzym Formamido-pyrimidin-DNA-glykosylase (FPG) sowie sein humanes funktionelles Homologon OGG1 [He et al., 2002]. Die Einführung eines DNA-Strangbruchs nach Reaktion einer Typ I-Glykosylase übernehmen spezifische AP Endonukleasen (z.B. APE1) [Wilson et al., 2001].

Es existieren zwei Arten von Mechanismen bei DNA-Glykosylasen. Typ I-Glykosylasen benötigen ein Wassermolekül als Nukleophil, um die N-glykosidische Bindung zu spalten und eine AP Stelle zu bilden (vgl. **Abb. 7**). Ein Wassermolekül in der aktiven Stelle wird durch eine konservierte Carboxylseitenkette des Enzyms deprotoniert und so positioniert, dass es die beschädigte Base am anomeren Zentrum ersetzen kann [Schärer, 2003].

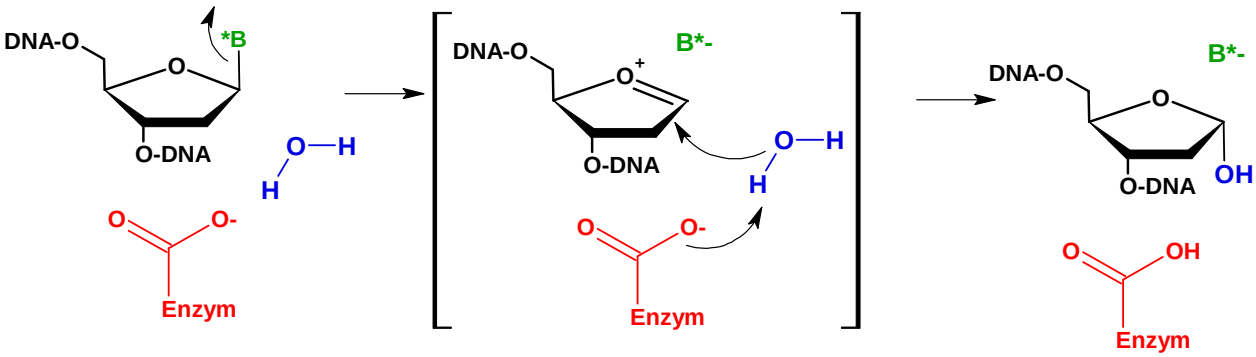


Abb. 7: Reaktionsmechanismus von Typ I-Glykosylasen [modifiziert nach Schärer, 2003]

Typ II-Glykosylasen (vgl. **Abb. 8**) nutzen eine Aminogruppe des Enzyms als Nukleophil zur intermediären Erzeugung einer Schiff´schen Base, die in einer basenkatalysierten β-Eliminierung unter Spaltung der C3-O-Bindung zwischen der AP Stelle und dem Zuckerphosphat reagiert [Dodson et al., 1994].

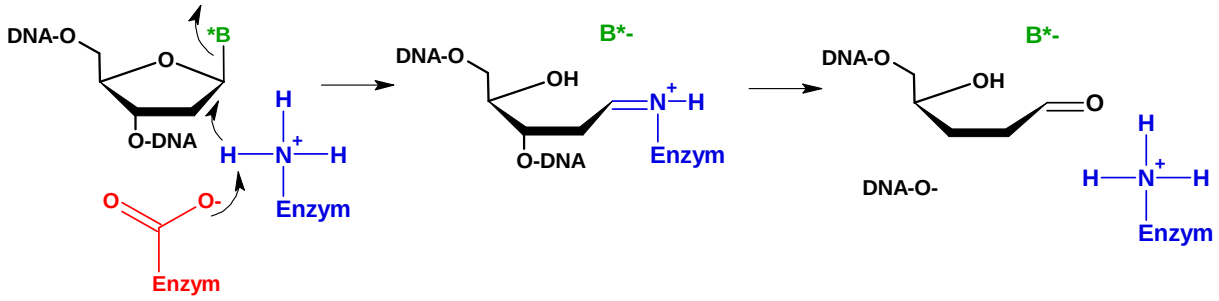


Abb. 8: Reaktionsmechanismus von Typ II-Glykosylasen [modifiziert nach Schärer, 2003]

DNA-Glykosylasen besitzen gemeinsame Merkmale. So greifen sie auf einen Nukleotid-Flipping-Mechanismus zurück, durch den das Zielnukleotid aus der DNA-Doppelhelix in die aktive Stelle des Enzyms, an der die Katalyse stattfindet, herausgeschwungen wird.
Die anschließende Insertion der Nukleotide wird in „Short-Patch“ (SP) und „Long Patch“-Reparatur (LP) unterschieden (**Abb. 9**), wobei der SP-Weg den häufigsten und einfachsten Reparaturweg darstellt. Beide Wege unterscheiden sich nur in der Anzahl der ausgetauschten Nukleotide und der verwendeten Enzyme [Schärer et al., 2003].
Im Verlauf des SP-Reparaturweges fügt die Polymerase β (Pol β) ein Nukleotid abfolgend zur abasischen Stelle ein. Anschließend schließt die DNA-Ligase III die Lücke und beendet damit die Reparatur.
Innerhalb des LP-Reparaturweges fügen die Polymerase δ/ε und assoziierte Replikationsfaktoren zwei bis sechs Nukleotide nachfolgend zur abasischen Stelle ein. Die daraus resultierenden überhängenden Oligonukleotide werden durch die Flap-Endonuklease (FEN-1) abgetrennt und die verbleibende Lücke durch die DNA-Ligase I geschlossen [Christmann et al., 2003 (rev.)].

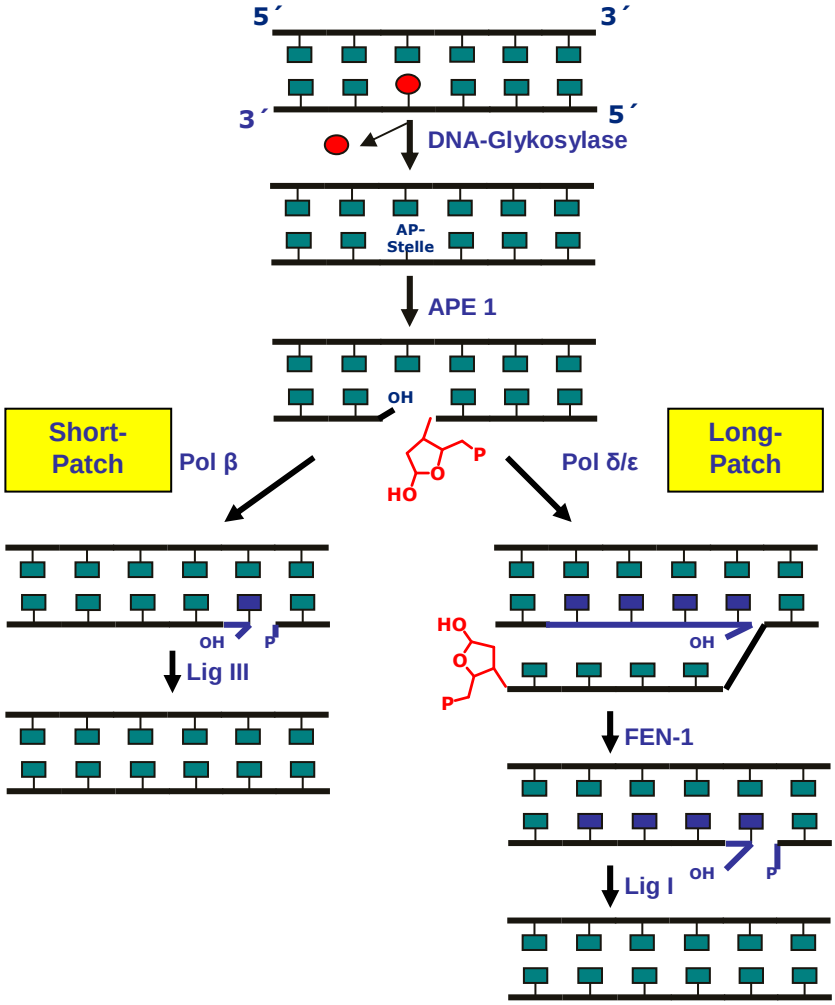


Abb. 9: Mechanismus der Base Excision Repair (BER) [nach Christmann et al., 2003 (rev.)] (APE1: AP Endonuklease 1; FEN-1: Flap-Endonuklease; Pol β/δ/ε: Polymerase β/δ/ε; Lig I/III: Ligase I/III)

3.2.5. O-Alkylierung

3.2.5.1. O^6-Guanin-Addukte

Neben der N-Alkylierung besteht für S_N1- bzw. S_N2-alkylierende Verbindungen auch die Möglichkeit zur Alkylierung an den Sauerstoff-Atomen von Purinen oder Pyrimidinen. Eine der kritischsten O-alkylierten DNA-Läsionen ist hierbei jene am O^6-Guanin. Obwohl die Bindung von Alkylantien an O^6-G im Vergleich zu parallel alkylierten Positionen nur einen sehr geringen Anteil am Gesamt-DNA-Addukt-Spektrum von meist unter 10% ausmacht, wird ihnen aufgrund ihrer teils mehrere Tage anhaltenden Persistenz in der DNA [Beranek, 1990] sowie der bevorzugten, schnellen Basenpaarung mit Thymin während der DNA-Replikation [Loveless, 1969] eine bedeutende Rolle in der Mutagenität und Cytotoxizität von DNA-alkylierenden Verbindungen zugesprochen. Werden O^6-G-T Fehl-

paarungen nicht repariert, kann es zur Induktion von GC→AT Transitions-Mutationen kommen [Margison et al., 2002].

3.2.5.2. Reparatur durch O^6-Methyl-Guanin-Methyl-Transferase (MGMT)

In *E.coli* ist die Resistenz gegen O^6-alkylierende Agentien mit der Induktion des Genprodukts Ada verbunden [Sedgwick et al., 2002 (rev.)]. In Säugerzellen wird die Reparatur dieser DNA-Läsionen durch das Ada-Analogon, der O^6-Methyl-Guanin-Methyl-Transferase (MGMT) bestimmt. Das humane MGMT-Gen ist in der Chromosomenbande 10q26 lokalisiert und besteht aus einem nicht-codierenden und vier codierenden Exons, welche ein Protein aus 207 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 24 kDa codieren [Tano et al., 1990]. Das Reparaturprotein transferiert suizidal Alkyl-Gruppen von modifizierten Guanin-Basen in einer Ein-Schritt-Reaktion auf einen internen Cystein-Rest in seinem aktiven Zentrum [Christmann et al., 2003 (rev.)]. Dieser Prozess inaktiviert das Protein, welches anschließend durch Ubiquitinierung zerfällt [Srivenugopal et al., 1996]. Strukturstudien zufolge befindet sich das aktive Zentrum von MGMT im Inneren des Proteins und somit in einem gewissen Abstand zur DNA-Bindungsoberfläche [Daniels et al., 2000: Wibley et al., 2000]. Es wird angenommen, dass das Protein durch „Nukleotid-Flipping“ die entsprechende Base und das Nukleophil im aktiven Zentrum von MGMT zusammenbringt.

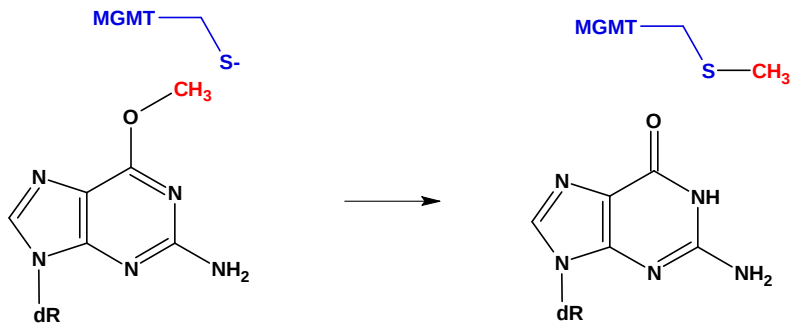


Abb. 10: Reparaturmechanismus der O^6-Methyl-Guanin-Methyl-Transferase (MGMT) [modifiziert nach Schärer, 2003]

MGMT entfernt neben Methyl-, auch Ethyl-Gruppen an der O^6-Position des Guanins, letztere allerdings mit geringerer Reaktionsgeschwindigkeit [Yarosh, 1985]. Die Entfernung von substituierten Ethyl-Gruppen, wie Hydroxyethyl-Reste durch MGMT konnte *in-vitro* nachgewiesen werden [Pegg et al., 1984]. Weiterhin ist beschrieben, dass O^6-Carboxymethyl-Guanin-Addukte im Gegensatz zu methylierten O^6-Guanin-Addukten nicht von bakterieller oder Säuger-O^6-MGMT repariert werden [Shuker et al., 1997].

Die Expression von MGMT schützt *in-vitro* vor Alkylierungs-induzierten Genmutationen, Chromosomen-Abberationen und Schwesterchromatid-Austausch-Ereignissen (SCE) [Kaina et al., 1991].
MGMT-defiziente Zellen *in-vitro*, wie z.B. fibroblastoide V79 Zellen [Yarosh et al., 1985] sind nicht in der Lage O^6-G-Addukte zu reparieren und sind somit sensitiv gegenüber alkylierenden Agentien. Diese gesteigerte Sensitivität konnte auch *in-vivo* an MGMT-knock-out Mäusen gezeigt werden [Tsuzuki et al., 1996]. Im Gegensatz dazu, führt eine Überexpression an MGMT in Mäusen zu einer Reduktion der Tumorenrate und inhibiert die Tumorpromotion [Becker et al., 2003].

3.2.6. „Bulky adducts“

Sterisch anspruchsvolle Alkylantien, die mit den Basen der DNA interagieren, führen zur Bildung so genannter „bulky adducts“. Eine Alkylierung kann hierbei sowohl an den N- als auch O-Positionen der DNA-Basen erfolgen. Beispiele für „bulky adducts“-induzierende Alkylantien sowie die hauptsächlich gebildeten DNA-Addukte sind in **Tab. 1** aufgeführt.
Folge dieser Addukt-Bildung ist eine massive Distorsion der DNA-Struktur, was wiederum zur Störung normaler zellulärer Funktionen, wie Transkription und Replikation führt [Friedberg et al., 1995]. Die Reparatur dieser Addukte erfolgt mittels Nucleotid Excision Repair (NER) (vgl. **3.2.6.1**) [Friedberg et al., 2001 (rev.)]. Da diese Reparatur allerdings im Vergleich zu anderen Reparaturmechanismen (z.B. BER; 3.2.4.2) relativ langsam ist [Braithwaite et al., 1998], erhöht sich das Risiko der Persistenz dieser DNA-Addukte und folglich deren Mutagenität [Suzuki et al., 2002].

Alkylantien	**DNA-Addukt**
7, 12-Dimethyl-(benzo[a]anthracen) (DMBA)	N^2-G; C^8-G
1-Naphtylamin (1-NA)	O^6-G
Alflatoxin B_1 (AFB_1)	N^7-G
Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE)	N^2-G

Tab. 1: Beispiele für „bulky adducts“-induzierende Alkylantien

3.2.6.1. Nucleotid Excision Repair (NER)

An der Nucleotid Excision Repair (Nukleotidausschneidereparatur; NER) sind ca. 30 Proteine beteiligt. Sie wird untergliedert in die beiden Wege globale Genom-Reparatur (GGR) und Transkriptions-gekoppelte Reparatur (TCR). GGR ist größtenteils Transkriptions-unabhängig und entfernt Läsionen von der nicht-transkribierten Domäne des Ge-

noms und dem nicht-transkribierten Strang der transkribierten Region [Christmann et al., 2003 (rev.)]. TCR entfernt verschiedene RNA-Polymerase-blockierende DNA-Schäden vom transkribierten Strang des aktiven Gens. Mit Ausnahme von XPC-hHR23B werden alle Gene, die an der NER beteiligt sind, auch für die TCR benötigt. Darüber hinaus greift die TCR auf zusätzliche Gene zurück, z.B. auf CSA und CSB, die in der GGR nicht erforderlich sind. Während die Doppelinzisions- und Reparaturschritte der TCR vermutlich denen der GGR gleichen, erfolgt die initiale Schadenserkennung bei TCR durch eine blockierte RNA-Polymerase [Schärer, 2003].

Im Gegensatz zur TCR ist die GGR detailliert untersucht. Sie verläuft wie in **Abb. 11** dargestellt.

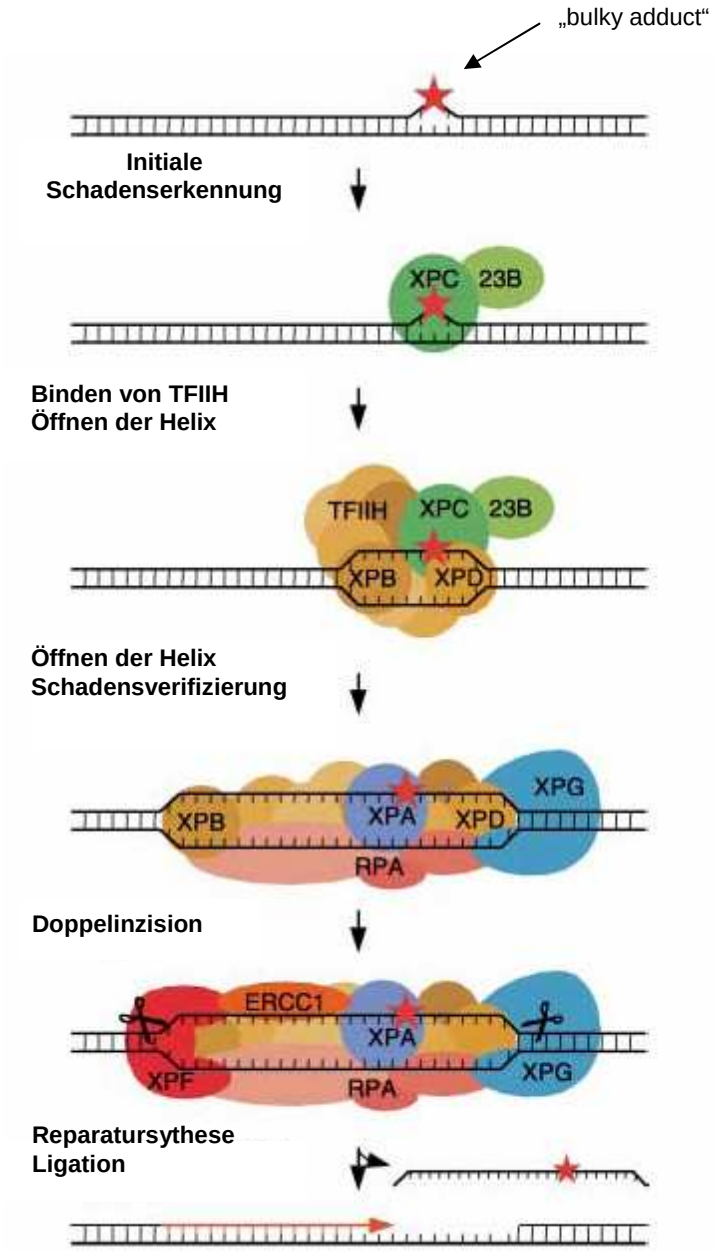


Abb. 11: Mechanismus der GGR der Nucleotid Excision Repair (NER) [Schärer, 2003]

Zunächst identifizieren die Komplexe XPC-HR23B und RPA-XPA den DNA-Schaden. Nach Erkennung des Schadens bindet der Transkriptionsfaktor TFIIH, der aus sieben verschiedenen Proteinen (u. a. XPB, XPD) besteht, an die Position der DNA-Läsion. TFIIH besitzt eine DNA-Helikase-Aktivität und ist für die Entwindung der DNA (Öffnen der Helix) im Umfeld des DNA-Schadens verantwortlich. Nach Bildung dieses offenen Komplexes erfolgt das Herausschneiden des DNA-Schadens über eine Doppelinzision an festgesetzten Positionen in Nachbarschaft zur DNA-Läsion. Die Reparatursynthese verläuft anschließend unter Beteiligung von Pol δ und Pol ε. Eine DNA-Ligase I versiegelt den reparierten DNA-Strang und schließt die Reparatur ab [Christmann et al., 2003 (rev.)].

3.3. Mutationen

Mutationen sind genetische Veränderungen der DNA-Sequenz. Zu unterscheiden sind drei Arten von Mutationen:

I) Genom-Mutationen (numerische Änderung des Chromosomensatzes)
II) Chromosomen-Mutationen (Veränderungen von Form und Struktur von Chromosomen)
III) Gen- oder Punktmutationen (Intragenetische Mutationen)

Genmutationen sind stoffliche Änderungen eines Gens, die auf die Tochterzelle übertragen werden. Punktmutationen liegen dann vor, wenn die Änderung nur ein einziges Basenpaar betrifft [Eisenbrand & Metzler, 2005].

3.3.1. Genmutationen

3.3.1.1. Basenpaar-Substitutions-Mutation

Im Verlauf dieser am häufigsten auftretenden Genmutation wird die genetische Information dadurch geändert, dass ein ursprüngliches Nukleotid eines Triplett-Codons durch ein anderes ersetzt wird. Es kann sich hierbei entweder um eine „Missense“-Mutation (sinnverändernde Mutation), also dem Austausch einer Aminosäure bei der Translation handeln, oder um eine „Nonsense“-Mutation (sinnentstellende Mutation), bei der ein Stop-Codon entsteht. Außerdem können „Nonsense“-Mutationen in den Introns (nicht-codierende Abschnitte der DNA) Fehler beim Splicing bewirken. Als Splicing wird ein wichtiger Schritt der Weiterverarbeitung der RNA bezeichnet, der im Zellkern von Eukaryoten stattfindet und bei dem aus der prä-RNA die reife mRNA entsteht. Der Schritt ist Teil der Proteinbiosynthese. Als dritte Möglichkeit kann es sich auch um eine stille

(stumme) Mutationen oder neutrale Mutationen handeln, bei der eine DNA-Base verändert wurde, aber weiterhin die gleiche Aminosäure kodiert wird.
Als Translation bezeichnet man den Ersatz eines Purin- bzw. Pyrimidin-Nukleotids durch ein anderes. Unter Transversion versteht man den Austausch durch den jeweils anderen DNA-Basen-Typ.

3.3.1.2. Basenpaar-Deletions-Mutation

Unter Deletion versteht man bei der Genmutation den Verlust eines oder mehrerer Basenpaare. Sie führt zur Verschiebung des Leserasters (frameshifts).
Man unterscheidet zwei Typen des Deletion:

I) *„out of frame“*-Deletion: Es entsteht kein funktionsfähiges Protein
II) *in frame“*-Deletion: Hierbei entsteht ein Protein mit Restfunktion, da das Leseraster erhalten bleibt.

3.3.1.3. Basenpaar-Insertions-Mutation

Hierunter versteht man bei der Genmutation den Einbau von Sequenzen in die DNA. Auch dies führt zu einer Leserasterverschiebung (frameshifts), soweit nicht Triplett-Codons eingebaut werden. Dieser Mutationstyp ist äußerst selten.

3.4. α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen

3.4.1. Acrylamid

3.4.1.1. Verwendung und Vorkommen von Acrylamid

Acrylamid (2-Propenamid; AA) ist ein farb- und geruchloser, kristalliner Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 84,5°C. Es ist löslich in Wasser, Aceton und Ethanol und wird mittels Hydration aus Acrylonitril gebildet.

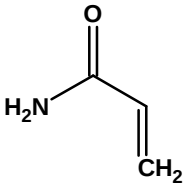


Abb. 12: Strukturformel von Acrylamid (2-Propenamid)

AA findet Anwendung als Zementbinder sowie in der Herstellung von Polymeren und Gelen. Polyacrylamid-Polymere und Copolymere werden zur Papierherstellung, in der Textilindustrie sowie als Flockungsmittel in der Trink- und Abwasseraufbereitung verwendet.
In der Biochemie wird AA zur selektiven Modifizierung von SH-Gruppen in strukturellen und funktionellen Proteinen verwendet. Polyacrylamid-Gele dienen der elektrophoretischen Trennung von Proteinen und anderen Komponenten [Friedman, 2003].
Des Weiteren ist AA Bestandteil von Zigarettenrauch.

3.4.1.2. Acrylamid in Lebensmitteln

Die Entdeckung von AA als Bestandteil von erhitzten, stärkehaltigen Lebensmitteln erfolgte 2002 eher zufällig. Ursache war die Fehlanwendung eines Dichtungsmittels, in dem AA offensichtlich unvollständig polymerisiert vorlag, im Tunnelbau im schwedischen Hallandsås (1997). In der Folge kam es durch eine starke Belastung des Grundwassers mit monomerem AA zu Fischsterben sowie neurologischen Störungen bei Rindern, die die Substanz über das Trinkwasser aufgenommen hatten. Eingehende Untersuchungen der betroffenen Tunnelarbeiter auf Hämoglobin-Addukte mit AA ergaben, dass nicht nur die exponierten Arbeiter eine deutliche Belastung aufwiesen, sondern auch in der aus Nichtrauchern bestehenden, nicht beruflich exponierten Kontrollgruppe eine erhöhte AA-Hintergrundbelastung festzustellen war [Bergmark et al., 1997; Tornqvist et al., 1998].
Eine Tierversuchsstudie an Ratten mit gebratenen Lebensmitteln sowie die Detektion von deutlich geringeren AA-Hämoglobin-Addukten in Wildtieren führte schließlich zur Überlegung, dass AA möglicherweise beim Erhitzen von Lebensmitteln entstehen könnte [Tareke et al., 2000].
In Untersuchungen zum Bildungsmechanismus von Acrylamid in Lebensmitteln konnte folgende Reaktion ermittelt werden: Acrylamid entsteht in stärkehaltigen Lebensmitteln aus Asparagin bei Temperaturen über 120°C bei der nicht-enzymatischen Bräunung (Maillard Reaktion) [Mottram et al., 2002; Becalski et al., 2003].

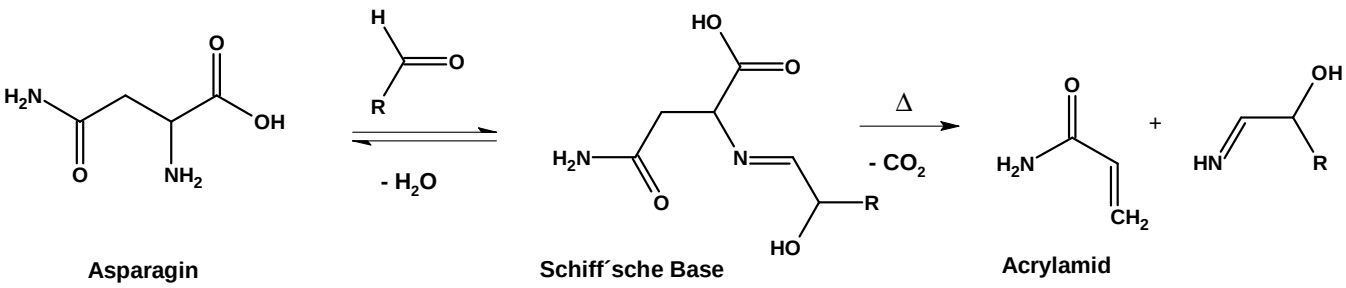


Abb. 13: Bildungsmechanismus von Acrylamid [Zyzak et al., 2003]

Hierbei interagiert die Aldehyd-Gruppe eines reduzierenden Zuckers (z. B. Glucose) über eine N-glykosidische Bindung mit der Aminosäure Asparagin. Die hieraus entstehende Schiff´sche Base wird beim Erhitzen in Acrylamid überführt [Stadler et al., 2002]. Durch massenspektroskopische Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die drei C-Atome sowie das N-Atom von Acrylamid aus der Aminosäure Asparagin stammen [Zyzak, 2003, Yaylayan et al., 2003].

Zyzak et al. [2003] identifizierten 3-Amino-Propionamid (3-APA) als Zwischenprodukt der der Bildung von AA aus Asparagin. Modellversuche mit 3-Aminopropionamid zeigten die thermische Bildung von Acrylamid in hoher Ausbeute durch Eliminierung von Ammoniak (**Abb. 14**). Mit einer Methode zur quantitativen Bestimmung von 3-Aminopropionamid wurde erstmalig diese Verbindung in Lebensmitteln nachgewiesen und deren Gehalt bestimmt. Weiter konnte gezeigt werden, dass 3-Aminopropionamid sowohl biochemisch als auch thermisch gebildet werden kann. Die biochemische Bildung erfolgt durch enzymatische Decarboxylierung von Asparagin, die thermische Bildung entweder über den "Amadori-Weg" oder über den Strecker-Abbau von Asparagin [Granvogl et al., 2004].

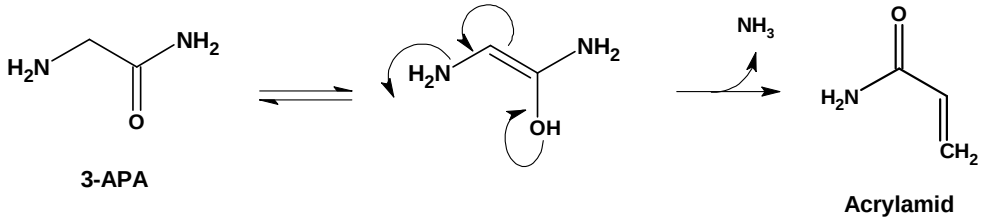


Abb. 14: möglicher Bildungsmechanismus von AA aus 3-APA

Die Acrylamid-Gehalte variieren innerhalb der verschiedenen Arten von belasteten Lebensmitteln stark [BMVEL, 2002]. In **Tab. 2** sind einige ausgewählte Gehalte dargestellt.

Warengruppe	**Anzahl untersuchter Produkte**	**Range [AA in µg/kg]**	**Median [AA in µg/kg]**
Backwaren aus Mürbeteig	143	5-1458	118
Kaffee (geröstet)	167	101-935	268
Kartoffelchips	159	5-4215	363
Knäckebrot	93	5-1715	276
Pommes frites	388	5-2310	212
Lebkuchen	449	5-6141	233

Tab. 2 : Acrylamid Gehalte in Lebensmitteln [µg/kg] [BVL, 2005]

3.4.1.2.1. Expositionsabschätzung

Für Nichtraucher und beruflich nicht-exponierte Personen erfolgt die Exposition mit AA hauptsächlich über die Nahrung.

Auf der Grundlage durchschnittlicher Aufnahmemengen an AA-haltiger Nahrung lässt sich eine tägliche Aufnahme von 0,4-0,9 µg/kg KG/Tag kalkulieren [Dybing et al., 2005]. Neben der Expositionsabschätzung auf der Basis von Lebensmittel-Belastung und -Konsum besteht des Weiteren die Möglichkeit der Biomarker-gestützten Abschätzung der Exposition. So leiteten Tareke et al. [2002] aus AA-Hämoglobin-Addukten als Biomarker eine humane Exposition von 1,7 µg/kg KG/Tag. Die dreifache Erhöhung des Expositionswertes liegt möglicherweise an der in dieser Studie vergleichsweise geringen Kohortengröße.

Die AA-Exposition durch Lebensmittel ist vermutlich bei Kindern und Jugendlichen höher als bei Erwachsenen. Hierfür verantwortlich sind neben den unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten vor allem das geringere Körpergewicht und das damit verbundene erhöhte Verhältnis an Aufnahme pro kg KG/Tag [BfR, 2003].

3.4.1.3. Toxikokinetik von Acrylamid

3.4.1.3.1. Aufnahme und Verteilung

Die Aufnahme von AA in den Organismus erfolgt entweder nach Aufnahme AA-haltiger Lebensmittel über den Gastrointestinal-Trakt oder bei beruflich exponierten Personen oral, dermal oder inhalativ.

Anhand von verschiedenen Tierversuchsstudien lässt sich eine schnelle Absorption und Verteilung von AA im Organismus vermuten. In einer von Miller et al. [1982] durchgeführten Studie an Fischer-344 Ratten wurden nach oraler Gabe von 10 mg/kg KG ^{14}C-markiertem AA innerhalb eines Tages ca. 90% der eingesetzten Dosis in verschieden Organen, Geweben und Körperflüssigkeiten gefunden. Die höchsten Gehalte an ^{14}C-AA wurden in Muskulatur (48% der Dosis), Haut (15% der Dosis) und im Vollblut (12% der Dosis) nachgewiesen. Während AA im Plasma innerhalb weniger Stunden abgebaut wird, bleibt der Gehalt im Vollblut stabil. Miller et al. begründen dies mit der möglicherweise effektiven Bindung von AA an Hämoglobin oder andere nukleophile Blutbestandteile in den Erythrozyten. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Fütterungsstudien an Sprague-Dawley Ratten [Kadry et al., 1999], Hunden und Minischweinen [Ikeda et al., 1987].

3.4.1.3.2. Metabolismus von Acrylamid

In einer Funktionalisierungsreaktion (Phase I Metabolismus) wird AA durch CYP450-haltige Monooxygenasen zu Glycidamid (2,3-Epoxypropanamid; GA) epoxidiert [Calleman et al., 1990; Sumner et al., 1992]. In einer Fütterungsstudie mit [^{13}C]-AA an CYP450 2E1-null- und Wildtyp-Mäuse wiesen Sumner et al. [1999] CYP450 2E1 als hauptsächlich verantwortliches Isoenzym nach. Das Auftreten von GA gegenüber AA erfolgt im Plasma daher zeitversetzt [Barber et al., 2001].

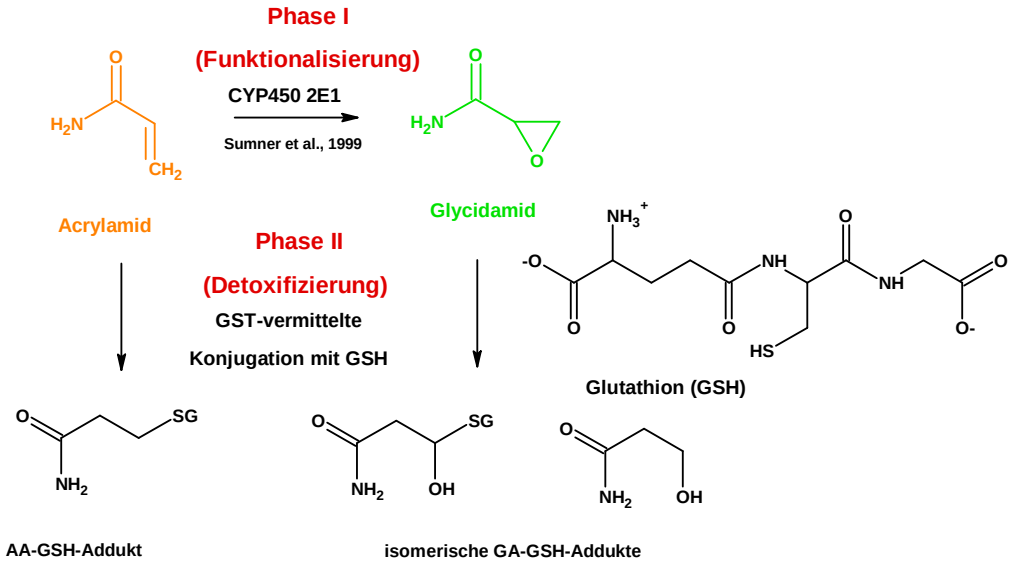


Abb. 15: Phase I- und II-Metabolismus von AA

Der hauptsächliche Weg der Entgiftung von AA und GA ist die Glutathion-S-Transferase (GST)-vermittelte Kopplung an Glutathion (γ-Glutamylcysteinglycin; GSH) [Hashimoto et al., 1988; Odland et al., 1994]. GSH ist ein verbreitetes Tripeptid und nimmt direkt oder indirekt Einfluss auf verschiedene biologische Prozesse und spielt besonders bei der Detoxifizierung von Fremdstoffen eine wichtige Rolle. Die Bildung von GSH erfolgt aus L-Glutamat katalysiert durch die Enzyme γ-Glutamylcystein-Synthetase und GSH-Synthetase [Meister et al., 1983].

Die Detoxifizierung von AA und GA mittels GSH-Konjugation verläuft überwiegend in Leber, Niere, Gehirn und den Erythrozyten [Dixit et al., 1982]. Beiswanger et al. [1993] detektierten eine Depletion von GSH durch AA auf 60% im Vergleich zur Kontrolle nach einmaliger Gabe von AA (100 mg/kg) an Ratten. Im zellfreien System bei 37°C depletiert AA (100 mM) GSH (3 mM) nahezu vollständig innerhalb weniger als 1h. Die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung konnte auf 0,021 $M^{-1}s^{-1}$ abgeleitet werden [Tong et al., 2004].

Nach der Konjugation von AA und GA mit GSH werden Mercaptursäuren gebildet, die wiederum mit dem Urin ausgeschieden werden (s. **3.4.1.3.4)**.

3.4.1.3.3. Interaktion mit Makromolekülen

AA und sein Metabolit GA sind beide in der Lage, mit verschiedenen Makromolekülen zu interagieren. **Abb. 16** zeigt die gebildeten Addukte nach Interaktion mit Amino- und Thiol-Gruppen zu Hämoglobin- und Protein-Addukten sowie die durch GA induzierten DNA-Addukte. Die Reaktivität von AA gegenüber der DNA ist im Vergleich zu GA ca. 100-1000-fach geringer [Friedman, 2003].

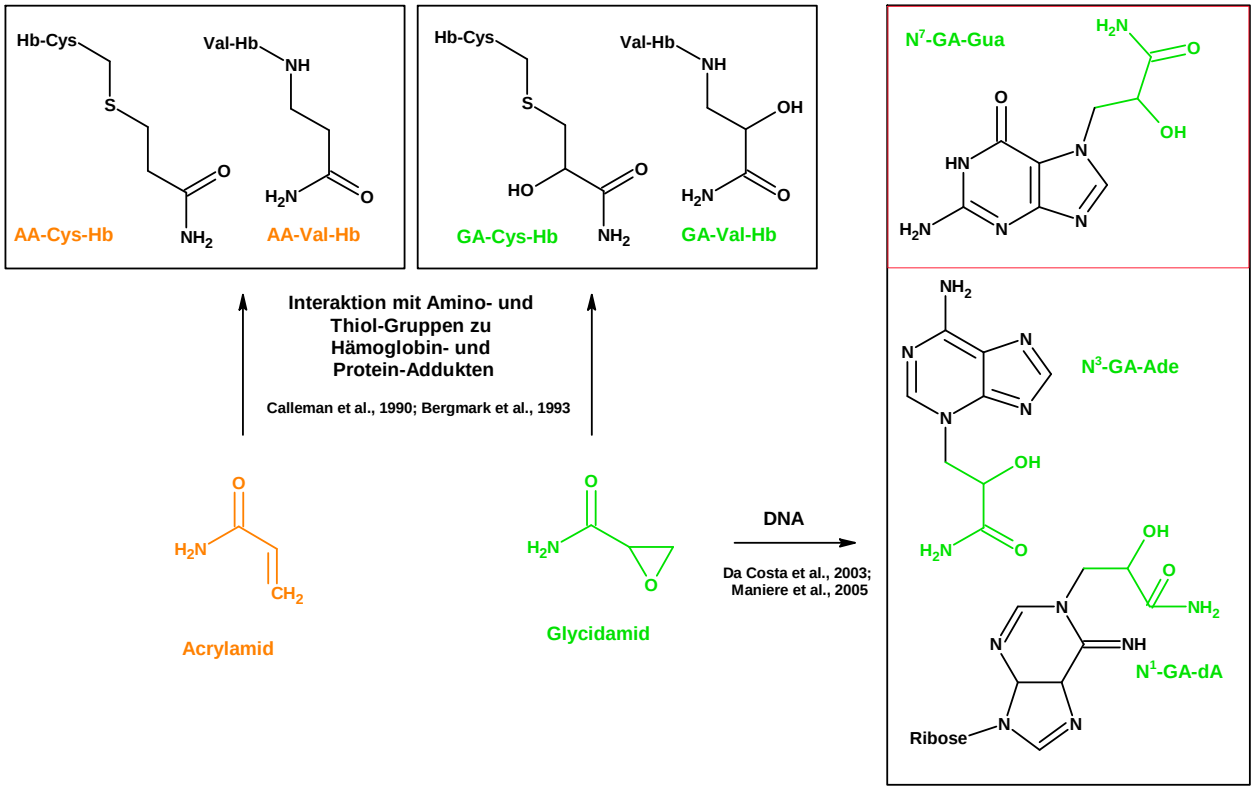


Abb. 16: Interaktion von AA und GA mit Makromolekülen

I) Interaktion mit der DNA

Gegenüber DNA-Basen verhält sich AA wesentlich reaktionsträger als GA [Friedman, 2003]. So konnten Solomon et al. [1985] zwar Addukte von AA mit 2'-Desoxynukleosiden (N^6-dAde, N^3-dCyt, N^1- und N^7-dGua) *in-vitro* nachweisen, dies allerdings erst nach Inkubationszeiten von 40 Tagen. Bei der Reaktion von GA mit 2'-Desoxyguanosin wurde das N^7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin (N^7-G) als dominierendes Addukt *in-vitro* identifiziert [Segerbäck et al., 1995]. Zusätzlich zu den Addukten am N^7-G (72%) reagiert GA mit der DNA zum N^3-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-adenin (N^3-A) (12%) und N^1-(2-

carbamoyl-2-hydroxyethyl)-adenin (N^1-A) (<1%) *in-vitro* [Gamboa da Costa et al., 2003]. Backman et al. [2004] identifizierten im zellfreien System ein Addukt von GA mit Thymin N^3-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-thymidin (N^3-GA-dThd) sowie drei Addukte mit Cytidin. Hierbei wurden zwei Addukte als Diastereomere von N^3-(2-carboxy-2-hydroxyethyl)-cytidin (N^3-GA-Cyd-1 und N^3-GA-Cyd-2) identifiziert. Als weiteres Addukt wurde N^3-(2-carboxy-2-hydroxyethyl)-uridin (N^3-GA-Urd) nachgewiesen.

Die Entstehung der Addukte an Guanin und Adenin konnte *in-vivo* bestätigt werden. Nach *i. p.* Verabreichung von [^{14}C]-markiertem AA an Ratten und Mäuse wurde N^7-G als hauptsächliches Addukt gefunden [Segerbäck et al., 1995]. Die ferner beobachtete gleichmäßige Verteilung in verschiedenen Organen der Ratten lässt auf eine gute Verteilung von GA im Organismus schließen. In adulten, männlichen C3H/HeNMTV- und weiblichen C57B1/CN-Mäusen fanden Gamboa Da Costa et al. [2003] nach einmaliger Applikation (*i.p.*) in den untersuchten Organen Leber, Lunge und Niere vergleichbar hohe Addukt-Level (N^7-G und N^3-A). Ebenfalls wurde festgestellt, dass das N^7-G zu einem etwa 100-fachen Überschuss im Vergleich zu N^3-A gebildet wird. Doerge et al. [2005] identifizierten nach einmaliger oraler Gabe von AA (50 mg/kg) oder wiederholter Dosis (1 mg/kg/Tag) an Mäuse und Ratten das oben beschriebene Addukt-Spektrum. Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Maniere et al. [2005] nach einmaliger Gabe von AA (18, 36 oder 54 mg/kg KG) an Ratten. Zudem wurde eine relativ gleichmäßige Verteilung der Addukte in den untersuchten Organen Gehirn, Testes und Leber festgestellt.

II) Interaktion mit Hämoglobin

Sowohl AA als auch GA interagieren mit nukleophilen Seitenketten von Proteinen oder Hämoglobin (Hb). Der Nachweis dieser Addukte findet insbesondere aufgrund der langen Lebensdauer von Hb in den Erythrozyten (ca. 120 Tage im Menschen) Anwendung als Expositionsbiomarker. Die erhaltenen Hb-Addukt-Levels bieten eine Grundlage für toxikokinetische Berechnungen sowie Kalkulationen über Aufnahme und Blutkonzentration. Anwendung findet die Methode u. a. zum Nachweis der Arbeitsplatzexposition [Bergmark, 1993 & 1997; Calleman, 1994; Licea-Perez et al., 1999; Hagmar et al., 2001; Kjuus et al., 2004; Paulsson et al., 2005] und lieferte erste Hinweise auf die Bildung von AA in erhitzten Lebensmitteln durch Verwendung in einer Fütterungsstudie mit gerösteten Lebensmitteln an Ratten [Tareke et al., 2000 und 2002].

Calleman et al. [1990] konnten sowohl *in-vivo* an Ratten als auch *in-vitro* die Reaktion von AA und GA mit der stark nukleophilen Thiolgruppe von Cystein im Hämoglobin und die damit verbundene Bildung von Acrylamid- bzw. Glycidamid-Cystein-Addukten (AA-Cys-Hb; GA-Cys-Hb) nachweisen. Hierbei ist die Affinität von AA gegenüber Hb etwa dreifach höher als die von GA und verläuft im Gegensatz zu GA in Abhängigkeit zur Do-

sis linear [Bergmark et al., 1991]. Cystein im Hb von Ratten besitzt gegenüber Elektrophilen eine etwa 2-fach höhere Reaktivität als humanes Cystein [Tornqvist et al., 2002]. Zum Nachweis der Reaktivität von AA und GA gegenüber Hb in humanem Vollblut eignet sich daher eher der Nachweis der Bildung von Hb-Addukten am N-terminalen Valin.

In diesem Zusammenhang gelang Bergmark et al. [1993] eine Vereinfachung und Steigerung der Sensitivität im Nachweis von Hb-Addukten in Humanblut durch Verwendung des Edman-Abbaus. Hiermit konnte die Interaktion von AA und GA mit der terminalen Aminogruppe des endständigen Valins im Hämoglobin und die Bildung entsprechender Hb-Addukte (AA-Val-Hb; GA-Val-Hb) in AA-exponierten Arbeitern gezeigt werden. Des Weiteren konnten in verschiedenen Tierversuchsstudien zum Metabolismus von AA ebenfalls AA-Val-Hb- und GA-Val-Hb-Addukte detektiert werden [Paulsson et al., 2002; Sumner et al., 2003; Fennell et al., 2003].

Aus verschiedenen Studien ergibt sich ein humaner Hintergrundgehalt an AA-Val-Hb für Nichtraucher von ca. 30 pmol/g Hb (Dybing et al., 2005 (rev.)]. Bergmark et al. [1993] fanden ein Addukt-Verhältnis von AA-/GA-Val-Hb von 1:1. Unter der Annahme, dass AA mit der Aminogruppe des Valins ca. dreimal langsamer reagiert als GA, kann eine Umsetzungsrate von ca. 30% für GA angenommen werden. Vesper et al. [2006] bestimmten ein ähnliches Addukt-Verhältnis von 129 pmol/g Hb AA-Val-Hb zu 97 pmol/g Hb GA-Val-Hb.

3.4.1.3.4. Ausscheidung

In Studien an Ratten wurde die Halbwertszeit von AA mit 1,4-1,9 h bestimmt [Miller et al., 1982; Crofton et al., 1996]. Ein geringer Anteil wurde nach mehreren Wochen in Blut und Gewebe nachgewiesen [Ideka et al., 1987].

Die Ergebnisse verschiedener Fütterungsstudien zeigen, dass die Ausscheidung über den Urin den Hauptweg der Elimination von Acrylamid darstellt (ca. 55-70% der eingesetzten Dosis). Ca. 6% der eingesetzten Dosen wurden im Fäces wieder gefunden [Miller et al., 1982; Ikeda et al., 1987; Sumner et al., 2003]. Die Ausscheidung von AA erfolgt zweiphasig. In der ersten Phase werden AA und AA-Metabolite bereits nach ca. 5 h ausgeschieden; die zweite Phase nach ca. 8 Tagen umfasst Protein-Addukte und AA-Depots in den Geweben [Miller et al., 1982].

AA ist in der Lage, die Placenta-Schranke von Ratten, Mäusen, Hasen, Hunden und Schweinen zu überwinden [Calleman, 1996] und kann bereits 24 h nach oraler Gabe an trächtige Mäuse im Fötus nachgewiesen werden [Marlowe et al., 1986]. Des Weiteren konnte an männlichen Mäusen eine Akkumulation im Fortpflanzungstrakt gezeigt werden [Marlowe et al., 1986].

Nach Interaktion von AA und GA mit Glutathion (GSH) entstehen Mercaptursäuren, die mit dem Urin ausgeschieden werden. Als Hauptmetabolit wurde das aus AA hervorgehende N-Acetyl-S-(2-aminocarbonylethyl)-cystein (Ac-AA-Cys) in Fisher-344 Ratten und B6C3F$_1$ Mäusen identifiziert (67 resp. 41% des Metabolitengehaltes) [Miller et al., 1982; Sumner et al., 1992]. Da GSH an die C-Atome 2 und 3 von GA binden kann, sind zwei GA-Mercaptursäuren formulierbar. In Fisher-344 Ratten und B6C3F$_1$ Mäusen wurden N-Acetyl-S-(2-aminocarbony-2-hydroxylethyl)-cystein (Ac-3GA-Cys) mit einem Gehalt von 16 resp. 9% und N-Acetyl-S-(1-aminocarbony-2-hydroxylethyl)-cystein (Ac-2GA-Cys) (21 resp. 12%) nachgewiesen [Sumner et al., 1992]. Des Weitern konnte gezeigt werden, dass auch unverändertes GA (6 resp. 17%) und AA (<2%) sowie Glyceramid (GD) (<5%) mit dem Urin der untersuchten Ratten und Mäuse ausgeschieden werden [Miller et al., 1982; Sumner et al., 1992]. Die Bildung dieser Derivate ist in **Abb. 17** dargestellt.

In einer weiteren Studie detektierten Sumner et al. [1997] nach wiederholter oraler Gabe (5 Tage) von ^{13}C-AA an Mäuse eine Zunahme der Mercaptursäure-Ausscheidung im Vergleich zu den nach einmaliger Gabe erhaltenen Raten. Daraus schloss man eine gesteigerte GSH-Neusynthese oder GST-Aktivität durch mehrfache Applikation.

Ein Vergleich der Applikationswege oral, *i. p.*, dermal und inhalativ von ^{14}C-AA an Ratten und Mäuse bestätigte die Ausscheidung über den Urin als Hauptweg der Elimination (Ratte: *i. p.* 62% und oral 53% der Dosis; dermal 44% der absorbierten Dosis; inhalativ 31% der eingesetzten Radioaktivität/ Mäuse: inhalativ 27% der eingesetzten Radioaktivität) [Sumner et al., 2003]. Unabhängig von der Applikationsart spielt die Ausscheidung über den Fäces eine untergeordnete Rolle (<5%). Nach inhalativer und dermaler Applikation ist jedoch nach 24 h der größte Anteil der dermal absorbierten (53%) oder inhalierten (46%) Dosis an ^{14}C-AA in den Geweben oder Organen nachweisbar.

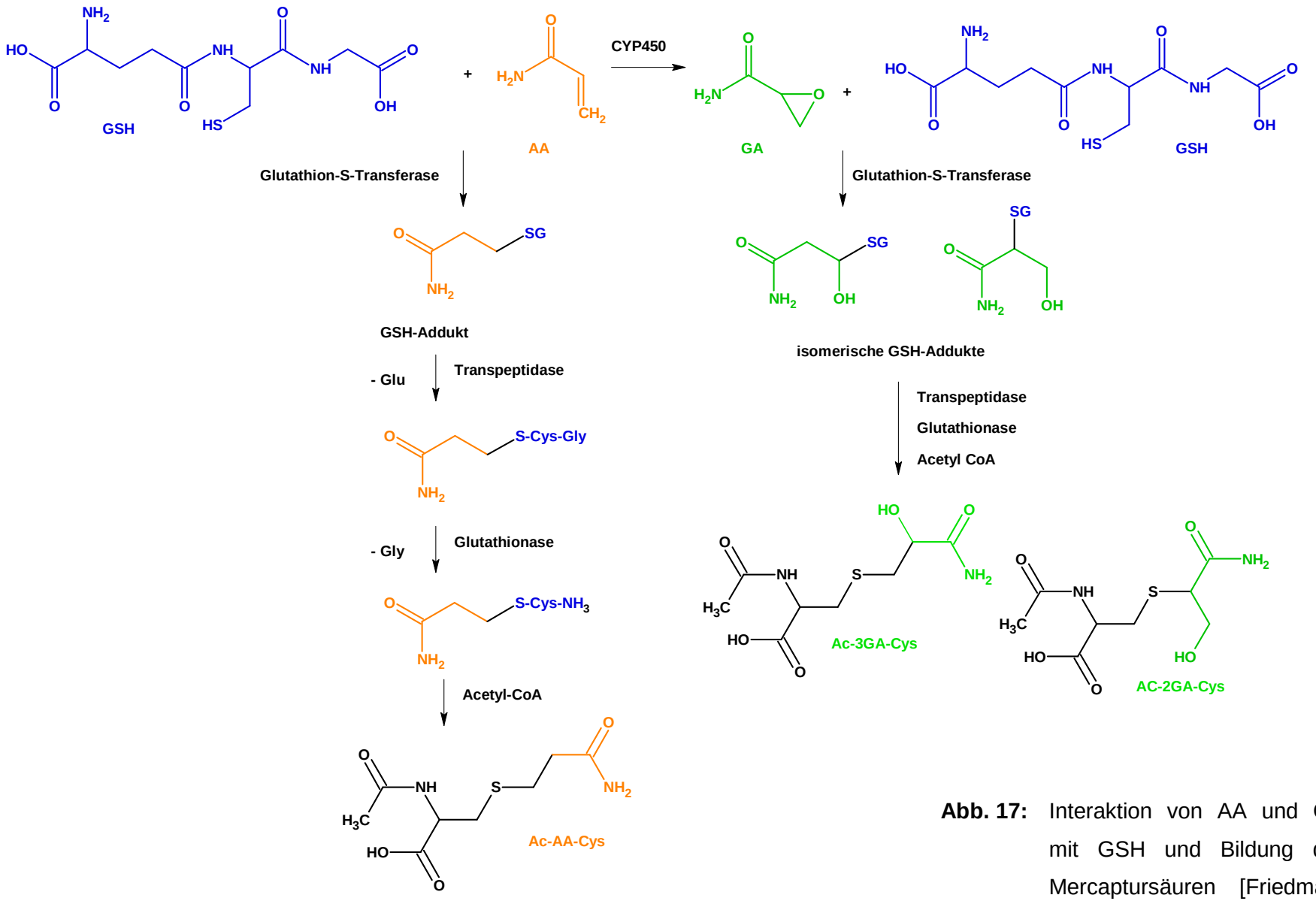


Abb. 17: Interaktion von AA und GA mit GSH und Bildung der Mercaptursäuren [Friedman, 2003 (rev.)]

Auch in verschiedenen Humanstudien wurde die Bildung von AA- und GA-Mercaptursäuren nachgewiesen. In einer Studie an AA-exponierten Arbeitern fand man S-(2-Carboxyethyl)-cystein im Urin [Calleman et al., 1994]. Fennell et al. [2005] zeigten, dass nach oraler Gabe von 0,5-3 mg/kg KG AA 86% der im Urin nachgewiesenen Mercaptursäuren auf vorherige GSH-Konjugation von AA und GA zurückzuführen sind. Zusätzlich zu den bereits im Tierversuch detektierten Mercaptursäuren zeigten Fennell et al. [2005] die Bildung von *N*-Acetyl-*S*-(3-amino-3-oxopropyl)-cystein-S-oxid (14% des Gehaltes an Metaboliten).

Der Vergleich des Urins von Rauchern und Nichtrauchern lieferte für erstere vierfach höhere Werte für Ac-AA-Cys und Ac-3GA-Cys (127 µg/l:29 µg/l (Ac-AA-Cys) und 19µg/l:5µg/l (Ac-3GA-Cys)) [Boettcher et al., 2005a]. In einer weiteren Untersuchung wurde der Hintergrundgehalt von nicht beruflich oder durch Rauchen exponierten Probanden an Ac-AA-Cys und Ac-3GA-Cys auf 5-338 µg/L Ac-AA-Cys resp. <LOD-45 µg/L Ac-3GA-Cys bestimmt [Boettcher et al., 2005b]. Die Ausscheidung von AA- und GA-Mercaptursäuren verläuft in zwei Phasen. Nach einmaliger Gabe von d^3-AA (13µg/kg KG) über das Trinkwasser an Probanden wurde 8-18 h nach Applikation zunächst Ac-AA-Cys, und nach 22 h- mehrere Tage Ac-3GA-Cys im Urin nachgewiesen. In Übereinstimmung mit Rattenstudien konnte nach 24 h 51% der eingesetzten Dosis im Urin als Mercaptursäure-Derivat wieder gefunden werden. Auch hier erwies sich Ac-AA-Cys als Hauptmetabolit [Boettcher et al., 2006].

Fuhr et al. [2006] untersuchten die Bildung von AA- und GA-Mercaptursäuren nach Aufnahme von AA durch die Nahrung (0,94 mg AA). Die Untersuchungen zeigten, dass die Dosis größtenteils absorbiert wird. Im Urin wurden sowohl die durch Boettcher et al. [2005] beschriebenen Mercaptursäuren, als auch freies AA, allerdings kein GA nachgewiesen. Die Gehalte an GA-Mercaptursäuren lagen quantitativ etwa 2-fach unterhalb der in Ratten gemessenen Werte sowie 4-fach tiefer als in Mäusen. Insgesamt fanden sich nach 72 h ca. 60% der eingesetzten Dosis im Urin wieder. Auch hier fand die Ausscheidung in mehreren Phasen statt.

Die Ausscheidung von N-Acetyl-S-(2-aminocarbonylethyl)-cystein als hauptsächlichem Metaboliten lässt grundsätzlich vermuten, dass die Detoxifizierung gemeinsam mit der Elimination von unverändertem AA, effizienter als die Bildung des reaktiven Metaboliten GA stattfindet.

3.4.1.4. Toxikologie von Acrylamid

3.4.1.4.1. Neurotoxizität

Die Neurotoxizität von AA konnte in Studien an beruflich exponierten Personen nachgewiesen werden. Als Symptome wurden Muskelschwäche der Beine, Verlust von Tastsinn und Schmerzempfinden sowie Taubheit von Händen und Füssen festgestellt. Eine längere Exposition mit AA führte zu schwerwiegenderen Symptomen, einschließlich cerebraler Dysfunktionen gefolgt von peripherer Neuropathie [Calleman et al., 1994; Crofton et al., 1996; Hagmar et al., 2001].

Nach Applikation von subakuten bzw. subchronischen Dosen an Ratten kam es in beiden verwendeten Dosisgruppen zu Schwäche und Ataxie der Hinterläufe (Koordinationsstörung von Muskelbewegungen) [Barber et al., 2001].

Anhand von histopathologischen Untersuchungen an Ratten konnte gezeigt werden, dass AA in verschiedenen Dosierungen zunächst die Nervenendigungen in verschiedenen Gehirn- und Rückenmarksregionen beeinträchtigt und in der Folge das gesamte Axon schädigt. Zusätzlich konnten Schädigungen der Synapsen von Peripherem und Zentralem Nervensystem sowie der Purkinje Zellen des Kortex nachgewiesen werden [Lehning et al., 2002a und 2002b].

Costa et al. [1992; 1995] konnten anhand verschiedener neurologischer Tests zeigen, dass GA nahezu keine neurotoxischen Effekte besitzt, sondern vielmehr die in Ratten beobachteten Störungen auf AA zurückzuführen sind.

Der Mechanismus der Neurotoxikologie von AA wird bislang auf zwei verschiedenen Hypothesen begründet: Inhibition des Kinase-basierenden Axon-Transports oder direkte Inhibition der Neurotransmission [Friedman, 2003 (rev.)].

Der aus Rattenstudien abgeleitete NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) für AA von 0,5 mg/kg KG/Tag [Friedman et al., 1995] wird von der WHO [2002] auch auf Grundlage weiterer Studien an Versuchstieren und Mensch als ausreichend angesehen.

3.4.1.4.2. Reproduktionstoxizität

Die Reproduktionstoxizität von AA konnte in verschiedenen Ein- und Zwei-Generationen-Studien an Ratten nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich nach oraler Applikation von AA über das Trinkwasser eine verringerte Anzahl der Nachkommen und hohe Abortrate bei behandelten und unbehandelten Weibchen, die mit behandelten Männchen gepaart worden waren. Des Weiteren konnte in behandelten Männchen eine signifikant verringerte Spermienzahl und -qualität festgestellt werden. Ferner waren Geburtsgewicht und Gewichtszunahme der Nachkommen negativ beeinflusst, wobei ungeklärt ist, ob dies

auf die Exposition im Uterus oder während der Laktation zurückzuführen ist [NICNAS, 2002].

Auch GA konnte als reproduktionstoxisch identifiziert werden. In einer Studie von Costa et al. [1992] an Ratten induzierte GA eine Gewichtsabnahme der Nebenhoden und hatte Einfluss auf Spermienanzahl und -viabilität.

Die Bedeutung von AA und GA auf Fertilität, Nachkommenentwicklung und Stillperiode beim Menschen ist bislang noch nicht nachgewiesen [NICNAS, 2002].

Der NOAEL für die Reproduktionstoxizität von AA liegt nach Angaben der WHO [2002] bei 2 mg/kg KG/ Tag.

3.4.1.4.3. Genotoxizität und Mutagenität

Die Genotoxizität und Mutagenität von AA und GA ist in verschiedenen Studien untersucht worden.

I) Genotoxizität und Mutagenität in-vitro

AA induziert Chromosomen-Aberrationen in somatischen Zellen und Keimzellen [Adler et al., 1990; Pacchierotti et al., 1994]. *In-vitro* induziert AA Mikrokerne im Knochenmark und der Mils von Mäusen [Adler et al., 1988; Backer et al., 1989] sowie in den Spermatiden von Ratten [Lähdetie et al., 1994] und Mäusen, worin die Mikrokerne als zentromer-positiv identifiziert werden konnten [Collins et al., 1992]. In humanem Vollblut *in-vitro* induzieren weder AA noch GA Mikrokerne in Lymphozyten [Baum et al., 2005b].

Im UDS Assay („unscheduled DNA synthesis assay“) in Rattenhepatozyten ist AA nur gering aktiv, GA inaktiv [Barfknecht et al., 1988]. Ferner induziert AA Schwester-Chromatid-Austausch-Ereignisse (SCE) in der Milz von Mäusen [Backer et al., 1989] und in V79H3 Zellen des Chinesischen Hamsters [Tsuda et al., 1993].

AA induziert DNA-Schäden in *Bacillus subtilis* [Tsuda et al., 1993] und humanen, isolierten Lymphozyten [Blasiak et al., 2004].

In *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537), *E. coli* [Tsuda et al., 1993] und *Klebsiella pneumoniae* [Knaap et al., 1988] ist AA nicht mutagen. Im Gegensatz dazu, zeigt GA positive Ergebnisse in *Salmonella typhimurium* TA100 und TA1535, ist allerdings in *Klebsiella pneumoniae* wie AA negativ [Dearfield et al., 1995].

AA induziert Mutationen am *tk* (Thymidin-Kinase)- und *hPRT (*Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase*)*-Gen in Lymphomzellen (L5178Y/TK+/-) der Maus [Moore et al., 1987; Dearfield et al., 1995]. Allerdings wurden keine Mutationen am *hPRT*-Locus in V79H3 Zellen des Chinesischen Hamsters nachgewiesen [Tsuda et al., 1993]. AA ist deutlich mutagen in transgenen embryonalen fibroblastoiden Zellen der Maus, wobei

hauptsächlich G → C Transversionen und A → G Transitionen nachgewiesen wurden [Besaratinia et al., 2003].

II) Genotoxizität und Mutagenität in-vivo

Nach *i. p.* Applikation an Mäuse (bis 100 mg/kg KG/Tag) induziert AA Mikrokerne in den Erythrozyten. Der beobachtete geringe DNA-Gehalt in den Mikrokernen lässt auf das Fehlen ganzer Chromosomen, d.h. auf keinen aneugenen Effekt von AA schließen [Abramsson-Zetterberg, 2003]. Des Weiteren erhöht AA die Anzahl der peripheren Mikrokerne in männlichen CBA Mäusen nach *i. p.* Gabe von AA [Paulsson et al., 2002]. In den Knochenmark-Erythrozyten von Sprague-Dawley Ratten wurde dieser Effekt nicht beobachtet [Paulsson et al., 2002]. Auch nach Applikation von GA an Mäuse und Ratten zeigte sich eine Erhöhung der Mikrokernrate, was Paulsson et al. [2003] zum Schluss führte, dass GA als Metabolit von AA für die Mikrokern-Induktion verantwortlich gewesen sein musste.

Nach *i. p.* Applikation an CYP2E1-null-Mäusen induziert AA keine Mikrokerne im Blut. Im Gegensatz dazu ist die Mikrokernrate in Wildtyp-Mäusen deutlich erhöht [Ghanayem, et al., 2005a].

In somatischen Zellen induziert AA nach *i. p.* Applikation an Wildtyp-Mäuse DNA-Schäden. Dies konnte in CYP2E1-null-Mäusen nicht beobachtet werden [Ghanayem, et al., 2005a].

Nach Gabe einer einmaligen Dosis AA (18-54 mg/kg KG/Tag) an Ratten wurde eine erhöhte DNA-Migration mittels Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) in Gehirn und Testes festgestellt. Dahingegen war die DNA in der Leber, dem Knochenmark und der Nebenniere nur gering geschädigt [Maniere et al., 2005].

Klaunig et al [2005] fanden in Fisher-344 Ratten, die mit AA (0, 2, oder 15 mg/kg KG/Tag) für 7, 14, oder 28 Tage behandelt wurden, eine Zunahme der DNA-Synthese in Schilddrüse, Hodenmesothelium und Nebennierenmark in allen eingesetzten Dosen und Zeitpunkten. Des Weiteren zeigte sich in diesen Organen eine gesteigerte DNA-Schädigung, die mittels Comet Assay detektiert wurde. Beide Effekte konnten in der Leber nicht nachgewiesen werden.

In neugeborenen Mäusen, die pränatal mit AA exponiert wurden, induziert AA Mutationen [Neuhauser-Klaus et al., 1989]. Des Weiteren wurde die Induktion von Mutationen durch AA in den Keimzellen von weiblichen Mäusen, die mit Wildtyp-Mäusen gepaart wurden, allerdings nicht in solchen, die mit CYP2E1-null-Mäusen gepaart wurden, gezeigt [Ghanayem et al., 2005b]. Dies beweist den Einfluss von CYP2E1 auf den Metabolismus von AA und der damit verbundenen Bildung von GA.

Nach Applikation von AA und GA (0-500 mg/l) über das Trinkwasser an Big Blue Mäuse wurde in den Lymphozyten eine erhöhte *hPRT*-Mutationsfrequenz festgestellt. Dies war hautsächlich auf G:C → T:A Transversionen und -1/+1 Frameshifts zurückzuführen [Manjanatha et al., 2006].

3.4.1.4.4. Kanzerogenität

Die Kanzerogenität von AA ist in verschiedenen Tier- und humanen Kohortenstudien untersucht worden. Insgesamt wurden bisher zwei Langzeit-Studien an Fisher-344 Ratten wurden und zwei Kurzzeit-Studien an Mäusen durchgeführt. Aktuell führt die FDA eine weitere Kanzerogenitätsstudie in Ratten durch, deren Ergebnisse 2008 erwartet werden.
In einer Kurzzeit-Studie zur Initiation und Promotion von Hauttumoren an weiblichen Sencar-Mäusen fanden Bull et al. [1984a] in Tieren, die zusätzlich zu sechs Dosen AA (12,5-50 mg/kg KG; *i.p., p.o.*, dermal) eine einmalige Dosis des Tumorpromotors Tetradecanoylphorbolacetat (TPA) in Aceton erhalten hatten, die Initiation von Adenomen der Haut. Nach *i.p.* Applikation von 1-30 mg/kg KG AA an männliche und weibliche A/J-Mäuse über einen Zeitraum von acht Wochen wurde die Initiation von Lungenadenomen in beiden Geschlechtern gezeigt [Bull et al., 1984a]. Vergleichbare Resultate lieferte auch eine Studie an ICR-Swiss Mäusen (6,25-25 mg/kg KG AA) [Bull et al., 1984b].
1986 veröffentlichten Johnson et al. Ergebnisse einer Langzeittierstudie an männlichen und weiblichen Fisher-344 Ratten. Über zwei Jahre war den Tieren AA (0-2 mg/kg KG/Tag) über das Trinkwasser verabreicht wurden. Jeweils in der höchsten Dosisgruppe wurde eine leichte Gewichtsreduktion, eine deutlich erhöhte Mortalität während der letzten 4 Versuchsmonate sowie das Auftreten unspezifischer Tumore beobachtet.
In einer vergleichbaren Langzeittierstudie von Friedman et al. [1995] an männlichen und weiblichen Fisher-344 Ratten wurde diesen über das Trinkwasser AA (0-2 mg/kg KG/Tag (Männchen; 0-3 mg/kg KG/Tag (Weibchen)) verabreicht. Auch hier fand man eine erhöhte Mortalität (Männchen ab 17. Monat; Weibchen im 24. Monat) in der jeweils höchsten Dosis-Gruppe.
In beiden Studien treten mit einer Inzidenz von 16 resp. 18%, für Fisher-344 Ratten spezifische [Friedman et al., 1999] Skrotum-Mesotheliome auf. Deren Entstehung beruht möglicherweise nicht auf der Induktion genotoxischer Effekte durch AA, sondern ist voraussichtlich auf Veränderungen des Hormonhaushaltes sowie die Beeinflussung hormoneller Wachstumsfaktoren durch AA zurückzuführen [Friedman et al., 1999]. Für Skrotum-Mesotheliome kann daher ein NOEL (No Observable Effect Level) von 0.5 mg/kg angegeben werden.

Studie	Geschlecht & Dosis [mg/kg KG/Tag]	Tumoren
Johnson et al., 1986	♂ 0,5	Skrotum-Mesotheliome Hyperplasie des harten Gaumens
	♂ 2,0	Skrotum-Mesotheliome Schilddrüsen-Adenome Nebennieren-Tumore Hyperplasie des harten Gaumens
	♀ 2,0	Mammatumore Uterus-Tumore Adenome der klitoralen Drüse Tumore im ZNS Schilddrüsen-Adenome Papillome an Gaumen, Lippe und Zunge
Friedman et al., 1995	♂ 2,0	Skrotum-Mesotheliome Schilddrüsen-Adenome
	♀ 1,0	Mammatumore
	♀ 3,0	Mammatumore Schilddrüsen-Adenome

Tab. 3: AA-induzierte Tumorarten in männlichen und weiblichen Fisher-344 Ratten

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde AA von der International Agency for Research on Cancer (IARC) der WHO als Stoff, der beim Menschen wahrscheinlich kanzerogen ist [IARC, 1994], eingestuft. Entsprechend dazu erfolget die Einstufung der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitstoffe von AA als Stoff, der beim Menschen als kanzerogen anzusehen ist (Gruppe III 2).

In verschiedenen Kohortenstudien an exponierten Arbeitern wurde die Kanzerogenität von Acrylamid untersucht. In einer Studie von Sobel et al. [1986] wurden 371 Arbeiter aus der AA-verarbeitenden Industrie über den Zeitraum von 24 Jahren (1955-1979) beobachtet. Man fand erhöhte Tumorraten der Atemwege und des Gastrointestinal-Trakts. Allerdings konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen erhöhtem Krebsrisiko und der AA-Exposition der Arbeiter festgestellt werden, da zusätzlich eine Aufnahme von anderen Kanzerogenen erfolgte. Auch in einer zweiten Studie an 8854 Arbeitern konnte ei-

ne Erhöhung der Atemwegstumorrate festgestellt werden [Collins et al., 1992]. Diese Studie wurde jedoch 1999 durch eine erneute Auswertung der Daten durch Marsh et al. [1999] relativiert. Marsh et al. wiesen auf eine positive Korrelation zwischen kumulativ auftretender Exposition mit AA und der Entstehung von Pankreas-Tumoren hin. Problematisch an den vorliegende Studien sind insbesondere zwei Punkte: zum einen waren lediglich ein Viertel der Arbeiter länger als 10 Jahre mit AA exponiert, zum zweiten war die Exposition mit AA der Kohortenmehrheit im Vergleich zur Kontrolle zu gering.

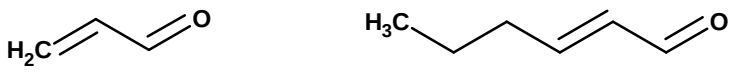
In einer Zweitanalyse einer ursprünglich von Augustsson [1999] durchgeführten Fall-Kontroll-Studie an 591 schwedischen Patienten mit Tumoren an Dick- und Enddarm, Niere und Blase (Korrelation von Krebs und heterozyklischen aromatischen Aminen) untersuchten Mucci et al. [2003] einen Zusammenhang zwischen der Aufnahme von AA durch die Nahrung und dem Auftreten von Tumoren. Es zeigte sich kein kausaler Zusammenhang zwischen den genannten Tumoren und der Aufnahme von AA-haltigen Lebensmitteln. In einer Stellungnahme des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) [2003] wurde die Studie allerdings aufgrund erheblicher Mängel kritisiert. Beispiele dafür waren u. a. mangelhafte Protokollierung der Verzehrsgewohnheiten und unzureichende Berücksichtigung anderer Krebs-induzierender Faktoren (z.B. Rauchen).

Auch Pelucchi et al. [2003] untersuchten die Korrelation von AA-Aufnahme durch Lebensmittel und Krebs. Zu ihren Ernährungsgewohnheiten befragt wurden Patienten mit Tumoren in Mundhöhle und Rachen, Speiseröhre, Kehlkopf, Dick- und Enddarm, Brust und Eierstöcken. Auch hier konnte keine Assoziation zwischen AA-Aufnahme und dem Auftreten der Tumore gefunden werden.

2004 werteten erneut Mucci et al. eine Fall-Kontroll-Studie von Lindblad [1997] zum Einfluss der Ernährung auf die Entstehung von Nierenkrebs aus. Auch hier wurde keine positive Korrelation zwischen AA-reicher Ernährung und Nierenzellkrebs gefunden. Ebenfalls kein Zusammenhang konnte mit dem Auftreten von kolorektalen Tumoren bei Frauen gefunden werden [Mucci et al., 2006].

3.4.2. 2-Alkenale (Acrolein und 2-Hexenal)

3.4.2.1. Vorkommen und Gehalte in Lebensmitteln



Acrolein **2-Hexenal**

Abb. 18: Strukturformeln von Acrolein und 2-Hexenal

2-Alkenale können als Zwischenprodukt der Maillard-Reaktion und beim Strecker-Abbau von Aminosäuren gebildet werden. Vornehmlich allerdings entstehen die Verbindungen bei Zerstörung der Zellstruktur in vielen pflanzlichen Geweben. Hierbei werden ungesättigte Fettsäuren durch Lipoxygenasen enzymatisch-oxidativ gespalten, die entstehenden Fettsäurehydroperoxide werden weiter durch Lyasen abgebaut. Kurzkettige Vertreter, wie z.B. Acrolein (Ac) können auch bei Verbrennungs- und Erhitzungsprozessen entstehen. Sie kommen daher nicht nur in Lebensmitteln (z.B. erhitzten Ölen) vor, sondern sind u. a. auch Bestandteil von Zigarettenrauch und Abgasen.

Das „Blätteraldehyd“ 2-Hexenal (Hex) kommt als natürliche Aromakomponente in Gehalten von meist unter 100 mg/kg in Obst und Gemüse, wie Äpfeln, Bananen, Gurken u. a. vor [Drawert et al., 1973; Gölzer et al., 1996].
Acrolein wurde in Spirituosen und Rotwein sowie als Bestandteil von Früchten, wie beispielsweise Himbeeren, Trauben und Erdbeeren und Gemüsen, wie Kohl und Möhren in teilweise sehr geringen Mengen (< 10 mg/kg) nachgewiesen. Des Weiteren kommt es in tierischen Lebensmitteln, wie Fisch und Käse vor [Feron et al., 1991] und wird beim Erhitzen von Pflanzenölen auf über 240°C gebildet [Fe ron et al., 1991; Collin et al., 1993].
Für 2-Alkenale ist eine Expositionsabschätzung für den Mensch aufgrund teils sehr unterschiedlicher Ernährungsgewohnheiten schwierig. Kalkulationen liegen im Bereich von 1-13 mg/Person [Glaab et al., 2001]. Da die Verbindungen allerdings auch endogen im Verlauf der Lipidperoxidation gebildet werden können [Uchida et al., 1998], muss von einer permanenten Exposition mit 2-Alkenalen ausgegangen werden [Ghissassi et al., 1995; Bartsch et al., 1999; Nair et al., 2000].

3.4.2.2. Biotransformation

Die Biotransformation von 2-Alkenalen erfolgt über die in **Abb. 19** dargestellten Reaktionswege. Durch Aldehyddehydrogenasen (AlDH) werden 2-Alkenale zu Alkensäuren o-

xidiert. Durch anschließende β-Oxidation werden kürzerkettigen Carbonsäuren gebildet [Schuhmacher et al., 1990]. Des Weiteren kann eine Alkoholdehydrogenase (ADH)-vermittelte Reduktion zum entsprechenden Alkenol erfolgen. Durch direkte oder GST-katalysierte Reaktion mit Glutathion (GSH), entweder direkt oder nach Epoxidierung, kommt es zur Entgiftung, wobei das Glutathionkonjugat in die entsprechende Mercaptursäure überführt, und diese dann mit dem Urin ausgeschieden wird [Schuhmacher, 1990; Eisenbrand et al., 1995]. Hierbei läuft die enzym-katalysierte Interaktion mit GSH etwa 500-mal schneller ab, als die nicht-enzymatische [Schuhmacher, 1990; Eisenbrand et al., 1995]. Für Acrolein wurde gezeigt, dass die GST-Isoenzyme der P Familie die Umsetzung mit GSH am stärksten katalysieren [Berhane et al., 1990].

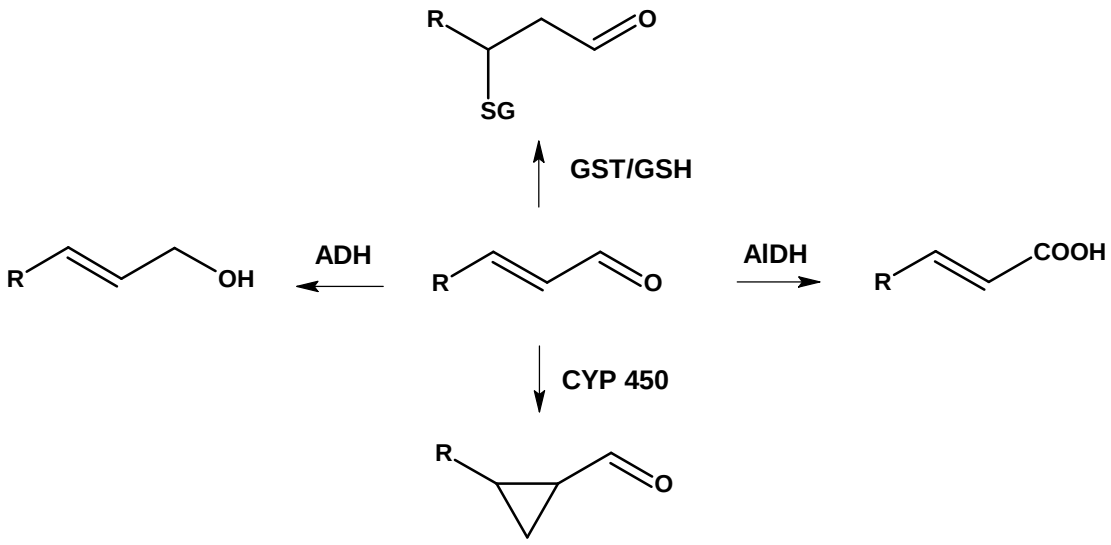


Abb. 19: Biotransformation von 2-Alkenalen

Die Umsetzung von Acrolein mit Rattenlebermikrosomen führte durch Epoxidierung zur Bildung von Glycidaldehyd [Patel et al., 1980], das von der IARC [1985] als kanzerogen eingestuft worden ist.

3.4.2.3. Cytotoxizität

Mit steigender Kettenlänge (C5-C9) nimmt die Cytotoxizität sowohl in Bakterien (*Salmonella typhimurium* TA 104) [Marnett et al., 1985] als auch in Säugerzellen ab [Canonero et al., 1990].

Im Gegensatz dazu nimmt die Cytotoxizität *in-vivo* mit steigender Kettenlänge (C3-C6) zu. Daten zur akuten Toxizität nach oraler Applikation an Maus und Ratte sind als LD_{50} in **Tab. 4** angegeben.

Substanz	Organismus	oraler LD_{50} [mg/kg]	Referenz
Acrolein	Ratte	46	IARC, 1985
	Maus	28	
2-Hexenal	Ratte	850-1130	Gaunt et al., 1971
	Maus	1550-1750	Moreno, 1973

Tab. 4: Daten zur akuten Toxizität von Acrolein und 2-Hexenal

3.4.2.4. Genotoxizität und Mutagenität

Im Ames-Test ist Ac mutagen in *Salmonella typhimurium* TA 104 resp. TA 1535 [Hales, 1982; Marnett et al, 1985]. Das mutagene Potential in *E. coli* ist hingegen nur schwach [Hemminki et al, 1980].

Acrolein induziert *in-vitro* Schwesterchromatid-Austausch-Ereignisse (SCE) [Au et al., 1980] und DNA-Einzelstrangbrüche [Grafstrom et al., 1986, 1988] in humanen Bronchialepithelzellen. In Nukleotid-Excision-Repair (NER)-defizienten Fibroblasten ist Ac deutlich mutagen [Curren et al., 1988].

2-Hexenal ist mutagen in Bakterien und V79 Säugerzellen, allerdings nur in relativ hohen, teils cytotoxischen Konzentrationen [Marnett et al., 1985; Canonero, 1990; Eder et al., 1993]. Während eine Depletion von Glutathion bereits bei relativ niedrigen Konzentrationen von 10-50 µM beobachtet wird [Glaab et al., 2001], erfolgt die Induktion von DNA-Schäden erst bei deutlich höheren Konzentrationen. In V79-Zellen und CaCo 2-Zellen waren DNA-Schäden (Comet Assay) ab 150 µM, in primären Rattenhepatozyten ab 200 µM detektierbar [Janzowski et al., 2000]. Eine erhöhte oxidative DNA-Schädigung wurde in V79 Säugerzellen ab 100 µM nachgewiesen [Glaab et al, 2000].

2-Hexenal erzeugt signifikant DNA-Schäden in Kolonzellen der Ratte ab 400 µM. In primären Zellen der Magenschleimhaut der Ratte war 2-Hexenal nur schwach aktiv (>800 µM). In humanen Kolonzellen erzeugte 2-Hexenal ab 400 µM DNA-Schäden [Gölzer et al., 1996; Janzowski et al., 2000].

Dittberner et al. [1995] zeigten eine dosisabhängige Induktion von Schwesterchromatid-Austausch-Ereignissen (SCE) und Mikrokernen in humanen Lymphozyten und Namalva Zellen durch 2-Hexenal (5-250 µM).

3.4.2.5. Interaktion mit der DNA

2-Alkenale sind in der Lage, effektiv mit der DNA zu interagieren und Addukte zu bilden. Bevorzugt findet diese Reaktion am Guanin statt. Für Acrolein ist auch die Bindung an Adenin beschrieben [Eder et al., 1993b; Gölzer et al., 1996]. **Abb. 20** zeigt die möglichen Addukte von Acrolein und 2-Hexenal.

DNA-Addukte der beiden hier untersuchten Substanzen sind in **Tab. 5** angegeben.

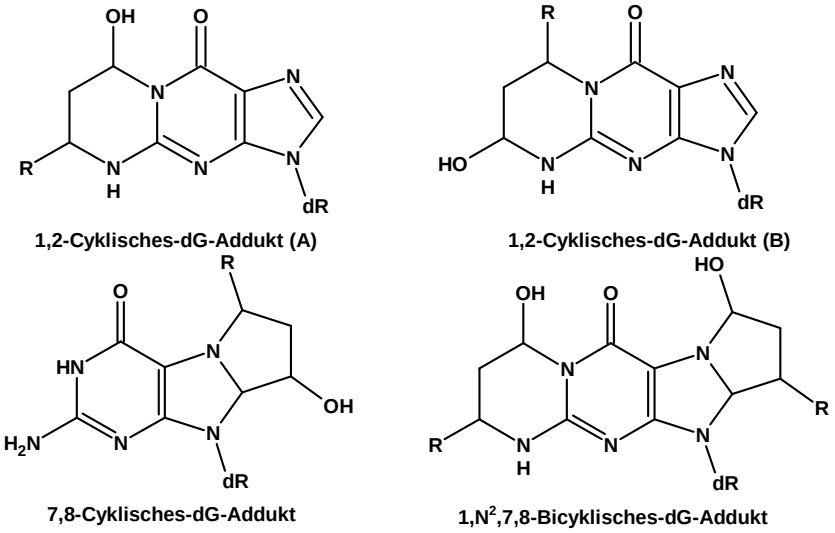


Abb. 20: dG-Addukte von 2-Alkenalen [Eder et al., 1993b]

Substanz	R	1,2-cyklisches dG-Addukt		7,8-cyklisches dG-Addukt	1,N^2,7,8-bicyklisches dG-Addukt
		A	B		
Acrolein	-H	+	+	-	+
2-Hexenal	$-(CH_2)_2-CH_3$	+	-	+	-

Tab. 5: dG-Addukte von Acrolein und 2-Hexenal

3.5. Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sind formal mehrkernig kondensierte Ringsystem. Sie sind hochlipophil, in Wasser nahezu unlöslich und gering flüchtig. Die hauptsächliche Exposition mit PAK erfolgt am Arbeitsplatz dermal oder über Inhalation. Die durchschnittliche Bevölkerung nimmt PAK überwiegend über belastete Nahrungsmittel und in deutlich geringeren Mengen über das Trinkwasser auf [Scientific Committee on Food (SCF), 2002b].

PAK kommen als anthropogene Verunreinigungen in der Umwelt ubiquitär vor. Sie werden bei der unvollständigen Verbrennung (über 700℃) von organischem Material, insbesondere von Holz, Kohle und Mineralöl gebildet und wurden daneben auch in Autoabgasen und Zigarettenrauch nachgewiesen. Als Spurenkontaminanten sind PAK außerdem in Lebensmitteln vorhanden. Hierbei werden sie u. a. während der Lebensmittelherstellung, insbesondere beim Räuchern und Grillen in Lebensmittel eingebracht oder gebildet [Guillen et al., 1997; Phillips, 1999]. Ferner wurde eine Kontamination von Gemüse durch Ablagerung von PAK-haltigen Staubpartikeln an der Oberfläche festgestellt [SCF, 2002b].

3.5.1. Benzo[a]pyren (B[a]P)

Unter der Vielzahl an PAK ist Benzo[a]pyren (B[a]P) die am besten untersuchte Verbindung und wird häufig als Marker für das Vorkommen von PAK in der Umwelt und in Lebensmitteln verwendet.

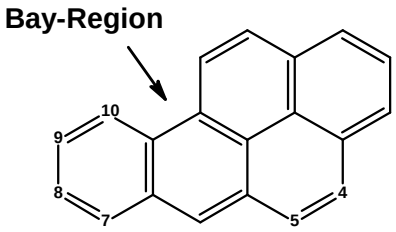


Abb. 21: Strukturformel von Benzo[a]pyren (B[a]P)

Für die Belastung von Lebensmitteln mit PAK existieren in Deutschland gesetzlich Regelungen. Für geräucherte Fleischwaren und Käse gilt ein Grenzwert für B[a]P von 1 ppb. Traditionell geräucherte Fleisch- und Fischwaren dürfen nach einer EU-Richtlinie Grenzwerte von 1 bzw. 5 µg/kg B[a]P nicht überschreiten. Des Weiteren gilt ein Höchstwert der Trinkwasserbelastung von 0,2 ppb (Summe PAK). In **Tab. 6** sind exemplarisch Gehalte von B[a]P in Lebensmitteln dargestellt.

Lebensmittel	B[a]P [µg/kg]	Referenz
Schweinefleisch (geräuchert)	0,2-2,5	Gomaa et al., 1993
Fisch (geräuchert)	0,01-0,9	Karl et al., 1993
Fleisch (gegrillt)	0,1-1,5	Lodovici et al., 1995
Speiseöl	0,6	Lodovici et al., 1996

Tab. 6: Gehalt von B[a]P in ausgewählten Lebensmitteln

Nach Angaben des Scientific Committee on Food (SCF) [2002b] beträgt die mittlere tägliche Aufnahme an B[a]P für einen erwachsenen Nichtraucher durchschnittlich 0,05-0,29 µg/Tag. Die zusätzliche Aufnahme an B[a]P für einen Raucher (20 Zigaretten/Tag) wird auf weitere 210 ng/Tag kalkuliert.

3.5.1.1. Aufnahme, Verteilung und Exkretion

Anhand von Tierversuchsstudien wurde gezeigt, dass B[a]P rasch (1-6 h) absorbiert wird [IPCS, 1998]. Detektierbare Mengen an B[a]P konnten in einer Vielzahl von Organen gefunden werden, insbesondere solchen mit einem hohen Anteil an Fettgewebe. Des Weiteren kann B[a]P im Darm resorbiert, von hier aus über die Pfortader in die Leber transportiert und dort metabolisiert werden. B[a]P passiert die Placenta-Schranke und kann im Fötus nachgewiesen werden. Die Ausscheidung erfolgt über Urin, Fäces und Galle, wobei letztere den Hauptausscheidungsweg darstellt (60%) [IPCS, 1998; SCF, 2002b].

3.5.1.2. Metabolismus

Wie alle PAK ist auch B[a]P ein Präkanzerogen, das durch metabolische Aktivierung in seine biologisch aktive Form überführt wird. Inzwischen wurden über 20 verschiedene B[a]P-Metaboliten identifiziert, die an Makromoleküle binden, wobei das Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE) das ultimale Kanzerogen ist. Prinzipiell erfolgt die Aktivierung in einem mehrstufigen Prozess, der in **Abb. 22** schematisch dargestellt ist.

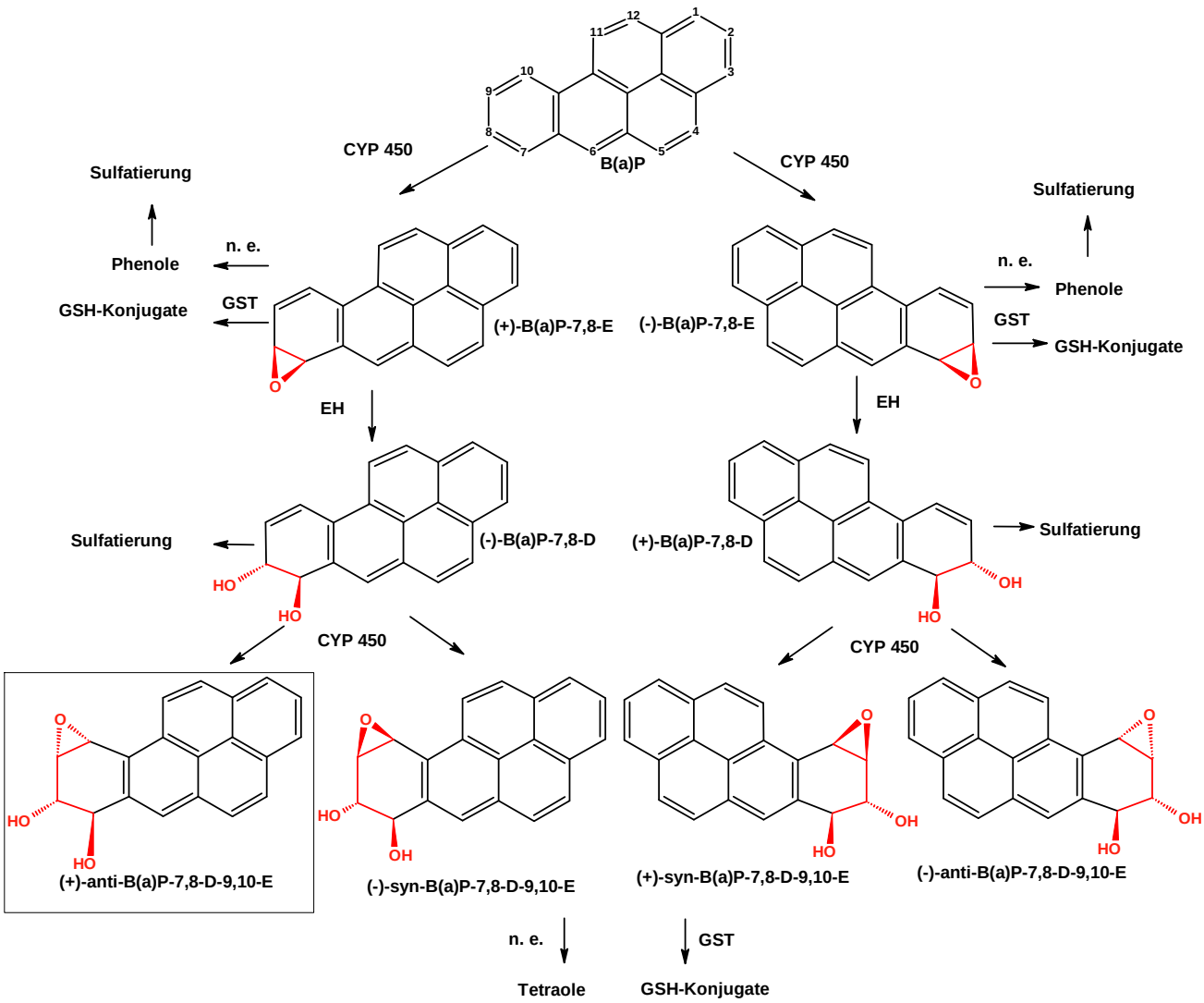


Abb. 22: stereospezifische Metabolisierung von B[a]P zum ultimalen Kanzerogen BPDE und Detoxifizierung (modifiziert nach Peltonen und Dipple, 1995)

In einer CYP450-vermittelten Oxidation (Phase I) an den Positionen 4, 5-, 7, 8- oder 9, 10 werden reaktive Epoxide gebildet. An dieser Oxidation beteiligte Cytochrome sind u. a. das CYP1A1, welches die höchste Aktivität aufweist sowie in geringerem Ausmaß CYP1A2, CYP3A4 und CYP2C [Bauer et al., 1995]. Die gebildeten Epoxide werden anschließend entweder unter Beteiligung einer Epoxidhydrolase (EH) zu trans-Dihydrodiolen hydratisiert oder auf nicht-enzymatischem Weg zu Phenolen isomerisiert, welche wiederum zu Chinonen weiteroxidiert werden können. Die Entgiftung der Metabolite erfolgt durch Konjugation mit Glutathion (GSH) und Sulfatierung. Generell stellt die Entstehung der Dihydrodiole den kritischen Schritt der metabolischen Aktivierung dar. Unter Beteiligung von CYP450 kann eine Weiteroxidation, welche beim 7,8-DH dominierend ist, zum Epoxid erfolgen. Das hierbei entstehende Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE) ist das ultimale Kanzerogen. Dieses ist in der Lage, effektiv mit nukleophilen Bereichen der DNA zu interagieren. Eine Entgiftung von BPDE erfolgt ent-

weder durch GST-vermittelte Konjugation mit GSH [Sundberg et al., 2002] oder hydrolytisch zum Tetraol.

Die Biotransformation von PAK erfolgt stereoselektiv in optisch aktive Produkte. Im Fall von BPDE werden vier Isomere mit zwei Enantiomeren je eines Diastereomers gebildet. In CYP450-aktiven Rattenlebermikrosomen erfolgt hauptsächlich die Bildung des (+)-7,8-Epoxids (90%), welches wiederum EH-vermittelt ins (+)-7,8-Dihydrodiol und durch anschließende erneute Oxidation in das ultimale Kanzerogen (+)-anti-Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid ((+)-BPDE) überführt wird [Conney et al., 1994 (rev.)]. Dieses überwiegend gebildete Isomer gilt auch als das hauptsächlich DNA-alkylierende sowie mutagene und Tumor-induzierende Agens.

3.5.1.3. DNA-Interaktion

Eine Vielzahl der PAK bindet nach metabolischer Aktivierung kovalent an die DNA. Besonders vicinale Hydrodiol-epoxide mit einer Bay-Region weisen eine gesteigerte Reaktivität gegenüber den DNA-Basen auf [Levin et al., 1982]. Eine Bay-Region liegt dann vor, wenn das kondensierte Ringsystem eine Bucht und somit ein sterisch gehinderte Region bildet (vgl. **Abb. 21**).

BPDE bindet kovalent an die DNA, bevorzugt an exozyklische Amino-Gruppen von Guanin und Adenin unter Ausbildung so genannter „bulky adducts“ [Peltonen et al., 1995]. Diese Addukte verursachen strukturelle Veränderungen der DNA und somit Störungen von normalen zellulären Funktionen, wie Transkription und Replikation [Friedberg et al., 1995]. Die Bindung an die DNA erfolgt über eine cis- oder trans-Addition des N^2-G (96%) oder in geringerem Ausmaß des N^6-A, N^7-G und N^3-A an die C^{10}-Position von BPDE [Cheng et al., 1989; Geacintov et al., 1997]. Dabei werden überwiegend trans-Addukte gebildet. Insbesondere DNA-Addukte mit N^7 des Guanins und N^3 des Adenins weisen eine erhöhte Instabilität auf. Sie werden entweder spontan unter Ausbildung von apurinischen / apyrimidinischen Stellen (AP Stellen) depuriniert [Ochi et al., 1986] oder resultieren in ring-geöffneten Basen (vgl. **3.2.4.1**).

Abb. 23 zeigt die Bindung des stärksten Kanzerogen (+)-anti-BPDE und schwächeren Kanzerogen (-)-anti-BPDE an Guanin-Basen.

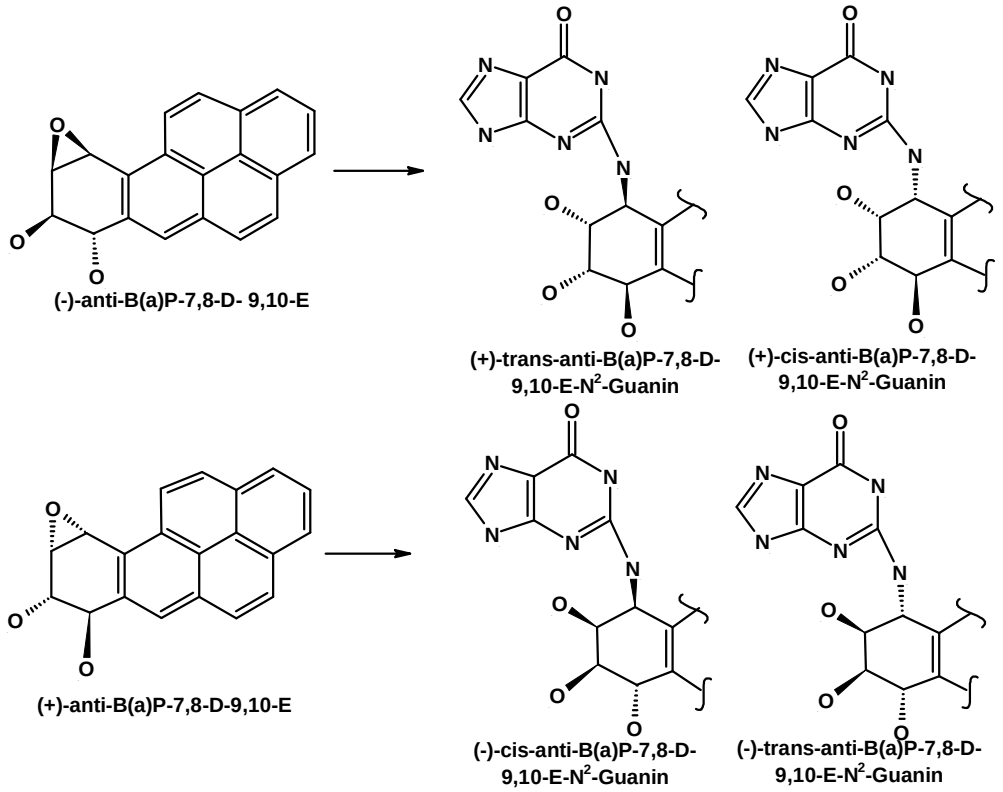


Abb. 23: Struktur der Guanin-Addukte von (-)-anti-BPDE und (+)-anti-BPDE

(+)-anti-BPDE bildet zu mehr als 90% das enatiomere Produkt (+)-trans-anti-BPDE-N^2-dG [Cheng et al., 1989]. Das Enantiomer (-)-anti-BPDE reagiert überwiegend zu (-)-trans-BPDE-N^2-dG-Addukten (63%) und in kleineren Konzentrationen zu (-)-cis-BPDE-N^2-dG-Addukten (22%) und (-)-trans-BPDE-N^6-dA-Addukten (15%) [Geacintov et al., 1997].
In einer Kurzzeitinkubation von humanen fibroblastoiden Zellen (MRC5CV1) verursachte (±)-BPDE eine deutliche Induktion von DNA-Schäden [Hanelt et al., 1997]. Diese basieren vermutlich auf Mutations-Induzierten DNA-Schäden, aus AP Stellen instabiler DNA-Addukten [Sage et al., 1984; Ochi et al., 1986] oder auf Reparaturprozessen [Speit et al., 1996]. Im Verlauf einer 24-stündigen Nachinkubation wurde eine deutliche Reduktion der DNA-Schäden im Comet Assay beobachtet [Hanelt et al., 1997]. Die Reparatur stabiler N^2-BPDE-Addukte erfolgt in *E.coli* [van Houten et al., 1990] und Säugern [Gunz et al., 1996; McLeod et al., 1991; Yang et al., 1982] durch Nucleotid Excision Repair (NER; vgl. **3.2.6.1**). Dagegen werden instabilere Addukte, wie z.B. N^7-G und N^3-A [Ochi et al., 1986] durch Base Excision Repair (BER; vgl. **3.2.4.2**) repariert [Braithwaite et al., 1998; 1999].

3.5.1.4. Mutagenität

BPDE ist sowohl in *Salmonella typhimurium* als auch in verschiedenen Zelllinien mutagen [Wood et al., 1977; Hanelt et al., 1997; Wei et al., 199; 1993]. Hierbei ist (+)-BPDE

ca. elfmal mutagener wie (-)-BPDE [Wei, et al., 1994], allerdings ist das Ausmaß der mutagenen Wirkung der gebildeten cis- oder trans-Addukte abhängig von der Art der eingesetzten Zelllinien. So sind in *E. coli* die cis-Addukte mutagener als die trans-Addukt, während in COS 7-Zellen die trans-Addukte mutagener als die cis-Addukte sind [Fernandes et al., 1998].

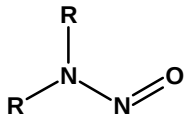
Beobachtete Mutationen mit (+)-anti-BPDE sind G→T- [Eisenstadt et al., 1982], G→A-, G→C- und A→T-Transversionen [Wei et al., 1991; 1993; Kozack et al., 1997; Dong et al., 2004], die in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration in unterschiedlicher Verteilung auftreten. In steigenden Konzentrationen nimmt der Anteil an GC→TA-Transversionen zu, während AT→CG-Transversionen seltener auftreten [Wei et al., 1991; 1993]. Mutationen durch Exon-Deletionen und frameshifts spielen eine untergeordnetere Rolle [Wei et al., 1991; 1993].

Die Entstehung von BPDE-induzierten Mutationen im Verlauf des Zellzyklus resultiert zu einem 3-fach höheren Maße aus der frühen S-Phase als aus der frühen G1-Phase. Somit ist möglicherweise die S-Phasen-Replikation verantwortlich für das Auftreten von Mutationen, da hier im Vergleich zur G-Phase nur wenige Addukte repariert werden können [Chen et al., 1990]. Des Weiteren haben BPDE-induzierte Mutationen Einfluss auf das Tumor-Suppressor-Gen p53 [Denissenko et al., 1996], welches für die globale Genom Reparatur (GGR) von NER bedeutend ist (vgl. **3.2.6.1**) [Lloyd et al., 2000]. p53 besitzt die Eigenschaft, veränderte genomische DNA zu erkennen und den Zellzyklus so lange zu stoppen, bis der Schaden repariert wurde oder der programmierte Zelltod (Apoptose) stattgefunden hat [Hartwell et al., 1995].

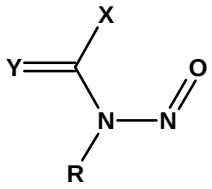
Neben der Reparatur der BPDE-induzierten DNA-Schäden sind auch die Art der betroffenen DNA-Sequenz sowie die lokale Konformation der Addukt-Stelle bedeutend für die Mutagenität [Lobanenkov et al., 1986; Rill et al., 1990; Jenström et al., 1994; Wei et al., 1995; Jelinsky et al., 1995; Huang et al., 2003].

3.6. *N*-Nitrosoverbindungen

Viele *N*-Nitrosoverbindungen sind potente Kanzerogene. Hinsichtlich ihrer Struktur und Wirkungsweise gliedern sie sich in zwei Gruppen: *N*-Nitrosamine und *N*-Nitrosamide.



Nitrosamine



Nitrosamide

Y	X	Substanzklasse
O	Alkyl, Aryl	N-Nitrosamide
O	NH_2, NHR, NR_2	N-Nitrosharnstoffe
O	RO	N-Nitrosocarbamate
NH	NH_2, NHR, NR_2	N-Nitrosoguanidine

Abb. 24: Nitrosamine und –amide [Janzowski et al., 2000]

N-Nitrosamine, denen eine Aminstruktur zugrunde liegt, sind im Allgemeinen sehr stabile Verbindungen. Nitrosierte Harnstoffe, Carbamate und Guanidine, die zur Gruppe der *N*-Nitrosamide zusammengefasst werden, sind dagegen chemisch reaktiv und unter physiologischen Bedingungen relativ instabil [Janzowski et al., 2000].

3.6.1. *N*-Nitrosamine

3.6.1.1. Entstehung und Vorkommen

N-Nitrosamine entstehen aus der Reaktion von Aminvorstufen mit nitrosierenden Spezies. Im wässrigen, sauren Milieu ist die salpetrige Säure HNO_2 die eigentliche nitrosierende Spezies (**Abb. 25**). Es wird im Sauren aus Nitritsalzen gebildet und in Nitrosoanhydrid (N_2O_3) überführt. Dieses ist bei einem pH-Wert von 2-8 das potenteste nitrosierende Agens.

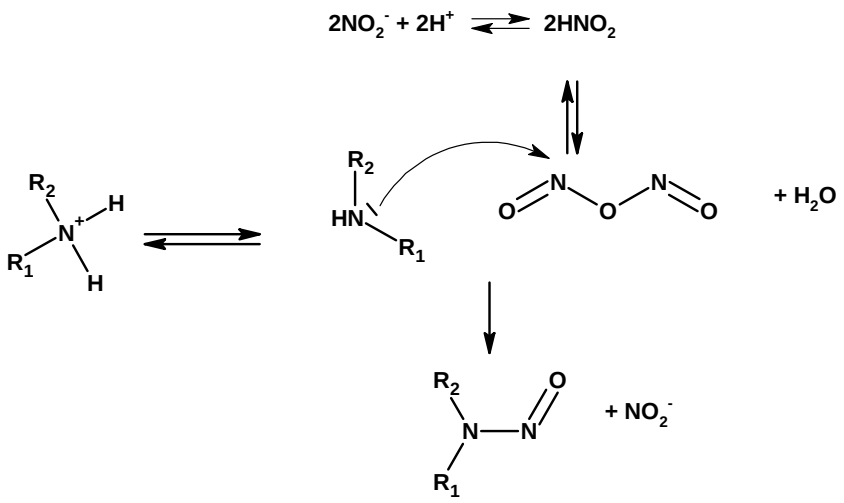


Abb. 25: Mechanismus der Nitrosierung von sekundären Aminen

Wesentlich beeinflusst wird die Geschwindigkeit der *N*-Nitrosamin-Bildung durch die Basizität des Amins und den pH-Wert der Reaktionslösung. Allgemein werden schwach basische Amine schneller nitrosiert als stärker basische. Die Nitrosierungsgeschwindigkeit mit Nitrit ist bei einem pH-Wert von 3-4 maximal [Janzowski et al., 2000]. Sekundäre Amine werden in der Regel schneller nitrosiert als tertiäre. Die Nitrosierung primärer Amine führt zur Bildung instabiler, reaktiver Diazoniumion-Intermediate, die im Wässrigen zu Alkoholen abreagieren.

Die humane Exposition setzt sich zusammen aus endogen gebildeten *N*-Nitrosaminen und deren exogenen Aufnahme z.B. über die Nahrung oder am Arbeitsplatz. Unter endogener Belastung versteht man die Bildung von *N*-Nitrosaminen im Körper durch die Reaktion nitrosierbarer Verbindungen, wie Aminen, Amiden oder Aminosäuren mit nitrosierenden Agenzien. Das nitrosierende Agens Nitrit kann hierbei aus Nitrat, das in Lebensmitteln in teils hohen Konzentrationen vorkommt, im Gastrointestinal-Trakt reduziert werden. Am Beispiel des nicht kanzerogenen *N*-Nitrosoprolins (NPRO) konnte der Mechanismus der endogenen Nitrosierung geklärt werden. Neben der chemischen Nitrosierung im Magen (saures Milieu), sind Bakterien des Verdauungstraktes an der Bildung von *N*-Nitrosaminen aus Nitrat bzw. Nitrit und Aminen beteiligt [Wagner et al., 1984; Stillwell et al., 1991].

Die exogene Exposition ist unterteilt in die verbrauchsbedingte Aufnahme von *N*-Nitrosaminen durch Lebensmittel, Tabakerzeugnisse, Kosmetika und Bedarfsgegenstände sowie eine möglicherweise berufsbedingte Exposition an Arbeitsplätzen u. a. in der Metall-, Gummi- und Lederverarbeitenden Industrie [Köhl und Eisenbrand, 2004].

3.6.1.2. Aufnahme und Verteilung

Die Aufnahme von *N*-Nitrosaminen erfolgt inhalativ, dermal oder über den Gastrointestinal-Trakt, wobei die Aufnahme erheblich zwischen den einzelnen Bereichen variieren kann. Weiterhin bedeutend ist das Auftreten endogen gebildeter *N*-Nitrosamine.
N-Nitrosamine werden rasch im Blut verteilt und unterliegen v. a. in niedrigen Konzentrationen einer schnellen Metabolisierung [Janzowski et al., 2000].

3.6.1.3. Metabolismus

Die Aktivierung erfolgt bei den meisten *N*-Nitrosaminen über metabolische Hydroxylierung in α-C-Position (**Abb. 26**), die durch CYP450-abhängige Monooxigenasen katalysiert wird. Das durch α-C-Hydroxylierung gebildete proximale Kanzerogen *N*-Nitrosoalkyl-α-hydroxyalkylamin ist instabil und zerfällt spontan unter Freisetzung eines Aldehyds. So entsteht ein hochreaktives Alkyldiazohydroxid, welches wiederum zerfällt, indem das entsprechende Diazonium-Intermediat zurückbleibt. Dieses kann anschließend mit biologischen Makromolekülen (DNA, RNA, Proteinen) unter Bildung kovalenter, teils stabiler Addukte reagieren [Bellac et al., 1996; Shu et al., 1996].

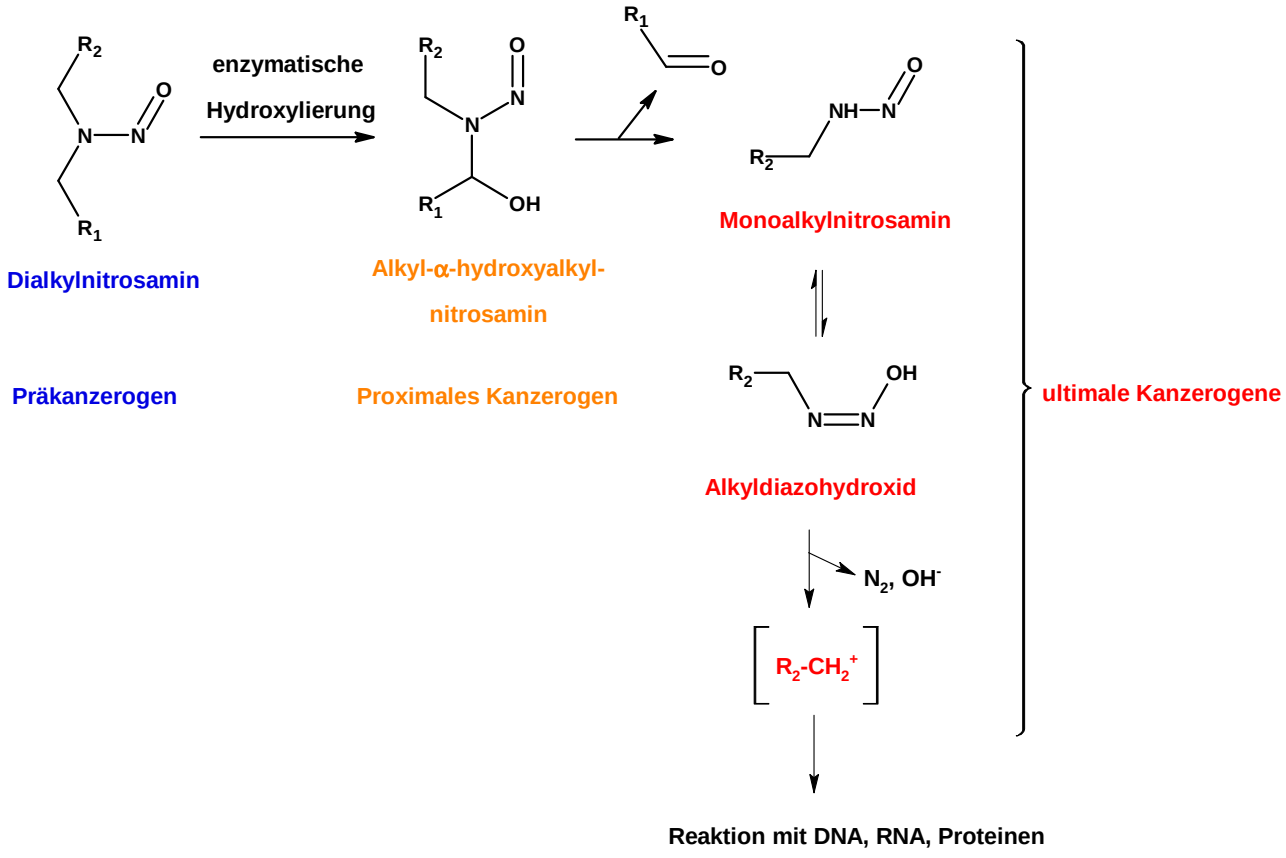


Abb. 26: Metabolische Aktivierung von *N*-Nitrosodialkylaminen [Janzowski et al., 2000]

3.6.1.4. *N*-Nitroso-diethanolamin (NDELA)

NDELA ist eine nichtflüchtige, kanzerogene *N*-Nitrosoverbindung. Es entsteht durch Nitrosierung von Di- oder Triethanolamin [Loeppky et al., 1998]. Es kommt in Kosmetikprodukten, Haushaltsreinigern, Tabakerzeugnissen, Pestiziden und vor allem in der Metall-verarbeitenden Industrie durch die Kontamination mit Kühlmitteln vor [Janzowski et al, 2000].

3.6.1.4.1. Metabolismus und Interaktion mit der DNA

NDELA wird oxidativ in aktive Intermediate überführt. Die metabolische Aktivierung kann auf zwei Wegen erfolgen. In *in-vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Oxidation sowohl in α- als auch in β-Position erfolgen kann [Loeppky et al., 2002a] (**Abb. 27**).

Durch CYP2E1-vermittelte Hydroxylierung des α-C-Atoms [Loeppky et al., 2002] wird zunächst das äußerst instabile α-Hydroxy-NDELA **1** gebildet, welches spontan in Glycolaldehyd **2** und ein hochreaktives, DNA-alkylierendes 2-Hydroxyethyl-diazoniumion **3** zerfällt [Dennehy et al., 2005].

Zum anderen kann auch eine Metabolisierung via β-C-Oxidation erfolgen. Das hierbei entstehende Aldehyd-Isomer **4** steht im Gleichgewicht mit dem zyklischen *N*-Nitroso-2-hydoxymorpholin (NHMOR) **5**, das eine direkte mutagene und genotoxische Wirkung besitzt [Loeppky et al., 1998]. Durch Alkoholdehydrogenase (ADH)-vermittelte Oxidation kann es auch zur Entstehung von *N*-Nitroso-hydroxyethylglycin (NHEG) **6** kommen [Denkel et al., 1986]. Eine Weiteroxidation von Glycolaldehyd und NHMOR führt zur Bildung von Glyoxal **7**, welches ebenfalls mit der DNA interagieren kann [Dennehy et al., 2005; Loeppky et al., 2005].

In-vivo wurde gezeigt, dass NDELA im Wesentlichen unverändert über den Urin ausgeschieden und nur zu etwa 10-20% metabolisiert wird [Farrelly et al., 1987]. Als einzigen Metaboliten fand man NHEG [Airoldi et al., 1983].

In Namalva Zellen *in-vitro* induziert NDELA 2-Hydroxyethyl-Addukte am O^6 des Guanins. Diese Addukte konnten nach Behandlung der Zellen mit dem Metabolit NHMOR nicht nachgewiesen werden [Scherer et al., 1991], welches stattdessen hauptsächlich 1,N^2-Glyoxal-Addukte mit Guanin bildet [Loeppky et al., 2002b].

In *in-vivo*-Untersuchungen an Ratten wurde auch die Induktion von N^7-Addukten am Guanin gezeigt [Farrelly et al., 1987]. Das Verhältnis zwischen N^7- und O^6-Addukten war hierbei in etwa 2:1.

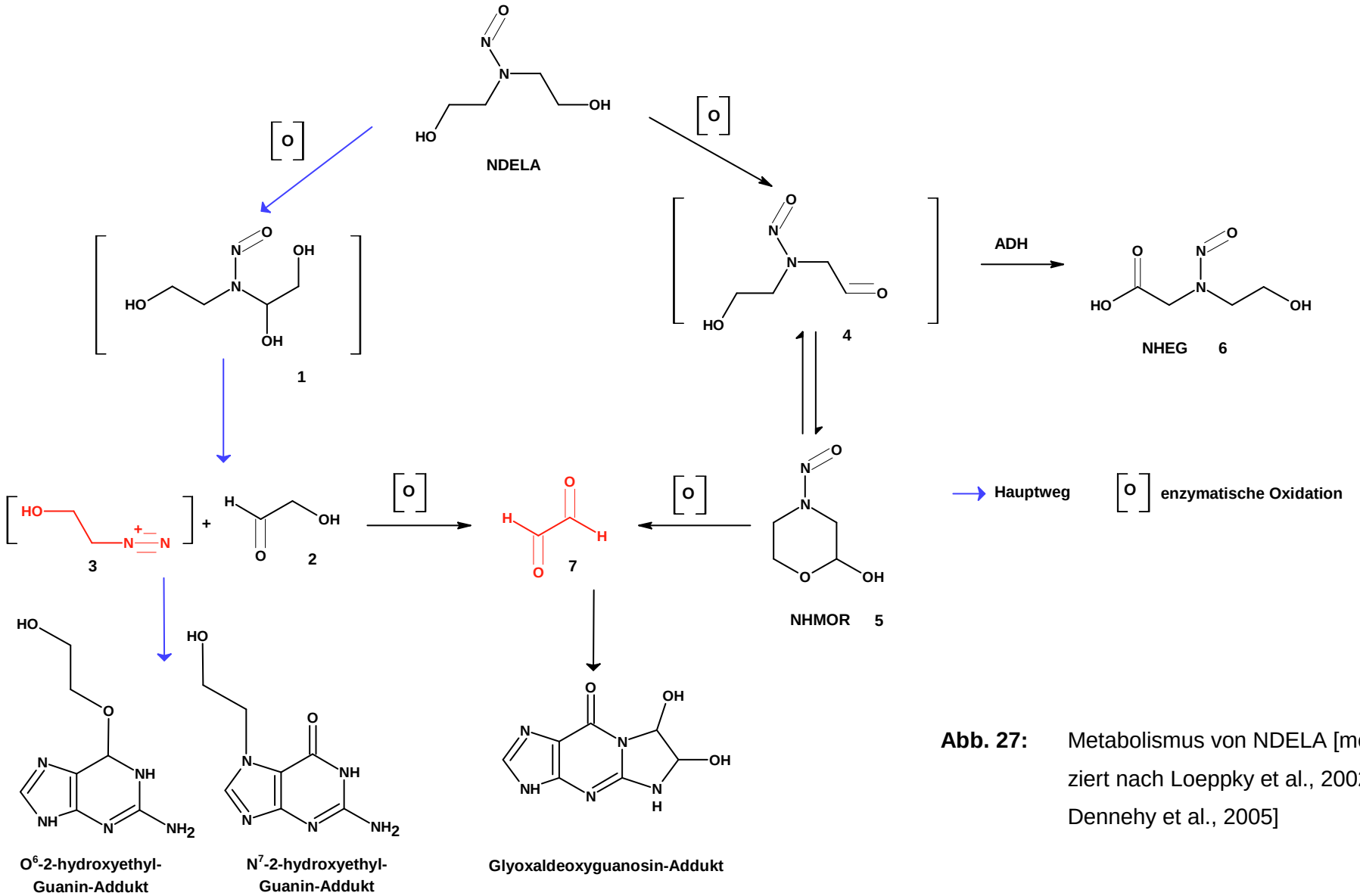


Abb. 27: Metabolismus von NDELA [modifiziert nach Loeppky et al., 2002b; Dennehy et al., 2005]

Neben der Interaktion der hochreaktiven Diazoniumionen mit den Guanin-Basen der DNA kommt auch eine mögliche Bindung an die Phosphodiester des Zucker-Phosphat-Rückgrates der DNA in Frage. Die Entstehung solcher 2-Hydroxyethyl-Phosphotriester konnte bereits mit anderen vergleichbar reaktiven Verbindungen (z. B. N-(2-hydroxyethyl)-N-nitroso-harnstoff (HENU)) gezeigt werden [Conrad et al., 1996; Müller et al., 1987]. Besonderheit dieser Addukte ist ihre extrem hohe Instabilität mit einer Halbwertszeit von unter 1min bei pH 12,5 und der damit verbundenen spontanen Entstehung von DNA-Strangbrüchen [Conrad et al., 1986; Eisenbrand et al., 1986]. Ursächlich scheint hierbei die Bildung eines instabilen Dioxaphospholanringes zu sein, der aus der DNA unter Entstehung eines Strangbruches entfernt wird. Die Umformung dieser Addukte in DNA-Strangbrüche ist in **Abb. 28** schematisch dargestellt.

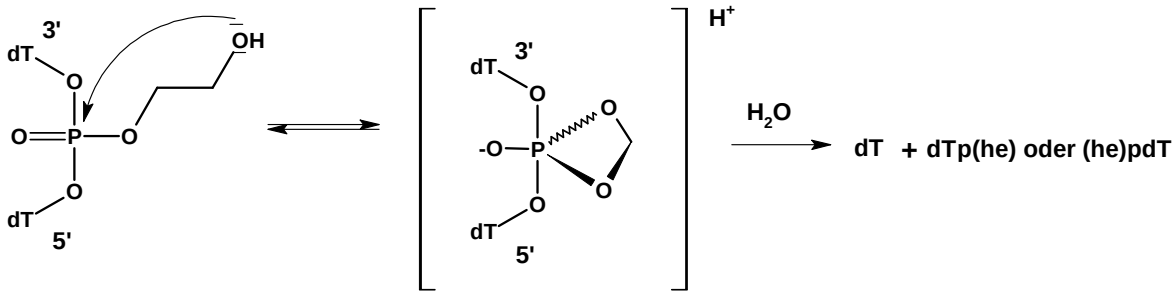


Abb. 28: Umwandlung eines 2-Hydroxyethyl-Phosphotriesters in einen DNA-Strangbruch (dTP(he): (2'-Deoxythymidin)-3'-(2-hydroxyethyl)-phosphat; (he)pdT: (2'-Deoxythymidin)-5'-(2-hydroxyethyl)-phosphat) [Müller et al., 1987].

3.6.1.4.2. Toxizität

Die akute Toxizität von NDELA ist im Vergleich zu anderen *N*-Nitrosaminen mit einem LD_{50} von >7500 mg/kg (Ratte) relativ gering [Janzowski et al., 2000].

NDELA induziert nach *p.o.* Administration über das Trinkwasser an Ratten und syrischen Hamster hepatozelluläre Karzinome und Adenome und Blastome in den Nasenhöhlen [Preussmann et al., 1982; Hilfrich et al., 1978]. NDELA ist dagegen negativ in Mutagenitäts-Assays, wie dem Ames-Test an *Salmonella typhimurium* mit und ohne Aktivierung [Rao et al., 1979; Gilbert et al., 1979, Lee et al., 1979; Lijinsky et al., 1983]. Allerdings waren die NDELA-Metabolite NHMOR, NHEG und Glycolaldehyd mutagen in *Salmonella typhimurium* TA 100 [Denkel et al., 1986]. Die Induktion von DNA-Strangbrüchen (ESB) durch NDELA wurde sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* belegt. In primären Rattenhepatozyten *in-vitro* induzieren NDELA [Schmezer et al., 1987] und NHMOR ESB [Denkel et al., 1986], während NHEG in diesem Testsystem inaktiv ist [Denkel et al., 1986]. Vergleich-

bare Effekte wurden auch in der Leber von Ratten nach oraler Applikation beobachtet [Denkel et al., 1986; Sterzel et al., 1986; Preat et al., 1987].

Der Einfluss der Alkoholdehydrogenase (ADH) auf die metabolische Aktivierung von NDELA konnte durch deren Inhibition mittels Ethanol gezeigt werden. So war die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch NDELA nach Inhibition komplett unterdrückt, wohingegen die Aktivität von NHMOR nur leicht beeinflusst wurde [Denkel et al., 1987].

Des Weiteren zeigte NDELA in 2E1-transfizierten V79 Zellen cytotoxische und mutagene Eigenschaften [Janzowski et al., 1996]. Dies unterstützt die Vermutung einer möglichen Beteiligung von CYP2E1 an der Metabolisierung von NDELA.

In humanen Lymphozyten *in-vitro* induziert NDELA dosisabhängig Chromosomen-Abberationen, Schwester-Chromatid-Austausch-Ereignisse (SCE), Mikrokerne mit und ohne Aktivierung [Dittberner et al., 1988; Henn et al., 1989] sowie ESB [Kleinsasser et al., 2000]. Dahingegen induziert NDELA in Namalva Zellen *in-vitro* keine ESB. Dies war nur durch Behandlung der Zellen mit den aktiven Metaboliten zu beobachten [Scherer et al., 1991].

3.6.1.4.3. α-Acetoxy-NDELA

Bei α-Acetoxy-NDELA handelt es sich um eine synthetisch hergestellte, aktive Form von NDELA. Es handelt sich um eine stabilisierte Vorläuferverbindung des instabilen NDELA-Intermediates α-Hydroxy-NDELA. Die Synthese erfolgt aus NHMOR [Dennehy et al., 2004; Park et al., 1998].

Die Aktivierung von α-Acetoxy-NDELA erfolgt nicht-enzymatisch mittels Hydrolyse zunächst in α-Hydroxy-NDELA unter Abspaltung der Acetyl-Gruppe. Dieses, auch während der α-Hydroxylierung von NDELA gebildete instabile Zwischenprodukt, zerfällt im Anschluss spontan in Glycolaldehyd und ein hochreaktives, DNA-alkylierendes 2-Hydroxyethyl-Diazoniumion [Dennehy et al., 2005; Loeppky et al., 2005] (**Abb. 29**).

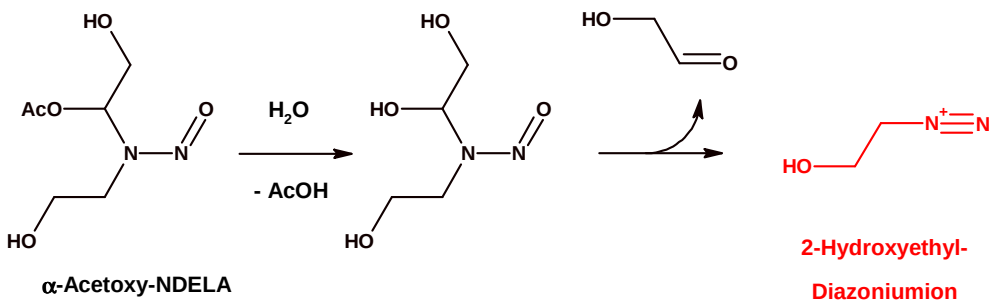
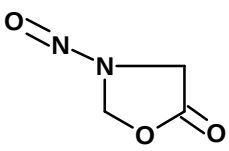


Abb. 29: Hydrolyse von α-Acetoxy-NDELA [modifiziert nach Park et al., 1998]

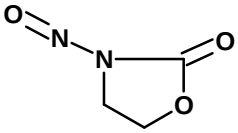
Wie bei NDELA ist auch hier eine Interaktion des reaktiven Diazoniumions mit den Guanin Basen der DNA an den Positionen O^6 und N^7 sowie eine 2-Hydroxyethylierung des Zucker-Phosphat-Rückgrates zu vermuten. Da das gebildete Glycolaldehyd nur unter enzymatischer Katalyse zum Glyoxal überführt werden kann, kann die Bildung von 1,N^2-Glyoxal-Addukten mit Guanin weitgehend ausgeschlossen werden.

3.6.1.5. *N*-Nitroso-oxazolidinone

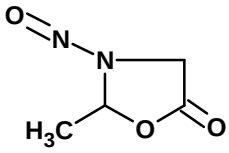
Die in dieser Arbeit verwendeten *N*-Nitroso-oxazolidinone sind in **Abb. 30** dargestellt.



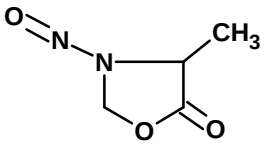
3-Nitrosooxazolidin-5-on



3-Nitrosooxazolidin-2-on



2-Methyl-3-nitroso-oxazolidin-5-on



4-Methyl-3-nitroso-oxazolidin-5-on

Abb. 30: *N*-Nitroso-oxazolidinone

3.6.1.5.1. Mögliche Entstehung und Vorkommen

Für einige *N*-Nitroso-oxazolidinone (z.B. *N*-Nitroso-oxazolidin-5-on (NOZ-5) sowie die beiden methylierten Analoga) kann eine endogene Bildung durch Nitrosierung (s. **3.6.1.5.2**) primärer Amine und Aminosäuren in der Anwesenheit von Aldehyden angenommen werden.

Über die Nahrung werden Aminosäuren und Aldehyde aufgenommen. Formell gesehen ist die Aminogruppe von Aminosäuren ein primäres Amin. Die Reaktion von Aminen mit Aldehyden führt zur Bildung von Iminen (vgl. **Abb. 31**).

Unter physiologischen Bedingungen liegen die meisten Aminosäuren und Amine protoniert mit einem pKa >10 vor. Dagegen können Imine als freie Base mit einem pKa <7 existieren.

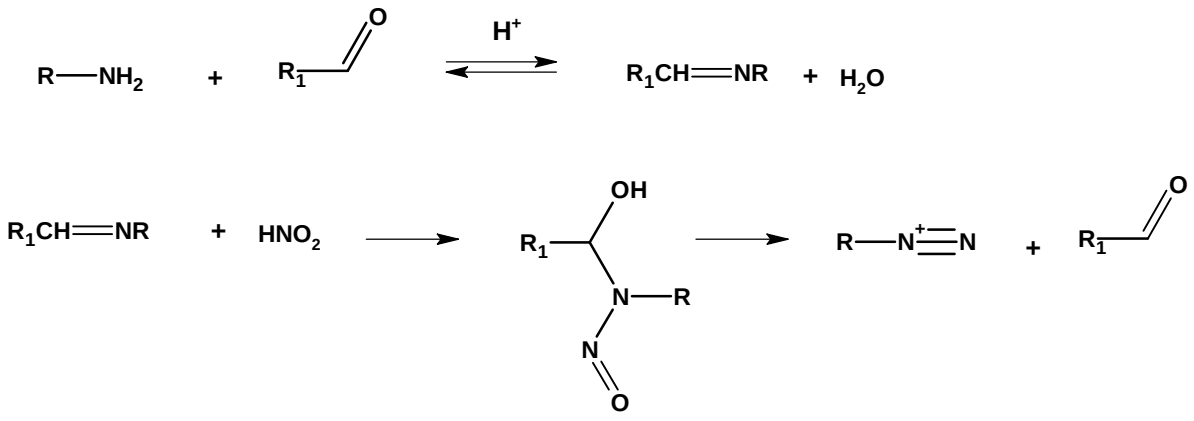


Abb. 31: Nitrosierung primärer Amine in der Anwesenheit von Aldehyden

Verbindungen mit einem protonierten Stickstoff-Atom sind nicht reaktiv gegenüber nitrosierenden Verbindungen. Folglich werden Imine bei gleichem pH-Wert deutlich schneller nitrosiert als Amine und Aminosäuren (vgl. **Abb. 31**). Es wird angenommen, dass es durch die Nitrosierung eines Imins einer Aminosäure im Magen zur Ausbildung reaktiver *N*-Nitroso-oxazolidinone kommen kann (vgl. **Abb. 32**) [Loeppky, persönliche Mitteilung].

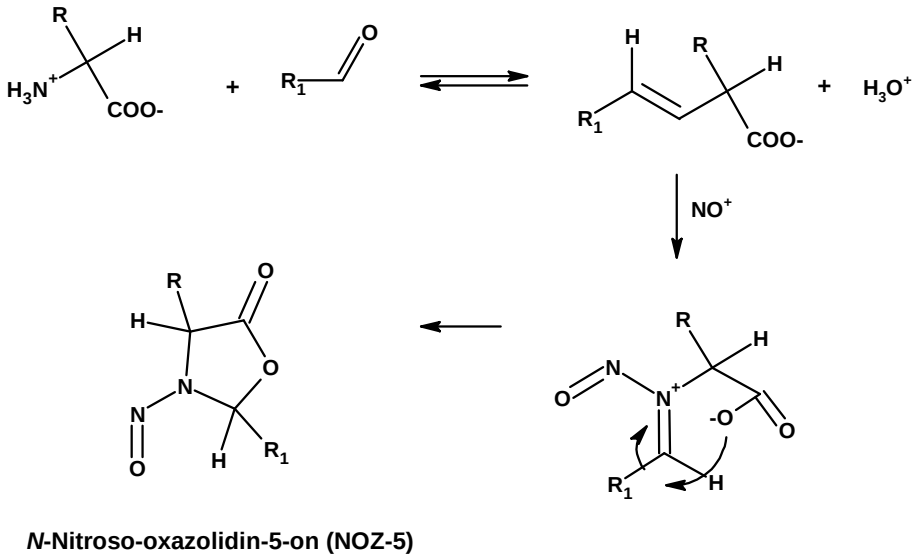


Abb. 32: Bildung von *N*-Nitroso-oxazolidin-5-on

N-Nitroso-oxazolidin-2-on (NOZ-2) wurde als Referenzverbindung zu NOZ-5 untersucht. Die endogene Bildung von NOZ-2 ist unwahrscheinlich. In *Salmonella typhimurium* ist NOZ-2 als mutagen beschrieben. Im Nagermodell ist NOZ-2 potent kanzerogen mit den Zielorganen Leber und Vormagen [Lijinsky 1983, 1992; Mirvish et al., 1988].

3.6.1.5.2. Endogene Nitrosierung

Die endogene Transformation von Aminen in nitrosierte Derivate ist ein gut untersuchtes Phänomen in Versuchstieren und Mensch und ist wesentlich mit der Aufnahme von Nitrat über die Nahrung (hauptsächlich über Gemüse und Gemüseprodukte) und dessen endogener Reduktion zu Nitrit verbunden. Etwa 25 % des resorbierten Nitrats werden aktiv in den Speichel sezerniert, bis zu 7% in der Mundhöhle, überwiegend durch mikrobielle Reduktasen innerhalb von 24 h zu Nitrit reduziert und mit dem Speichel in den Magen transportiert. Etwa 90% des Nitrits im Magen resultieren aus der Reduktion von Nitrat [Mirvish et al., 1994]. Die Überführung sekundärer Amine in *N*-Nitrosoverbindungen konnte anhand einer Coadministration von sekundären Aminen und Nitrit an Ratten erstmals 1969 durch Sander und Bürkle nachgewiesen werden. Im Menschen wurde dieser Mechanismus durch die Identifizierung von *N*-Nitrosoprolins (NPRO) als Metabolit im Urin gezeigt [Oshima et al., 1981]. Trotz vieler Indizien, die für die endogene Nitrosierung von Aminen z. B. im Magen sprechen, ist die Identifizierung der dabei gebildeten *N*-Nitrosamine aufgrund deren schnellen Metabolisierung schwierig. Neben dem Nachweis von Urin-Metaboliten ist u. a. die Identifizierung von DNA-Addukten von reaktiven Intermediaten dieser *N*-Nitrosamine eine geeignete Möglichkeit zur Bestätigung von deren Entstehung. Shuker et al. [1997] zeigten, dass die menschliche DNA O^6-carboxymethylierte bzw. O^6-methylierte Guanin-Basen enthält. Die dafür verantwortlichen alkylierenden Agentien entstammen der einfachsten Aminosäure Glycin nach deren möglicherweise endogenen Nitrosierung. Ebenfalls fand man heraus, dass O^6-Carboxymethyl-Guanin-Addukte im Gegensatz zu methylierten O^6-Guanin-Addukten von bakterieller oder Säuger-O^6-Alkylguanin-Alkyltransferase nicht repariert werden. *In-vitro* wiesen Harrison et al. [1999] O^6-Carboxymethyl- sowie O^6-Methyl-Guanin-Addukten in einem Verhältnis von 10:1 nach Inkubation von Kalbsthymus-DNA mit nitrosierten Glycin-Derivaten nach. In einer Verzehrsstudie an männlichen Probanden, die über einen Zeitraum von 43 Tagen eine fleischreiche Diät zu sich nahmen, wurden ebenfalls die genannten Addukte im Blut nachgewiesen [Cupid et al., 2004]. Des Weiteren wurde Diazoacetat als reaktives Zwischenprodukt der Metabolisierung *in-vitro* nachgewiesen. Man vermutete, ausgehend von diesem Intermediat, die Bildung von Diazomethan sowie von Carboxymethyl-Diazoniumionen, die beide mit der DNA unter Ausbildung von DNA-Addukten interagieren. In HT29 Zellen *in-vitro* konnte durch Inkubation mit Diazoacetat ebenfalls die Entstehung von O^6-Carboxymethyl-Guanin-Addukten gezeigt werden [Lewin et al., 2006]. Die mögliche Entstehung von Diazomethan aus Diazoacetat erklärt möglicherweise auch die bereits von Shuker et al. [1997] nachgewiesene Bildung von O^6-Methyl-Guanin-Addukten.

Zur Klärung eines möglichen Zusammenhangs von endogener Nitrosierung durch den Konsum an rotem Fleischs und der Entstehung von Kolonkrebs wurde eine Verzehrstudie mit Probanden über 21 Tage durchgeführt. Diese nahmen in dieser Zeit im Gegensatz zu einer vegetarischen Kontrollgruppe hohe Mengen an rotem Fleisch zu sich. Es gelang, eine signifikant erhöhte endogene Bildung von *N*-Nitrosoverbindungen (ATNC; apparent total nitroso-compounds) durch den Verzehr von rotem Fleisch nachzuweisen. Ferner fand man O^6-Carboxymethyl-Guanin-Addukte im Fäces [Lewin et al., 2006].

3.6.1.5.3. Metabolismus und Interaktion mit der DNA

N-Nitroso-oxazolidinone werden vermutlich mittels hydrolytischer Ringöffnung an den rot markierten Positionen in reaktive, DNA-alkylierende Intermediate (**Abb. 33**) überführt. Die Hydrolyse der *N*-Nitroso-oxazolidinone verläuft schnell mit Halbwertszeiten von wenigen Minuten [Loeppky, persönliche Mitteilung].

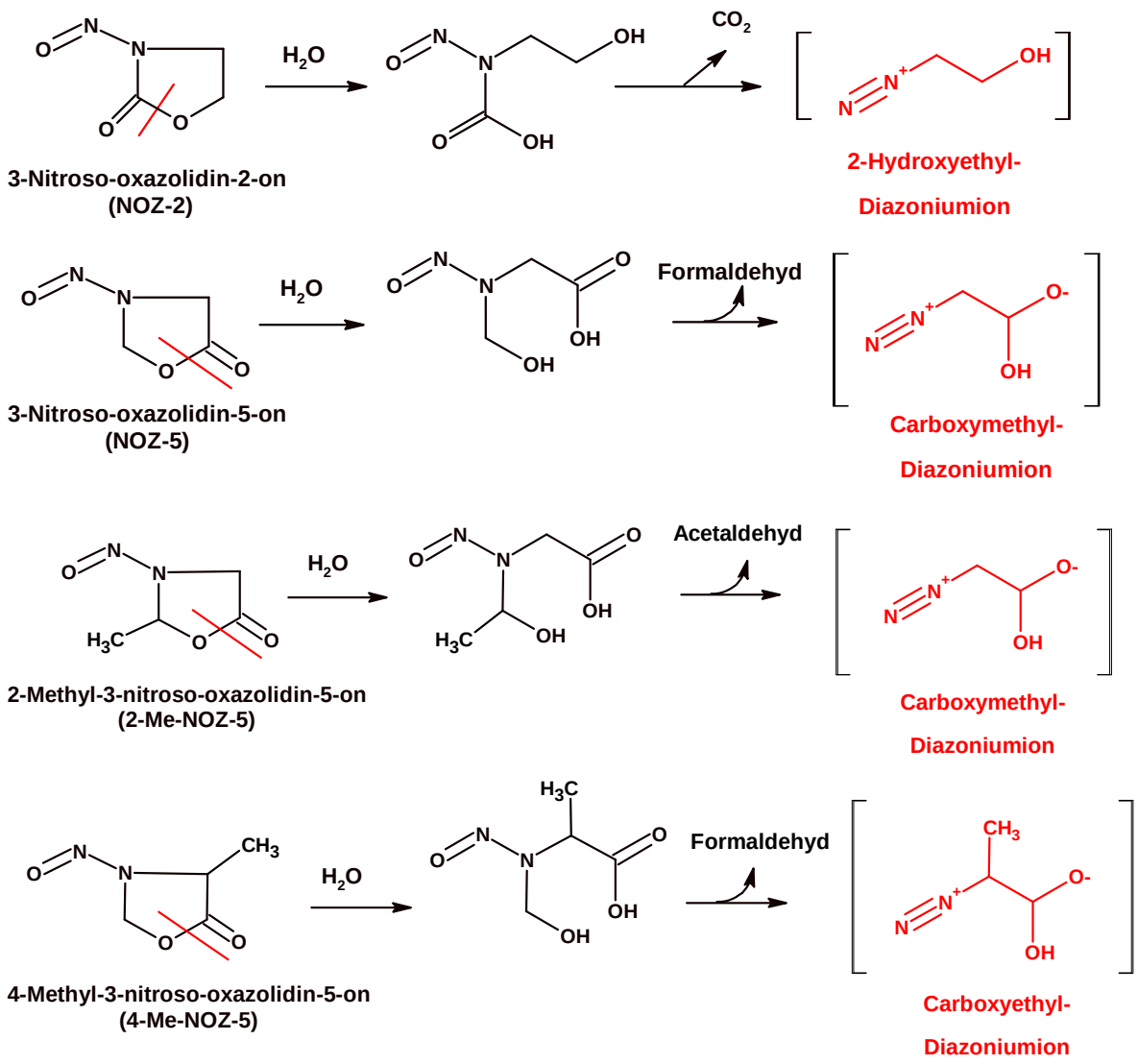


Abb. 33: Aktivierung von *N*-Nitroso-oxazolidinonen durch Hydrolyse

Durch Hydrolyse von NOZ-2 wird vermutlich, wie im Fall von NDELA (vgl. **3.6.1.4**), ein 2-Hydroxyethyl-Diazoniumion gebildet. Es kann angenommen werden, dass NOZ-2 wie NDELA die DNA an den Positionen O^6- und N^7-Guanin sowie an den Phosphodiestern des Zucker-Phosphat-Strangs unter Ausbildung instabiler Phosphotriester alkyliert.

Die hydrolytische Aktivierung von NOZ-5 sowie dessen 2-methyliertes Analogon 2-Me-NOZ-5 ist über 2 verschiedene Reaktionswege postulierbar. Wie unter **Abb. 33** dargestellt, ist eine Ringöffnung mit anschließender Abspaltung von Form- bzw. Acetaldehyd in ein DNA-alkylierendes Carboxymethyl-Diazoniumion postulierbar. In Analogie zu der von Cupid et al. [2004] beschriebenen Aktivierung von nitrosiertem Glycin (vgl. **3.6.1.5.2**) kann auch für diese beiden Verbindungen die Bildung von Diazoacetat als Zwischenprodukt angenommen werden. Ausgehend hiervon wäre dann die Entstehung eines Carboxymethyl-Diazoniumions sowie eine mögliche Umwandlung von Diazoacetat in Diazomethan denkbar (**Abb. 34**).

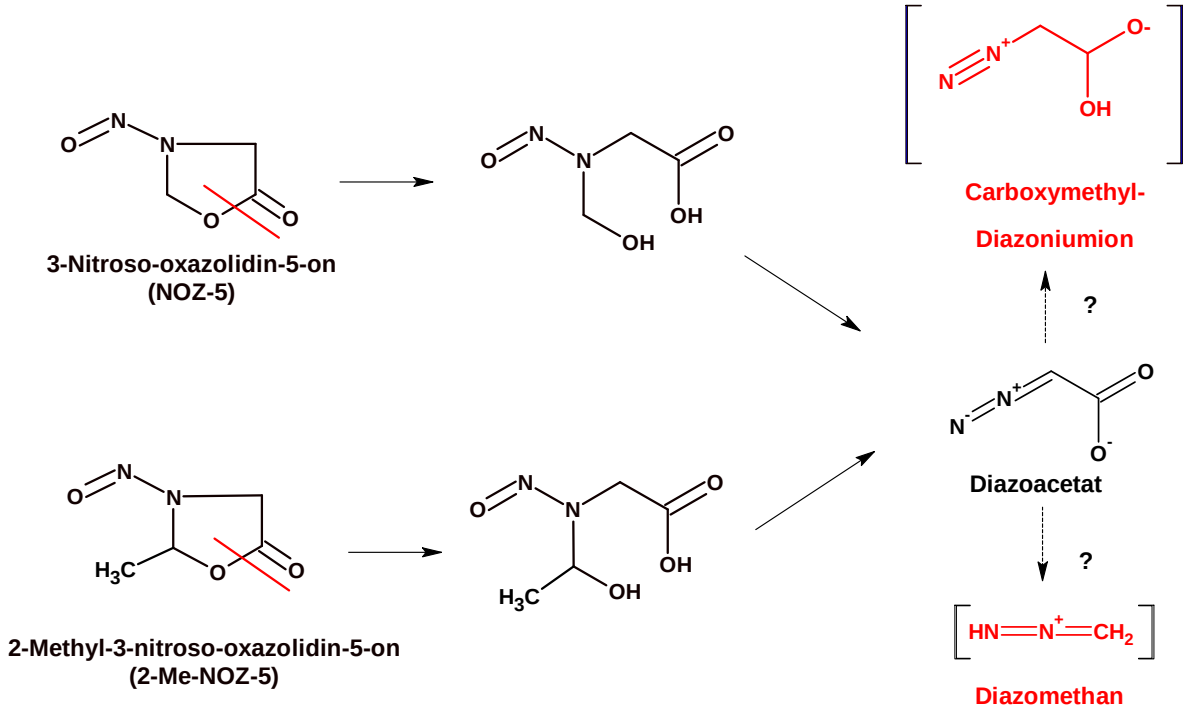


Abb. 34: alternative Aktivierung von NOZ-5 und 2-Me-NOZ-5

Die Carboxymethylierung der DNA kann an verschiedenen Stellen erfolgen. Neben der bereits beschriebenen Position O^6-Guanin besteht auch wie bei anderen ebenfalls DNA-carboxymethylierenden Verbindungen (z.B. Azaserin oder N-Nitrosocholylglycin) die Möglichkeit zur Interaktion mit N^7-Guanin und N^3-Adenin [Harrison et al., 1997; Shuker et al., 1997; Zurlo et al., 1982] unter Ausbildung instabiler DNA-Addukte. Die ebenfalls mögliche Methylierung der DNA erfolgt aller Voraussicht nach konkurrierend mit der Carboxymethylierung an den hierfür beschriebenen Positionen. Neben der Interaktion mit den

DNA-Basen ist des Weiteren die Bindung der methylierenden / carboxymethylierenden Intermediate an die Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats unter Ausbildung von Phosphotriestern denkbar. Methyl-Phosphotriester verbleiben stabil in der DNA und führen nicht wie die 2-hydroxyethylierten Analoga zu DNA-Strangbrüchen [Conrad et al., 1996; Müller et al., 1987]. Die Stabilität möglicher Carboxymethyl-Phosphotriester ist in der Literatur nicht beschrieben.

Die Hydrolyse von 4-Me-NOZ-5 (**Abb. 33**) führt vermutlich zur Bildung eines Carboxyethyl-Diazoniumions als DNA-alkylierendem Agens. Für andere carboxyethylierende Verbindungen (z. B. β-Propiolacton oder 1-Nitroso-5,6-dihydrouracil) ist eine Interaktion mit der DNA beschrieben. Bei der Reaktion von β-Propiolacton mit Kalbsthymus-DNA *in-vitro* konnten 1-(2-Carboxyethyl)-Adenin, 3-(2-Carboxy-ethyl)-Thymin, 3-(2-Carboxyethyl)-Cytosin sowie 7-(2-Carboxyethyl)-Guanin als hauptsächliches DNA-Addukt nachgewiesen werden [Segal et al., 1981]. Die überwiegende Bildung von N^7-Addukten des Guanins nach Interaktion mit carboxyethylierenden Agentien wurde sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* nach Behandlung mit 1-Nitroso-5,6-dihydrouracil bestätigt [Mirvish et al., 1985].

3.6.1.6. N-(3,3-dimethylbutyl)-L-α-aspartyl-L-phenylalanin (NAPA)

N-(3,3-dimethylbutyl)-L-α-aspartyl-L-phenylalanin (NAPA; **Abb. 35**) ist ein Derivat des Dipeptids Phenylalanin und Asparaginsäure mit der 7.000-13.000-fachen Süßkraft der Saccharose. Nach Angaben der FDA [2002] liegt die geschätzte tägliche Aufnahme (EDI; estimated daily intake) bei 0,1 mg/kg KG/Tag für Erwachsene bzw. 0,17 mg/kg KG/Tag für Kleinkinder bis 5 Jahre. JECFA legte 2003 den ADI (acceptable daily intake) auf 2 mg/kg KG/Tag fest.

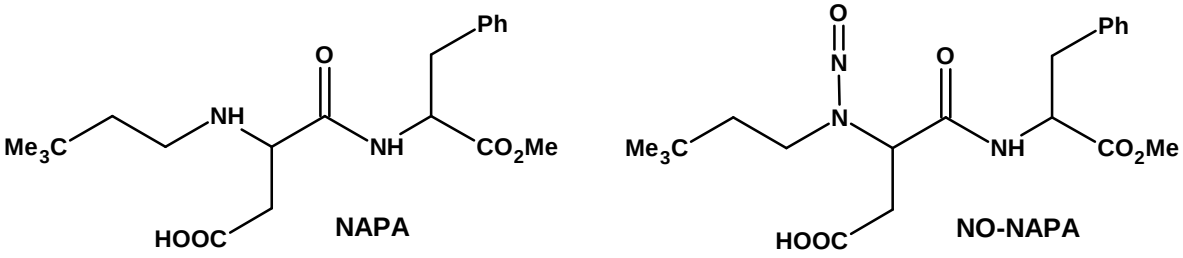


Abb. 35: Struktur von NAPA und NO-NAPA

NAPA wird teilweise im Dünndarm resorbiert. Der erste Schritt der anschließenden Metabolisierung ist eine schnelle Esterspaltung durch Esterasen. Der hierbei entstehende Metabolit wird schnell aus dem Plasma entfernt und über Galle oder Urin ausgeschieden. In Tierversuchsstudien an Ratten, Mäusen und Hunden, in denen teilweise die 100-fache Konzentration des ADI appliziert wurden, wurden keine neurotoxischen, akut-toxische,

subchronische, reproduktionstoxischen oder kanzerogene Effekte durch NAPA festgestellt. Auch in Humanstudien (Kurz- und Langzeitexposition) waren durch NAPA keine signifikanten Effekte detektierbar. NAPA zeigte hier ferner keine Effekte auf Glucose- oder Insulin-Spiegel im Plasma [FDA, 2002].

Die sekundäre Amin-Struktur von NAPA lässt vermuten, dass es möglicherweise zu einer metabolischen Bildung eines *N*-Nitrosamins aus NAPA kommen kann. Diese Nitrosierung zu *N*-Nitroso-NAPA (NO-NAPA) könnte sowohl endogen durch nitrosierende Spezies im Gastrointestinal-Trakt, als auch in verschiedenen Lebensmitteln erfolgen.

3.6.2. *N*-Nitrosamide

N-Nitrosamide sind im Gegensatz zu *N*-Nitrosaminen deutlich instabiler. Ihre Aktivierung in DNA- bzw. Phosphatrückgrat-alkylierende Agentien verläuft durch spontanen Zerfall ohne Enzymbeteiligung.

3.6.2.1. *N*-Nitrosoharnstoffe

Als Vertreter der *N*-Nitrosoharnstoffe wurden 1-Methyl-1-nitrosoharnstoff (MNU) und 1-(2-Hydroxyethyl)-1-nitrosoharnstoff (HENU) untersucht.

Beide Verbindungen werden spontan durch Hydrolyse in alkylierende Agentien überführt, die leicht mit nukleophilen Zentren der DNA interagieren.

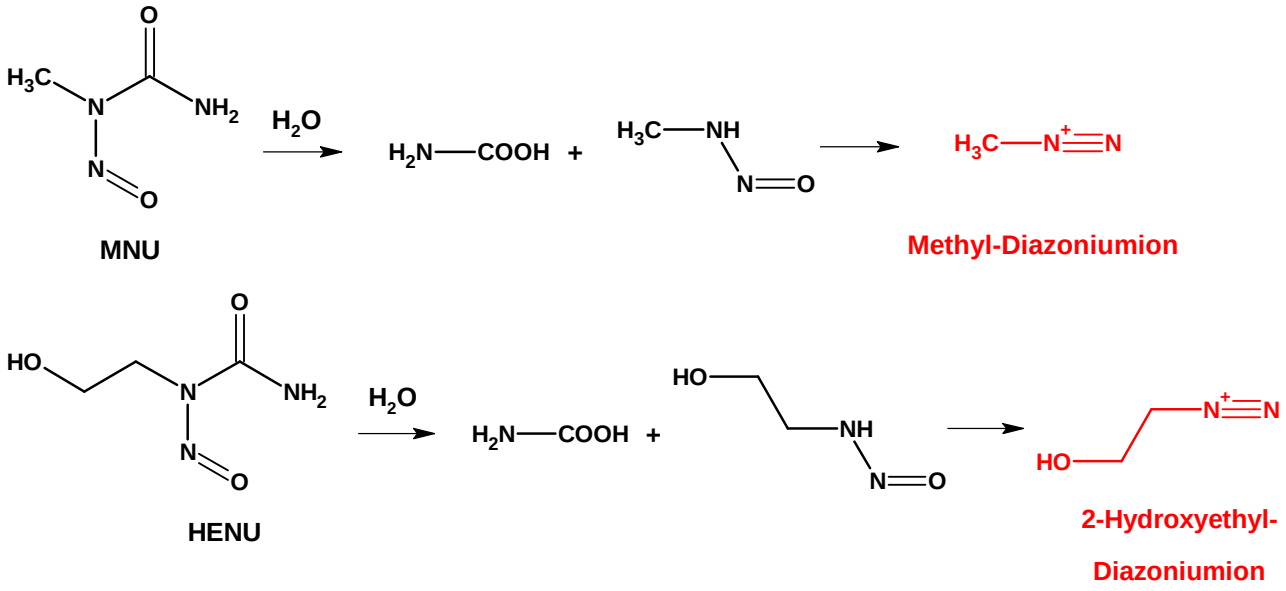


Abb. 36: Aktivierung von MNU und HENU

MNU zerfällt spontan in ein Methyl-Diazoniumion, welches DNA-Basen *in-vitro* und *in-vivo* alkyliert [Smith et al., 1988; Wurdeman et al., 1989; Fong et al., 1990]. Als haupt-

sächliches DNA-Addukt (ca. 66%) tritt hierbei das N^7-Methyl-Guanin auf [Beranek et al., 1980; Wurdeman et al., 1989]. Eine DNA-Adduktbildung am O^6 des Guanins wurde ebenfalls beobachtet. Trotz des geringen Anteils am von MNU induzierten DNA-Addukt-Spektrum von etwa 10%, werden diese Läsionen für die mutagene Wirkung von MNU verantwortlich gemacht. Weitere DNA-Addukte sind mit der N^3-Position von Guanin und Adenin beschrieben [Beranek et al., 1980; Kelly et al., 1998]. Letztere sind wie die DNA-Addukte am N^7-Guanin instabil und führen spontan zu AP Stellen.

HENU zerfällt wie das bereits beschriebene *N*-Nitrosamin NDELA durch Hydrolyse in ein DNA-alkylierendes 2-Hydroxyethyl-Diazoniumion. Diese reaktiven Zwischenprodukte interagieren mit der DNA vornehmlich an den Positionen N^7 und O^6 von Guanin.

Für beide Verbindungen ist weiterhin eine Interaktion mit den Phosphat-Gruppen des DNA-Rückgrates beschrieben (12-17%) [Conrad et al., 1986; Müller et al., 1987; Beranek et al., 1990]. Ein bedeutender Unterschied liegt allerdings in der Stabilität der daraus resultierenden Phosphotriester. Während die durch MNU induzierten Methyl-Phosphotriester äußerst stabil sind, zerfallen die von HENU erzeugten 2-Hydroxyethyl-Phosphotriester unter den gewählten Bedingungen innerhalb kurzer Zeit in DNA-Strangbrüche [Conrad et al., 1986; Müller et al., 1987].

3.6.2.2. *N*-Nitrosoguanidine (*N*-Methyl-N'-Nitro-N-nitrosoguanidin; MNNG)

Das potent kanzerogene *N*-Methyl-N'-Nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) wird durch Interaktion mit dem Tripeptid Glutathion (GSH) sowohl metabolisch aktiviert, als auch entgiftet.

Der Einfluss von Thiol-Gruppen auf die Aktivierung von MNNG konnte erstmals von Lawley et al. [1970] gezeigt werden. Durch Inkubation mit Sulfhydryl (SH)-aktiven Verbindungen zeigte sich eine erhöhte DNA-Adduktbildung an den Positionen N^7-Guanin, N^3-Adenin sowie in geringeren Anteilen O^6-Guanin. In weiteren Studien wurde dies bestätigt. Sedwick et al. [1980] zeigten, dass ein geringer Thiol-Gehalt *in-vitro* die Mutagenität von MNNG deutlich verringert. Romert et al. [1987] untersuchten den Einfluss von extra- bzw. intrazellulärem Thiol auf die Mutagenität von MNNG in V79 Zellen. Eine Vorbehandlung der Zellen mit N-Acetylcystein, Cystein oder GSH steigerte die mutagene Wirkung von MNNG deutlich. Einen gegenteiligen Effekt stellte man durch Co-Inkubation von Thiolen und MNNG fest. Dies bewirkte eine deutliche Abnahme der Mutagenität von MNNG. Eine Depletion von GSH durch BSO führte ebenfalls zu einer geringeren mutagenen Aktivität. Als Ursache sah man u. a. die die Bildung von Methyldiazohydroxid im Rahmen einer Deaminierung, das vermutlich über ein Methyl-Diazoniumion mit Nukleophilen reagiert (**Abb. 37**).

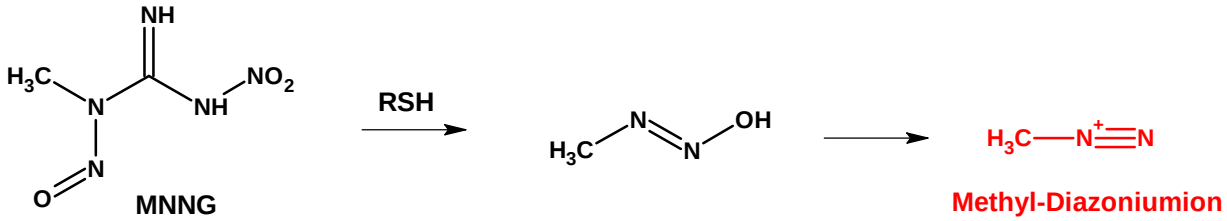


Abb. 37: Deaminierung von MNNG

Wie bereits beschrieben, bildet 1-Methyl-1-nitrosoharnstoff (MNU) zwar das gleiche reaktive Intermediat wie MNNG, die Aktivierung erfolgt hier allerdings nicht über SH-Gruppen [Wheeler et al., 1972], sondern OH^--katalysiert. Beide Verbindungen unterscheiden sich also deutlich in ihrer Stabilität in Wasser sowie ihrer Reaktivität gegenüber SH-Gruppen. Das bei diesen Reaktionen gebildete Methyldiazohydroxid hat eine geringe Selektivität, aber auch hohe Reaktivität gegenüber Nukleophilen. Die geringe Mutagenität von MNNG nach Co-Inkubation mit Thiolen [Romert et al., 1987], also der damit verbundene hohe extrazelluläre GSH-Spiegels bei Anwesenheit von MNNG, lässt die *N*-Nitrosoverbindung also möglicherweise bereits außerhalb der Zelle in das reaktive Intermediat zerfallen, welches dann wiederum bereits vor Erreichen der DNA mit zellulären Bestandteilen reagieren kann. Im Gegensatz dazu, bewirkt eine Erhöhung des intrazellulären GSH-Levels durch Vorbehandlung mit Thiolen eine Aktivierung von MNNG in direkter Nachbarschaft zur DNA. Die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion der hochreaktiven Intermediate mit der DNA ist damit bedeutend größer [Romert et al., 1987].

Neben den von Lawley [1970] nachgewiesenen DNA-Addukten von MNNG an den Positionen N^7-Guanin (67%), N^3-Adenin (12%) sowie O^6-Guanin (7%) interagiert MNNG mit den Phosphat-Gruppen des Zuckerphosphatrückgrats der DNA (12-17%) [Beranek et al., 1990]. Die entstehenden Methyl-Phosphotriester sind vergleichbar den durch MNU induzierten äußerst stabil.

Neben der SH-Gruppen-abhängigen Aktivierung von MNNG wurde auch eine Detoxifizierung durch Thiole beobachtet (Denitrosierung). So fand man nach oraler Gabe von MNNG an Ratten 90% der eingesetzten Dosis als den denitrosierten Metabolit 1-Methyl-2-nitroso-guanidin (MNG) im Urin [Kawachi et al., 1970]. Jensen et al. [1987] bestätigten die Zersetzung von MNNG sowie dessen Denitrosierung in humanem Blut. Ursache für die Denitrosierung ist, dass es neben dem Angriff von SH-Gruppen im Blut am Guanidin-C-Atom (Deaminierung unter Bildung von reaktiven methylierenden Agentien) auch zur Interaktion mit dem Nitroso-Stickstoff kommen kann, was die Entfernung der Nitroso-Gruppe und somit eine Deaktivierung von MNNG zur Folge hat [Jensen et al., 1990; Santala et al., 1992].

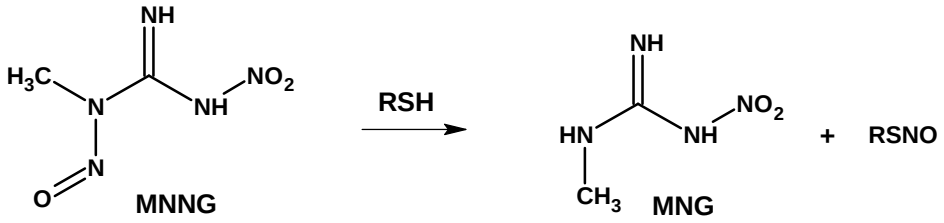


Abb. 38: Denitrosierung von MNNG

Im Gegensatz zur nicht-enzymatischen Giftung verläuft diese Reaktion GST-katalysiert [Jensen et al., 1990]. Ob MNNG nun bevorzugt deaminiert oder denitrosiert wird, hängt also entscheidend davon ab, ob GSH frei oder an die aktive Stelle von GST gebunden vorliegt [Jensen et al., 1990; Santala et al., 1992].

MNNG induziert DNA-Strangbrüche in V79 Zellen [Slamenova et al., 1997] und isolierten humanen Lymphozyten [Kleinsasser et al., 2000]. Unter Verwendung des Comet Assays bei pH 12,1 (vgl. **3.7.3.1**) wiesen Horvathova et al. [1999] die hauptsächliche Entstehung von apurinischen / apyrimidinischen Stellen (AP Stellen) durch MNNG in V79 Zellen nach. Diese sind vermutlich auf spontane Depurinierung der vornehmlich gebildeten, instabilen N^7-Guanin-Addukte zurückzuführen. Dagegen ist die potente Mutagenität im *hPRT*-Genmutations-Assay ab Konzentrationen von 3,5 µM [Bradley et al., 1981] neben nicht reparierten DNA-Schäden vermutlich auf die Entstehung der promutagenen O^6-G-Addukte zurückzuführen.

3.7. Methodische Grundlagen

3.7.1. Blut

Morphologisch ist Blut ein mesenchymales System, dessen Zellen sich in der vermehrten extrazellulären Flüssigkeit bewegen. Dabei macht das Plasma etwa 56% und die Hämozyten etwa 44% des Blutes aus. Letztere werden unterteilt in Erythrozyten (rote Blutkörperchen), Leukozyten (weiße Blutkörperchen) und Thrombozyten (Blutplättchen).

Mit einer Anzahl von ca. 3,7-5,5 x 10^6 Zellen/µl Blut bilden die Erythrozyten den größten Anteil der Hämozyten. Ihre ungefähre Lebensdauer liegt bei 120 Tagen. Die runden, scheibenförmigen Erythrozyten enthalten keinen Zellkern, sind allerdings Träger des respiratorisch tätigen roten Blutfarbstoffs Hämoglobin (Hb).

Die Leukozyten mit einer Anzahl von 4.000-10.000/µl Blut erfüllen hauptsächlich Aufgaben des Abwehrsystems und werden in drei Gruppen unterteilt: Monozyten (6%), Granulozyten (67%) und Lymphozyten (27%). Die Lebensdauer der einzelnen Bestandteile beträgt zwischen einigen Stunden (Granulozyten) und mehreren Tagen bis Jahren (Lym-

phozyten). Zusammen mit den Makrophagen der Gewebe bilden die Monozyten das Monozyten-Makrophagen-System zur Abwehr von Mikroorganismen. Die Granulozyten werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Färbbarkeit in neutrophile (65-75%), eosinophile (2-4%) und basophile Leukozyten unterteilt. Ihre Aufgabe besteht hauptsächlich im Schutz vor Bakterien, abgestorbenen körpereigenen Zellen durch Phagozytose und entzündlichen Reaktionen.

Die Thrombozyten sind die kleinsten, kernhaltigen Hämozyten. Sie sind wie die Leukozyten amöb beweglich und besitzen viele geißelartige Anhänge, die das Anheften an Wundrändern ermöglichen. Sie sind Träger des Gerinnungsfaktors und werden nach einer Lebensdauer von etwa einer Woche in der Milz abgebaut.

Da Blut als eine Art Transportmedium für Fremdstoffe fungiert, die über verschiedene Zufuhrwege in den Körper aufgenommen wurden, stellt es ein interessantes System zur Prüfung der Genotoxizität von Fremdstoffen dar, da für diese im Blut die Möglichkeit zur Interaktion mit den darin enthaltenen Makromolekülen besteht. So kann es neben der Bindung an die DNA auch zu entgiftenden Reaktionen mit anderen nukleophilen Blutbestandteilen kommen.

Wird eine Substanz nicht direkt *i. v.* appliziert, muss sie eine Reihe biologischer Membranen, wie das Epithel der Haut, die Schleimhäute des Gastrointestinal-Trakts oder das Endothel der Kapillaren passieren, bevor sie in den zentralvenösen Blutpool gelangt (**Abb. 39**).

Interessant im Zusammenhang mit der Aufnahme von Fremdstoffen über die Nahrung ist deren Resorption über den Gastrointestinal-Trakt sowie die Anreicherung von Fremdstoffen im Blut nach der Darmpassage. Das aus Magen, Dünn- und Dickdarm sowie dem oberen Abschnitt des Rektums abfließende Blut gelangt mit der Pfortader zunächst in die Leber, wo große Anteile der resorbierten Fremdstoffe metabolisiert oder in die Galle abgegeben werden. Nach der Leberpassage werden neben den Ausgangsverbindungen auch deren metabolisierte Produkte in das venöse Blut überführt. Das daraus in der Lunge gebildete arterielle Blut sorgt schließlich für die Verteilung der Fremdstoffe in den Geweben [Fichtl und Mückter, 2004].

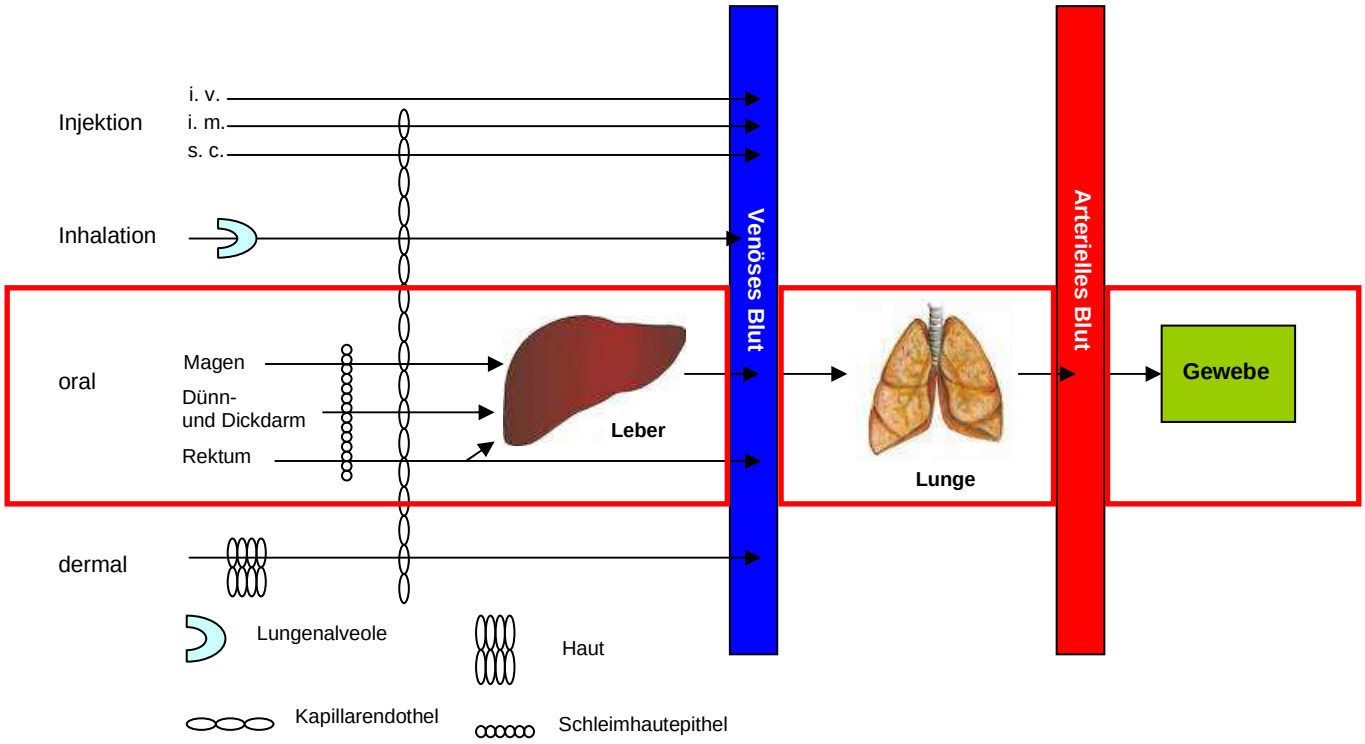


Abb. 39: Schematische Darstellung der Resorptionswege von Fremdstoffen [nach Fichtl und Mückter, 2004]

3.7.2. V79 Zellen

V79 Zellen sind fibroblastoide Zellen aus dem Lungengewebe eines männlichen chinesischen Hamsters. Die Zellen zeichnen sich durch eine schnelle Wachstumsrate und kurze Verdopplungszeit aus (12-16 h). Die Zelllinie besitzt einen vergleichsweise stabilen und homogenen Kariotypen mit einer modalen Chromosomenanzahl von 22 ± 1 sowie eine hohe Klonieffizienz (50-100%) [Glatt, 1993].

V79 Zellen exprimieren unter üblichen Zellkulturbedingungen kein Cytochrom P450 [Bradley et al., 1981]. Allerdings werden andere, ebenfalls für den Fremdstoffmetabolismus relevante Enzyme effektiv und teilweise in hohen Mengen exprimiert. In **Tab. 7** sind die Aktivitäten von für diese Arbeit relevanten Enzymen dargestellt [Glatt et al., 1987].

	Enzymaktivität [pmol/mg Protein/min]
Glutathion-S-Transferase (GST)	637.000
Cytochrom P450 Reduktase	3.200
mikrosomale Epoxidhydrolase (mEH)	118
cytosolische Epoxidhydrolase (cEH)	< 2

Tab. 7: Aktivitäten fremdstoffmetabolisierender Enzyme in V79 Zellen

Des Weiteren sind V79 Zellen O^6-Methyl-Guanin-Methyltransferase (MGMT)-defizient und können demnach promutagene O^6-Methyl-Guanin-DNA-Addukte nicht reparieren [Yarosh et al., 1985].

V79 Zellen tragen in ihrem Genom das auf dem X-Chromosom lokalisierte *hPRT*-Gen zur Exprimierung der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase. Da der Phänotyp bezüglich Mutationen rezessiv ist, werden im *hPRT*-Genmutations-Assay (*hPRT*-Assay) Zellen des männlichen Hamsters benutzt, da hier nur eine aktive Kopie des Gens vorhanden ist. Die *hPRT*-Proteine von Maus, Ratte, chinesischem Hamster und Mensch bestehen aus 218 Aminosäuren und unterscheiden sich in maximal zehn [Bradley et al., 1981; Glatt, 1993].

3.7.3. Einzelzell-Gelelektrophorese (SCGE; Comet Assay)

Bei der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) handelt es sich um eine besonders schnelle und sensitive Methode zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen auf Einzelzellniveau. Der Assay ermöglicht die Detektion von DNA-Schäden, die durch alkylierende oder interkalierende Agentien induziert wurden sowie den Nachweis oxidativer DNA-Schäden. Im Vergleich zu anderen Genotoxizitätstests bietet das Verfahren neben hoher Sensitivität und schneller Durchführbarkeit verschiedene Vorteile. So kann der Test theoretisch mit allen eukaryotischen Zellen [Tice et al., 1991] durchgeführt werden, und dies mit nur einer geringen Anzahl benötigter Zellen. Damit einher geht ein äußerst geringer Verbrauch an Testsubstanzen.

Ursprünglich zurückzuführen ist das Verfahren auf die Beobachtungen von Rydberg und Johanson [1978], dass Zellkerne, die mit ionisierender Strahlung behandelt wurden, mit steigender Dosis unter mikroskopischer Betrachtung immer diffuser wurden. 1984 beschrieben Östling und Johnson eine modifizierte Variante unter Verwendung einer neutralen Elektrophorese. Es zeigte sich, dass Zellkerne mit geschädigter DNA, im Gegensatz zu ungeschädigter, sich in Richtung Anode ausbreiten. Zum Nachweis verschiedener Arten von DNA-Strangbrüchen waren allerdings die verwendeten neutralen Elektrophorese-Bedingungen von Nachteil. In diesem pH-Bereich wird die doppelhelikale

DNA nicht entwunden. Daraus folglich können hier nur DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) detektiert werden, da die daraus entstehenden DNA-Fragmente bereits ohne vorherige DNA-Entwindung im elektrischen Feld wandern. Der Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen (ESB) und anderen DNA-Modifikationen war mit diesem Verfahren nicht möglich, da hier zur Entstehung von DNA-Fragmenten, die DNA zunächst in ihre beiden Stränge separiert werden muss. Eine erhöhte Sensitivität der Methode konnte durch Verwendung alkalischer Bedingungen während der Elektrophorese erreicht werden [Singh et al., 1988]. Im pH-Bereich >13 ist es möglich ESB, DSB, alkali-labile Stellen (ALS) und DNA-crosslinks nachzuweisen.

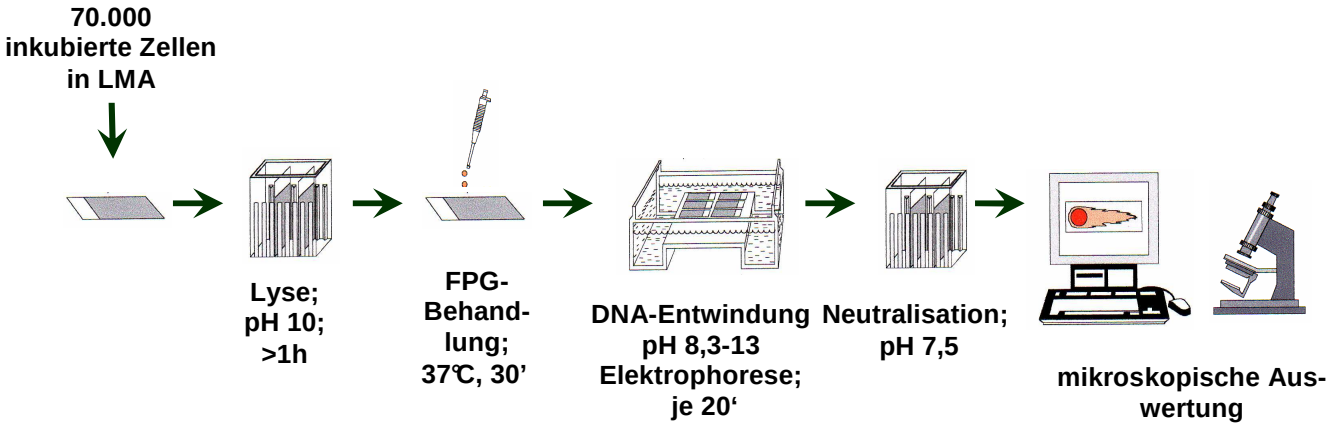


Abb. 40: Prinzip der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay)

Zur Analyse werden die zuvor inkubierten Zellen (ca. 70.000) in Agarose auf einem Objektträger eingebettet und im Gel lysiert. Während dieser mindestens einstündigen Lyse wird die Zelle permeabilisiert und cytosomale sowie nukleäre Proteine extrahiert, wodurch eine Nukleus-ähnliche Struktur verbleibt [Cook et al., 1976]. Anschließend werden die lysierten Zellen einem alkalischen Puffer (pH >13) ausgesetzt. Unter diesen Bedingungen wird die DNA in zwei einzelne DNA-Stränge separiert / denaturiert und alkalilabile DNA-Schäden in DNA-Strangbrüche überführt [Tice et al., 2000]. Im Anschluss erfolgt eine horizontale Elektrophorese. Brüche in der DNA, entweder direkt induziert oder entstanden durch die Umwandlung von alkalilabilen Stellen, führen zu einer Lockerung der DNA-Struktur im Kern und zu kurzen DNA-Fragmenten. Beides ruft eine verstärkte Wanderung der negativ geladenen DNA aus dem Zellkern in Richtung Anode während der Elektrophorese hervor. Nach Anfärbung der DNA ergibt sich unter dem Mikroskop das Bild eines Kometen, das dem Comet Assay seinen Namen gab. Der „Kopf“ entspricht dabei dem ursprünglichen Zellkern, während der „Schweif“ aus den gewanderten DNA-Bruchstücken besteht.

Zur Auswertung und Klassifizierung der Intensität der DNA-Schädigung können verschiedene Parameter herangezogen werden. Zu unterscheiden sind hierbei verschiede-

ne Kategorien, basierend zum einen auf der Länge des Kometenschweifs („tail length“) und / oder die relative Intensität des Schweifs („tail moment“; „tail intensity“). Als Auswerteparameter diente hier die „tail intensity“ (TI %), die das relative Verhältnis der Schweifintensität verglichen zum Kern darstellt [Tice et al., 2000].
Mit Hilfe verschiedener Modifikationen des Assays ist es möglich, dessen Sensitivität zu verändern. Im Folgenden sollen nun im Einzelnen die hier verwendeten Modifikationen erläutert werden.

3.7.3.1. Modifikation des pH-Wertes

Durch Veränderung des pH-Wertes des Alkali- bzw. Elektrophoresepuffers lässt sich die Sensitivität des Assays bezüglich der Detektion von alkalilabilen DNA-Schäden und DNA-Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen verändern [Klaude et al., 1996; Miyamae et al., 1997]. Bei der durch Singh et al. [1988] entwickelten Variante mit einem pH-Wert >13 werden neben DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen (ESB; DSB) und DNA-Crosslinks auch alkali-labile Stellen (ALS) detektiert. Letztere werden unter den alkalischen Bedingungen spontan in Strangbrüche überführt [Collins, 2004]. Hierbei bleibt allerdings zu beachten, dass ein Teil der ALS aufgrund der relativ kurzen Zeit der DNA-Entwindung nicht in DNA-Strangbrüche umgewandelt werden kann [Collins, 2004]. Um also definitivere Aussagen über die Entstehung alkali-labiler Stellen treffen zu können, empfiehlt sich die Senkung des pH-Wertes auf 12,1 sowie der Einsatz von DNA-Schadens-spezifischen Endonukleasen oder Glykosylasen (z. B. FPG; s. **3.7.3.2**.) [Collins, 2004].
Nach Miyamae et al. [1997] beruht die DNA-Migration bei einem pH-Wert von 12,1 vor allem auf DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Durch den niedrigeren pH-Wert des Alkali- bzw. Elektrophoresepuffers werden alkalisensitive Stellen nicht in Strangbrüche umgewandelt und bewirken somit keine Zunahme der DNA-Strangbruchrate.

3.7.3.2. Formamido-pyrimidin-DNA-glykosylase (FPG)

Die Modifikation des alkalischen Comet Assay durch zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem DNA-Base-Excision-Reparaturenzym Formamido-pyrimidin-DNA-glykosylase (FPG) ermöglicht eine zusätzliche Aussage über möglicherweise entstehende DNA-Modifikationen. FPG ist in der Lage, verschiedene Arten von DNA-Schäden zu erkennen und diese aus der DNA als zusätzliche Strangbrüche zu entfernen. Dies sind z.B. oxidierte Purinbasen und daraus resultierende ring-geöffnete Formamido-pyrimidine/Imidazole (FaPy) [Chetsenga et al., 1979; Boiteux et al., 1984; 1990; 1992], allerdings auch alkylierte FaPy, welche durch Ringöffnung aus einem entsprechend instabilen DNA-Addukt gebildet worden sind (z.B. N^7-Addukte des Guanin) [Boiteux et al., 1989; 1992; Laval et al.,

1991; Li et al., 1997]. Des Weiteren repariert das Enzym apurinische / apyrimidinische Stellen (AP Stellen), die durch spontane Depurinierung aus DNA-Addukten entstanden sind.

FPG ist ein bifunktionelles Enzym mit einer DNA-Glykosylase- und einer AP-Lyase-Aktivität [Bailly et al., 1989; O'Connor et al., 1989]. Die Funktionalität ist in **Abb. 41** schematisch dargestellt.

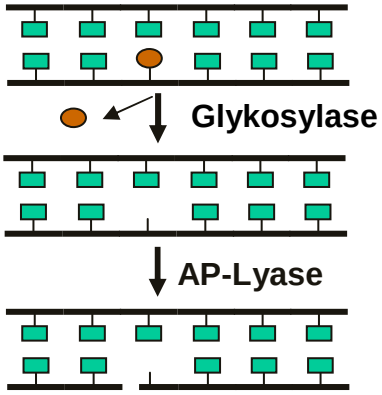


Abb. 41: Funktionalität von FPG

Zunächst erkennt die DNA-Glykosylase spezifisch modifizierte DNA-Basen und schneidet diese aus der DNA, wobei eine AP Stelle verbleibt. Durch die AP-Lyase-Aktivität kann nun die Entfernung des Deoxyribosephosphats erfolgen, woraus ein Strangbruch resultiert [Laval, 1996] und zu einer Verstärkung der Schweifintensität führt.

In Genotoxizitäts-Tests wird FPG hauptsächlich zur Detektion spezifisch oxidativer DNA-Schäden eingesetzt. Die Verwendung des Reparaturenzyms zum Nachweis alkylierter DNA-Addukte und den daraus resultierenden ring-geöffneten Imidazolen bzw. AP Stellen erfolgten bislang hauptsächlich im zellfreien System.

3.7.4. Prinzip des *hPRT*-Genmutations-Assay

Mutationen sind vererbbare Veränderungen der DNA-Sequenz. Sie lassen sich auf der Strukturebene des genetischen Materials oder durch Quantifizierung von biochemischen oder zellphysiologischen Funktionsänderungen erfassen. Hierzu sind eine Reihe von Genotoxizitäts- und Mutagenitätstests entwickelt worden, mit denen die genotoxischen Eigenschaften physikalischer Einflüsse und chemischer Stoffe *in-vitro* an Bakterien oder Säugerzellen untersucht werden können. Die am häufigsten verwendeten Testsysteme zum Nachweis von Mutationen sind hierbei der *hPRT*-Genmutations-Assay (*hPRT*-Assay) und der Ames-Test. Beim Ames-Test handelt es sich um einen bakteriellen Mutagenitätstest. Im Gegensatz dazu eröffnet der *hPRT*-Assay die Möglichkeit, Mutationen in Säugerzellen zu detektieren.

Normalerweise kann die Zelle die Purinbasen durch die *de novo*-Synthese und den Wiederverwertungsschritt (solvage-pathway) herstellen. Bei der *de novo*-Synthese wird eine Purinbase aus α-D-Ribose-5-Phosphat und verschiedenen kleinen Bausteinen synthetisiert. Bei dem Wiederverwertungsschritt reagiert eine entsprechend freie Purinbase direkt mit 5-Phosphoribosyl-1-diphosphat. Dabei hängen die Adenin-Phosphoribosyl-transferase eine Adenin-Base und die Hypoxanthin-(Guanin)-Phosphoribosyltransferase (*hPRT*) eine Guanin- oder Hypoxanthin-Base an einem Zucker-Phosphat-Rest (**Abb. 42**) [Stryer, 2003].

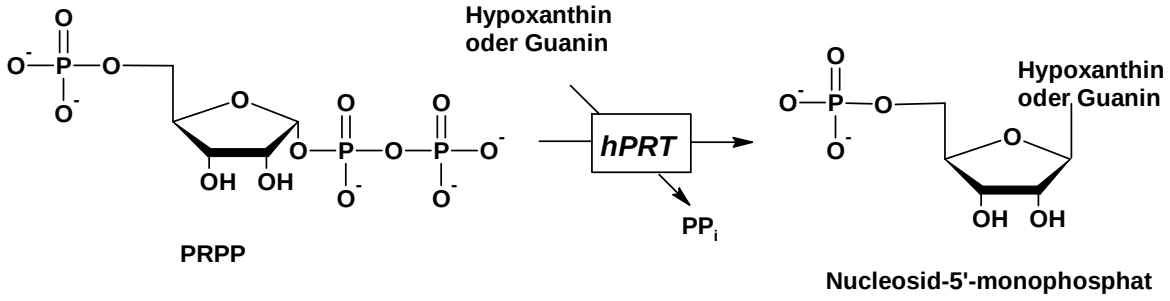


Abb. 42: *hPRT*-katalysierte Bildung von Purinnukleotiden

Bei einer Vorwärtsmutation des *hPRT*-Gens wird die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase nicht mehr exprimiert. Dies äußert sich in einer starken Abnahme der *hPRT*-Aktivität.

Die *hPRT*-defiziente Zellen (Mutanten) sind nicht in der Lage, Guanin und Hypoxanthin zur Herstellung der entsprechenden 5'-monophosphorylierten Nukleoside zu nutzen. Sie sind auf die *de novo*-Synthese von GMP und IMP angewiesen.

Zur Unterscheidung der *hPRT*-defizienten Zellen von den nicht veränderten Zellen werden die Zellen in einem 6-Thioguanin-haltigen Nährmedium exponiert.

Bei den Zellen mit aktiver Hypoxanthin-(Guanin)-Phosphoribosyltransferase werden toxisch wirkende Nukleotide synthetisiert. Es kommt zu schweren Schäden der DNA- und RNA-Struktur, so dass die Zellen absterben. Die *hPRT*-Mutanten können dagegen 6-Thioguanin nicht verwerten und sind daher überlebensfähig und bilden Kolonien aus. Die auftretenden 6-Thioguanin-resistenten Zellen sind daher ein Maß für das Auftreten von Mutationen im *hPRT*-Gen (**Abb. 43**) [Bradley, 1981; Glatt, 1993; Knippers, 1996]

Die Resistenz gegenüber 6-Thioguanin ist auf viele unterschiedliche molekulare Veränderungen des *hPRT*-Gens zurückzuführen. Dabei wurden bis 1993 727 unabhängige Einzelbasensubstitutionen, 151 Aminosäurenaustausche und alle 12 theoretisch möglichen Basenaustausche beobachtet. 435 Mutationen beruhen auf Rasterschüben und De-

letionen weniger Basenpaare bzw. ein oder mehreren Exons. Seltener waren dagegen Insertionen, die meistens auf Duplikationen beruhten [Glatt, 1993].

Ein fast völliges Fehlen der Enzyme der Nukleotidbiosynthese führt zu einer Reduktion der Nukleotide und gleichzeitig zu einer Anhäufung von Zwischenprodukten. Der Verlust der Hypoxanthin-(Guanin)-Phosphoribosyltransferase bedeutet einen deutlichen Anstieg der Konzentration von PRPP und der Geschwindigkeit der *de novo*-Synthese sowie eine Überproduktion des Abbauproduktes Urat.

Beim Menschen führt ein Mangel von Hypoxanthin-(Guanin)-Phosphoribosyl-transferase zum Auftreten von Gicht. Ein angeborener Stoffwechseldefekt des *hPRT*-Gens, der zum völligen Verlust der *hPRT*-Aktivität führt, ist Ursache für das Lesch-Nyhan-Syndrom, einer schweren Stoffwechselerkrankung [Stryer, 2003].

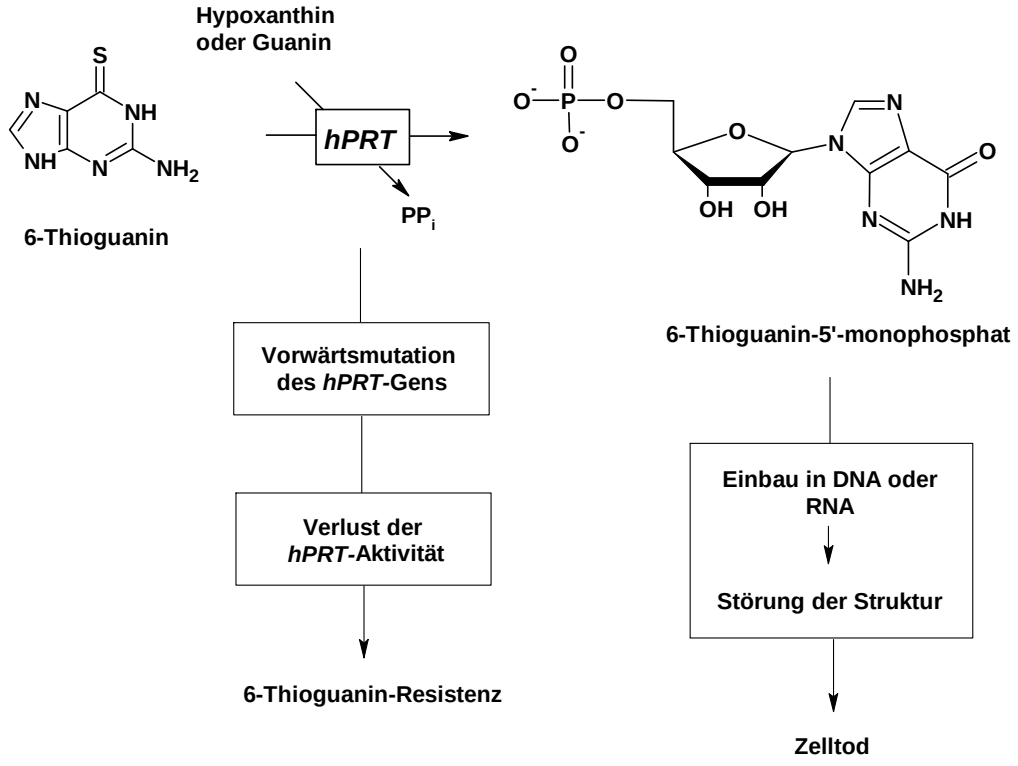
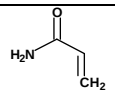
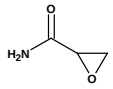
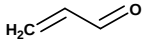
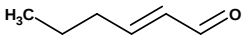
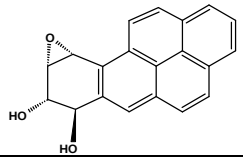
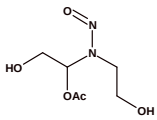
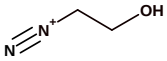
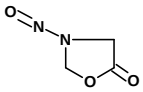
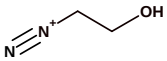
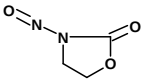
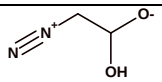
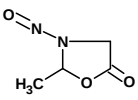
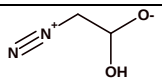
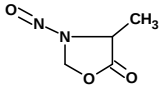
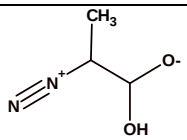
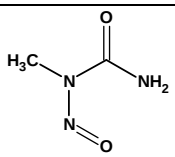
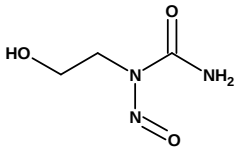
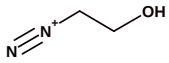
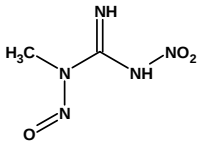


Abb. 43: Prinzip des *hPRT*-Assays

4. Ergebnisse und erste Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Verbindungen, die entsprechenden alkylierenden Agentien sowie die vermutlich hauptsächlich gebildeten DNA-Addukte sind in **Tab. 8** aufgeführt.

Substanz	Strukturformel	alkylierendes Agens	hauptsächliche DNA-Addukte
Acrylamid (AA)		geringe DNA-Bindungsaffinität [Solomon et al., 1985; Friedman, 2003]	
Glycidamid (GA)		direkt	N^7-G [Gamboa da Costa et al., 2003]
Acrolein (Ac)		direkt	cyklische Guanin-Addukte [Eder et al., 1993b]
2-Hexenal (Hex)		direkt	
Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE)		direkt	N^2-G („bulky adduct“) [Peltonen et al., 1995]
α-Acetoxy-NDELA		 [Dennehy et al., 2005; Loeppky et al., 2005]	N^7-G O^6-G Phosphotriester
N-Nitroso-oxazolidin-2-on (NOZ-2)			N^7-G * O^6-G * Phosphotriester *
N-Nitroso-oxazolidin-5-on (NOZ-2)		 und/oder CH_3^+	N^7-G * O^6-G * Phosphotriester *
2-Methyl-N-Nitroso-oxazolidin-5-on (NOZ-2)		 und/oder CH_3^+	N^7-G * O^6-G * Phosphotriester *
4-Methyl-N-Nitroso-oxazolidin-2-on (NOZ-2)			N^7-G * O^6-G * Phosphotriester *
1-Methyl-1-nitrosoharnstoff (MNU)		CH_3^+	N^7-G O^6-G Phosphotriester [Beranek et al., 1980; Wurdeman et al., 1989]

***N*-(2-hydroxyethyl)-N-nitrosoharnstoff (HENU)**			N^7-G O^6-G Phosphotriester [Conrad et al., 1986; Müller et al., 1987]
***N*-Methyl-N'-Nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)**		CH_3^+	N^7-G O^6-G [Lawley et al., 1970] Phosphotriester

Tab. 8: Untersuchte Verbindungen, alkylierende Agentien und (*=vermutlich) gebildete DNA-Addukte

4.1. Genotoxizität in Vollblut und isolierten Lymphozyten

4.1.1. Induktion von DNA-Schäden in humanem Vollblut

Humanes Vollblut ist das erste Target nach der Darm- und Leberpassage von Fremdstoffen und stellt ein einfach zugängliches System zur Prüfung der Genotoxizität dar. Im Comet Assay wird Vollblut bislang als *ex-vivo*-Modell nur selten angewendet [Chuang et al., 2004; Faust et al., 2004]. Im Gegensatz zu den häufiger in Kombination mit der Methode verwendeten isolierten Lymphozyten besitzt das System Vollblut allerdings Vorteile. So ist die biologische Aktivität eines Fremdstoffes u. a. abhängig vom Gleichgewicht zwischen giftenden und entgiftenden Prozessen im Organismus. Neben der Lymphozyten-DNA können genotoxische Verbindungen in Vollblut zusätzlich an andere Blutkomponenten, wie Hämoglobin (Hb), Albumin oder Glutathion (GSH) binden. Diese Interaktion führt vielfach zur Detoxifizierung der Verbindungen.

In der vorliegenden Untersuchung wurde daher humanes Vollblut als Modelsystem zur Prüfung der konzentrationsabhängigen Interaktion von Acrylamid (AA) und Glycidamid (GA) mit der Lymphozyten-DNA untersucht. Die Quantifizierung des DNA-schädigenden Potentials erfolgte mittels Comet Assay. Vergleichend zu AA wurde die Genotoxizität der α,ß-ungesättigten Carbonylverbindungen Acrolein (Ac) und 2-Hexenal (Hex) bestimmt. Zur Einstufung des genotoxischen Potentials von GA wurden des Weiteren das potente Kanzerogen Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (±-BPDE) sowie ausgewählte *N*-Nitrosoverbindungen auf ihre DNA-strangbrechende Wirkung untersucht.

Dazu wurde humanes Vollblut unmittelbar nach der Blutentnahme für 1, 2 bzw. 4 h bei 37°C mit den jeweiligen Testsubstanzen inkubiert. A nhand von Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von humanem Vollblut unter den gewählten Bedingungen nur bis maximal 4 h möglich ist. Eine Verlängerung der Inkubationszeit hatte Einfluss auf die Viabilität der Lymphozyten, sodass im Comet Assay in allen Konzentrationen keine Zellen mehr nachweisbar waren.

Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Quantifizierung der DNA-Strangbrüche mittels alkalischem Comet Assay. Zum Nachweis möglicher FPG-sensitiver DNA-Schäden (z.B. ring-geöffnete Purinbasen, AP Stellen; s. **3.7.3.2**) wurde das Protokoll durch eine zusätzliche Inkubation mit dem DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) modifiziert.

4.1.1.1. Acrylamid und Glycidamid

AA induziert in humanem Vollblut bis 6000 µM (1-4 h) keine DNA-Strangbrüche (**Abb. 44 a**). Eine zusätzliche Behandlung mit FPG führt zu keiner signifikanten Erhöhung der DNA-Strangbruchrate (**Abb. 44 b**).

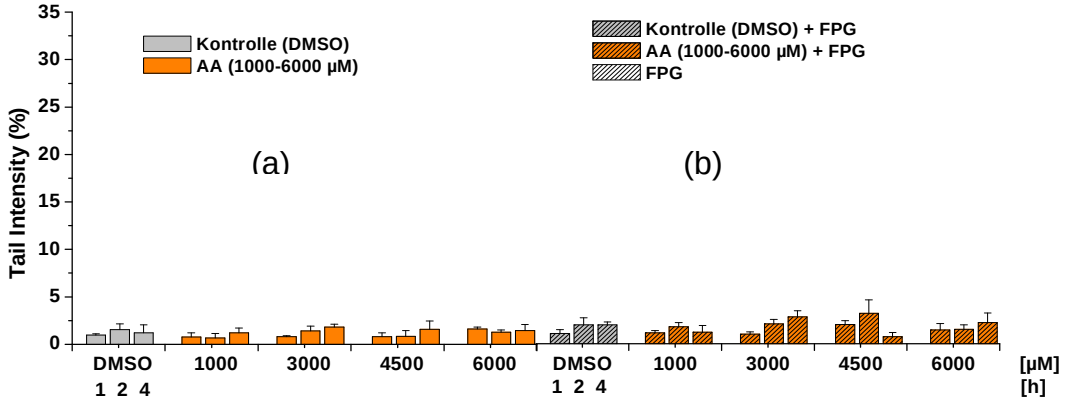


Abb. 44: Induktion von DNA-Schäden durch Acrylamid (AA) in humanem Vollblut ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 1-4 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(AA)=1000-6000 µM; 1% DMSO)

Im Gegensatz dazu, induziert GA in humanem Vollblut ab 300 µM (4 h) signifikant DNA-Strangbrüche (**Abb. 45 a**). Nach zusätzlicher Inkubation der Lymphozyten-DNA mit FPG sind DNA-Schäden bereits ab 10 µM (4 h) detektierbar (**Abb. 45 b**).

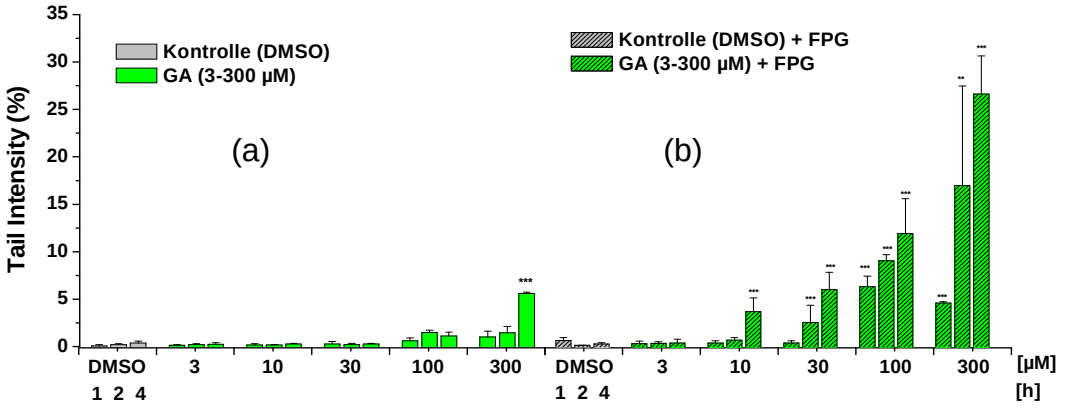


Abb. 45: Induktion von DNA-Schäden durch Glycidamid (GA) in humanem Vollblut ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 1-4 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(GA)=3-300 µM; 1% DMSO)

AA ist unter den gewählten Bedingungen nicht genotoxisch. Dies beruht voraussichtlich auf der äußerst geringen Bindungsaffinität von AA gegenüber der DNA [Solomon et al., 1985; Friedman, 2003] sowie der deutlich größeren Reaktivität gegenüber anderen Blutbestandteilen, wie z.B. Hämoglobin (0,3 µM, 4 h) [Bertow et al., 2007].

Das DNA-schädigende Potential von GA ist vermutlich auf die hauptsächliche Bildung von DNA-Addukten am N^7-Guanin (N^7-G) [Segerbäck et al., 1995; Gamboa da Costa et al., 2003] zurückzuführen. Die ebenfalls entstehenden Addukte an den Positionen N^1- und N^3-Adenin (N^1-A; N^3-A) [Gamboa da Costa et al., 2003] spielen wahrscheinlich aufgrund des mengenmäßig geringen Anteils (100-fach geringer als N^7-GA-G) eine untergeordnete Rolle.

Die in **Abb. 45 (a)** dargestellten DNA-Strangbrüche resultieren neben DNA-Reparaturprozessen voraussichtlich aus AP Stellen, welche als Folgeprodukt einer Alkylierung am N^7-G oder N^3-A entstehen [Gates et al., 2003 (rev.)]. Diese alkali-labilen Stellen werden zum Teil während der DNA-Entwindung und Elektrophorese (pH >13) in DNA-Strangbrüche überführt [Tice et al., 2000; Collins, 2004].

Zusätzlich zur Depurinierung unterliegen N^7-G-Addukte einer Ringöffnung zum Formamido-pyrimidin (FaPy) [Chetsanga et al., 1982]. FaPy sind Substrate des DNA-Reparaturenzyms FPG [Boiteux et al., 1989 & 1992; Laval et al., 1991; Li et al., 1997], welches zunächst deren Elimination aus der DNA unter Erhalt einer AP Stelle und anschließend die Entstehung eines DNA-Strangbruchs durch Entfernung des Deoxyribosephosphats vermittelt [Laval, 1996]. Die in **Abb. 45 (b)** dargestellten DNA-Strangbrüche resultieren also möglicherweise aus der FPG-vermittelten Entfernung von FaPy und AP Stellen.

4.1.1.2. Acrolein und 2-Hexenal

Im Vergleich zu AA wurden die ebenfalls zur Gruppe der α,ß-ungesättigten Carbonylverbindungen gehörenden Acrolein (Ac) und 2-Hexenal (Hex) auf ihr DNA-schädigendes Potential in humanem Vollblut untersucht.

Aus **Abb. 46** wird deutlich, dass unter den gewählten Inkubationsbedingungen weder Ac, noch Hex DNA-Strangbrüche in humanem Vollblut induzieren. Eine zusätzliche Behandlung mit FPG bewirkt keinen signifikanten Anstieg der DNA-Strangbruchrate im Vergleich zur Negativkontrolle DMSO.

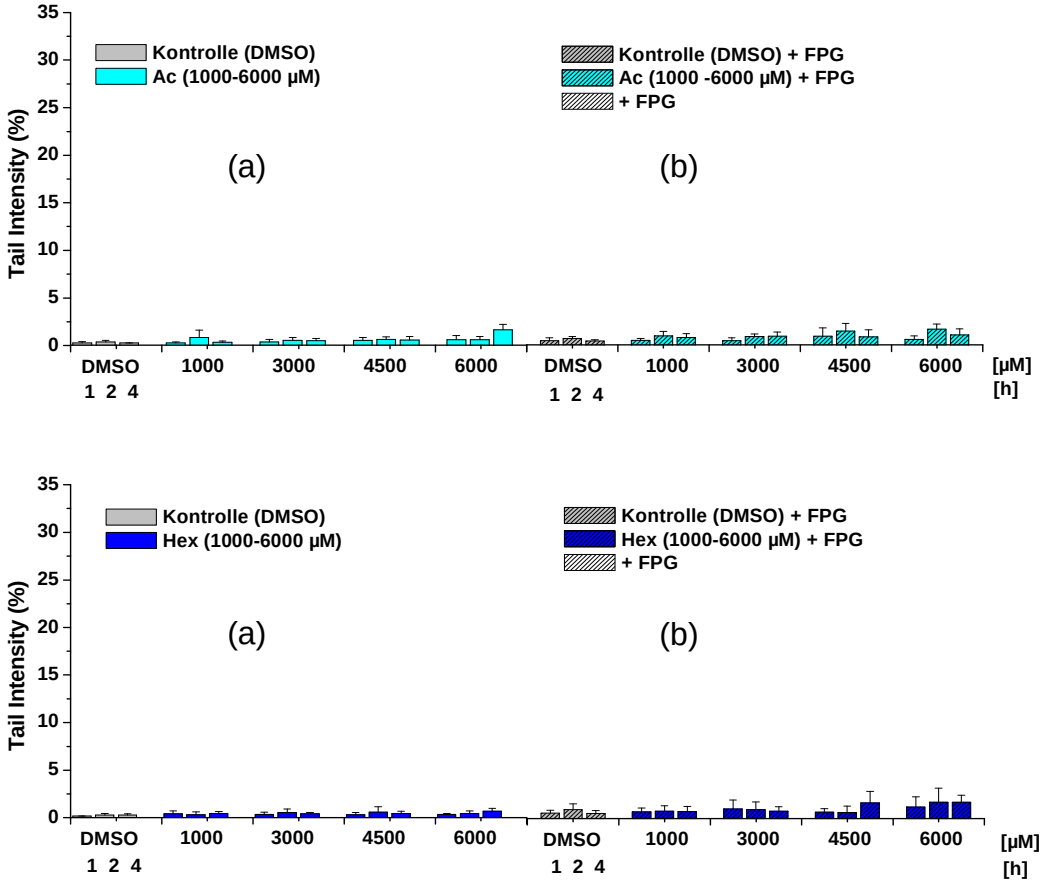


Abb. 46: Induktion von DNA-Schäden durch Acrolein (Ac) und 2-Hexenal (Hex) in humanem Vollblut ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 1-4 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(Ac; Hex)=1000-6000 µM; 1% DMSO)

Der Vergleich mit Ergebnissen zur Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Ac und Hex in *in-vitro* Zellsystemen zeigt, dass beide in humanem Vollblut deutlich geringer aktiv sind. So induziert Ac beispielsweise in humanen Bronchialepithelzellen [Grafstrom et al., 1986, 1988] und Hex in V79-Zellen, CaCo 2-Zellen, primären Rattenhepatozyten [Glaab et al, 2000; Janzowski et al., 2000] oder Kolonzellen der Ratte [Gölzer et al., 1996; Jan-

zowski et al., 2000] bereits in mikromolaren Konzentrationen DNA-Strangbrüche. Dagegen zeigen beide Verbindungen in humanem Vollblut selbst in millimolaren Konzentrationen keine DNA-schädigende Wirkung.

Ac und Hex besitzen ein ausgeprägtes elektrophiles Potential. In humanem Vollblut ist zu vermuten, dass beide nur in geringem Ausmaß mit der DNA, sondern bevorzugt mit anderen Blutbestandteilen (z.B. Hämoglobin, GSH) interagieren [Dixit et al., 1982; Beiswanger et al., 1993; Glaab et al., 2001] und somit entgiftet werden.

4.1.1.3. (±)-anti-Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid ((±)-anti-BPDE)

Zur Einordnung des genotoxischen Potentials von GA im Vergleich zu potenten Kanzerogenen wurde (±)-anti-BPDE auf die Induktion von DNA-Strangbrüchen in humanem Vollblut untersucht.

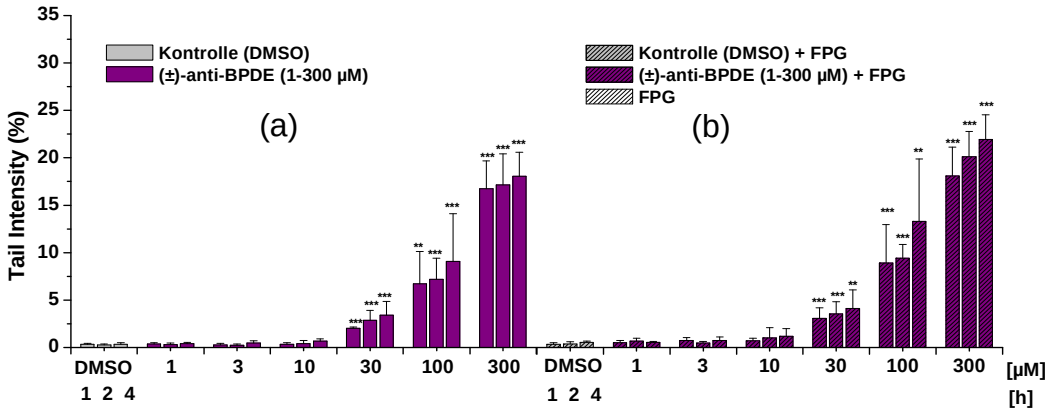


Abb. 47: Induktion von DNA-Schäden durch (±)-anti-Benzo[a]pyren-7,8-dihydroldiol-9,10-epoxid ((±)-anti-BPDE) in humanem Vollblut ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 1-4 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(BPDE)=1-300 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

Abb. 47 (a) zeigt, dass (±)-anti-BPDE unter den gewählten Inkubationsbedingungen ab 30 µM (1 h) zeit- und konzentrationsabhängig DNA-Strangbrüche verursacht. Eine zusätzliche Behandlung der Lymphozyten-DNA mit FPG bewirkt keine weitere Erhöhung der DNA-Strangbruchrate (**Abb. 47 b**).

Hanelt et al. [1997] untersuchten das DNA-schädigende Potential von (±)-anti-BPDE in humanen fibroblastoiden MRC5CV1 Zellen und zeigten die Induktion von DNA-Strangbrüchen in vergleichbaren Konzentrationen.

Es muss allerdings angemerkt werden, dass der Comet Assay über das tatsächliche DNA-schädigende Potential von (±)-anti-BPDE nur eingeschränkte Aussagen zulässt.

(±)-anti-BPDE induziert hauptsächlich stabile Addukte am N^2-G [Cheng et al., 1989; Peltonen et al., 1995; Geacintov et al., 1997], welche nicht spontan in DNA-Strangbrüche übergehen, sondern nur durch Reparaturenzyme der Nukleotid-Excisions-Reparatur (NER) aus der DNA entfernt werden [Gunz et al., 1996; McLeod et al., 1991; Yang et al., 1982]. In deutlich geringeren Anteilen werden instabilere Addukte, wie z.B. N^7-G und N^3-A [Ochi et al., 1986] gebildet, die durch Enzyme der Base Excision Reparatur (BER) repariert werden [Braithwaite et al., 1998; 1999] und als DNA-Strangbrüche im Comet Assay nachweisbar sind. Die im Comet Assay erhaltenen DNA-Strangbrüche sind also vermutlich hauptsächlich auf AP Stellen instabiler DNA-Addukte [Sage et al., 1984; Ochi et al., 1986] oder auf Reparaturprozesse [Speit et al., 1996] zurückzuführen, spiegeln also demnach möglicherweise nicht die komplette BPDE-induzierte DNA-Schädigung wider. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse von Hanelt et al. [1997] gestützt, die nach Inkubation von humanen fibroblastoiden MRC5CV1 Zellen mit (±)-anti-BPDE (0,1-1 µM) im Verhältnis deutlich mehr N^2-G-Addukte mittels ^{32}P-Postlabelling als DNA-Strangbrüche im Comet Assay detektierten.

4.1.1.4. *N*-Nitrosoverbindungen

Im Vergleich zu GA wurden das ebenfalls hauptsächlich N^7-G-alkylierende, genotoxische N-Nitrosamid *N*-Methyl-N-Nitroso-harnstoff (MNU) sowie vier *N*-Nitroso-oxazolidinone auf ihr DNA-schädigendes Potential in humanem Vollblut untersucht. Als Vertreter der Gruppe der *N*-Nitrosamine wurde α-Acetoxy-NDELA verwendet.

4.1.1.4.1. α- Acetoxy-NDELA

α-Acetoxy-NDELA wird mittels Hydrolyse in α-Hydroxy-NDELA überführt, welches wiederum u. a. in ein DNA-alkylierendes 2-Hydroxyethyl-Diazoniumion zerfällt [Dennehy et al., 2005; Loeppky et al., 2005].

Wie in **Abb. 48** dargestellt, wirkt α-Acetoxy-NDELA ab einer Konzentration von 10 µM bereits nach einer Inkubationszeit von 1 h DNA-strangbrechend. Nach FPG-Behandlung sind DNA-Strangbrüche nicht signifikant gegenüber der DNA-Grundschädigung erhöht.

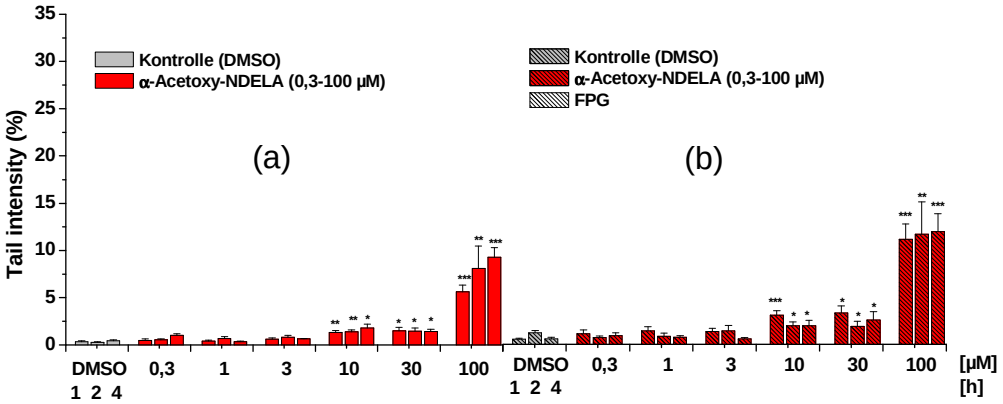


Abb. 48: Induktion von DNA-Schäden durch α-Acetoxy-NDELA in humanem Vollblut ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 1-4 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(α-Acetoxy-NDELA)=0,3-100 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001) [Hoffmann, 2005b]

Der Verglich mit Literaturdaten zu NDELA zeigt, dass α-Acetoxy-NDELA deutlich potenter *in-vitro* ist. Während α-Acetoxy-NDELA bereits im mikromolaren Konzentrationsbereich aktiv ist, induziert NDELA erst in millimolaren Konzentrationen mit und ohne Aktivierung Effekte in Lymphozyten [Dittberner et al., 1988; Henn et al., 1989; Kleinsasser et al., 2000]. Im Gegensatz zu NDELA erfolgt die Aktivierung von α-Acetoxy-NDELA nicht durch enzymatische Oxidation, sondern hydrolytisch in ein 2-hydroxyethylierendes Diazoniumion [Dennehy et al., 2005; Loeppky et al., 2005]. Die deutlich höhere Aktivität von α-Acetoxy-NDELA in Lymphozyten *in-vitro* im Vergleich zu NDELA [Dittberner et al., 1988; Henn et al., 1989; Kleinsasser et al., 2000] ist möglicherweise damit verbunden.
Das Intermediat 2-hydroxyethyliert die DNA voraussichtlich unter Bildung stabiler O^6-G-Addukten, die im Comet Assay nicht nachweisbar sind, und instabiler N^7-G-Addukte [Loeppky et al., 2004], die entweder spontan zu AP Stellen depuriniert oder zu ringgeöffneten Imidazolen umgeformt werden [Gates et al., 2003 (rev.)]. Das trotz der zu erwartenden bevorzugten Bildung von N^7-2-Hydroxyethyl-G der Unterschied zwischen FPG-sensitiven und DNA-Grundschäden vergleichsweise gering ist, liegt vermutlich an der darüber hinaus auftretenden Bildung von 2-Hydroxyethyl-Phosphotriestern. Besonderheit dieser Addukte ist ihre hohe Instabilität und der damit verbundenen spontanen Entstehung von DNA-Strangbrüchen [Conrad et al., 1986; Eisenbrand et al., 1986], welche möglicherweise die Bildung N^7-G-bedingter DNA-Strangbrüche überlagern.

4.1.1.4.2. *N*-Nitroso-oxazolidinone

Neben *N*-Nitroso-oxazolidin-2-on (NOZ-2) und -5-on (NOZ-5) wurden die an den Positionen C2 und C4 methylierten NOZ-5-Analoga 2-Me- und 4-Me-NOZ-5 auf ihr DNA-schädigenden Potential in humanem Vollblut untersucht.

Das vermutlich 2-hydroxyethylierende NOZ-2 induziert konzentrationsabhängig DNA-Strangbrüche in humanem Vollblut ab 100 µM. Eine zusätzliche Behandlung der Lymphozyten-DNA mit FPG führt zu einer geringen Erhöhung der DNA-Strangbruchrate ab 300 µM (**Abb. 49**).

Im Gegensatz dazu induziert NOZ-5, welches die DNA vermutlich carboxymethyliert und/ oder methyliert, im Wesentlichen FPG-sensitive Schäden ab 0,1 µM (**Abb. 49**). Ab 100 µM ist NOZ-5 in humanem Vollblut cytotoxisch.

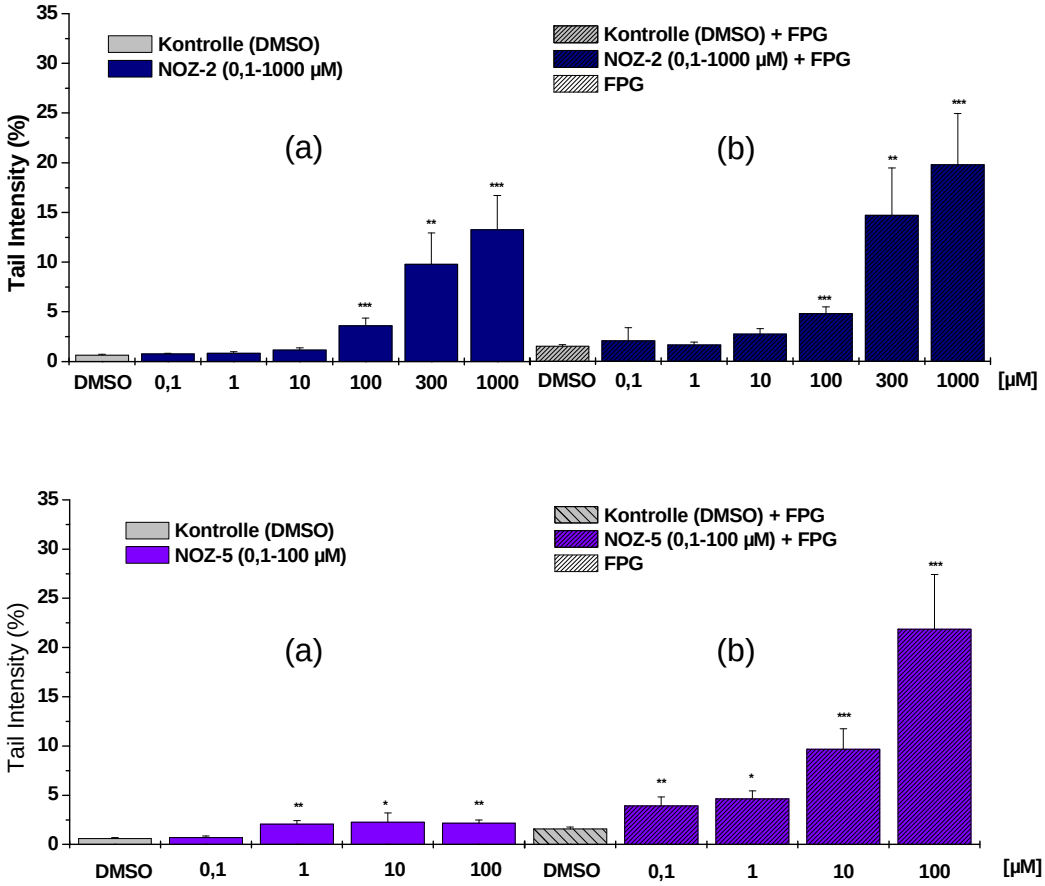
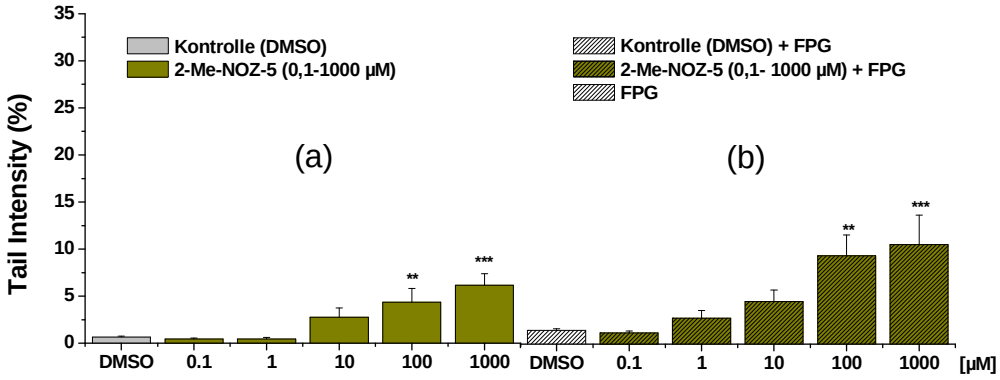


Abb. 49: Induktion von DNA-Schäden durch NOZ-2 und NOZ-5 in humanem Vollblut ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 4 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(NOZ-2)=0,1-1000 µM, c(NOZ-5)=0,1-100 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001) [Hoffmann, 2005b]

Obwohl 2-Me-NOZ-5 vermutlich in die gleichen reaktiven Intermediate zerfällt wie NOZ-5, ist das Ausmaß der DNA-Schädigung unterschiedlich. Während NOZ-5 ohne FPG-Behandlung nur gering aktiv ist, induziert 2-Me-NOZ-5 DNA-Strangbrüche ab 100 µM. Der bei NOZ-5 zu beobachtende Anstieg FPG-sensitiver DNA-Schäden ist im Fall von 2-Me-NOZ-5 deutlich schwächer ausgeprägt (**Abb. 50**).

Das potentiell carboxyethylierende 4-Me-NOZ-5 induziert nur in hohen Konzentrationen (>1000 µM) DNA-Strangbrüche. Eine zusätzliche Inkubation der Lymphozyten-DNA mit FPG bewirkt einen geringen Anstieg der DNA-Schäden im Vergleich zur FPG-unbehandelten Probe (**Abb. 50**).



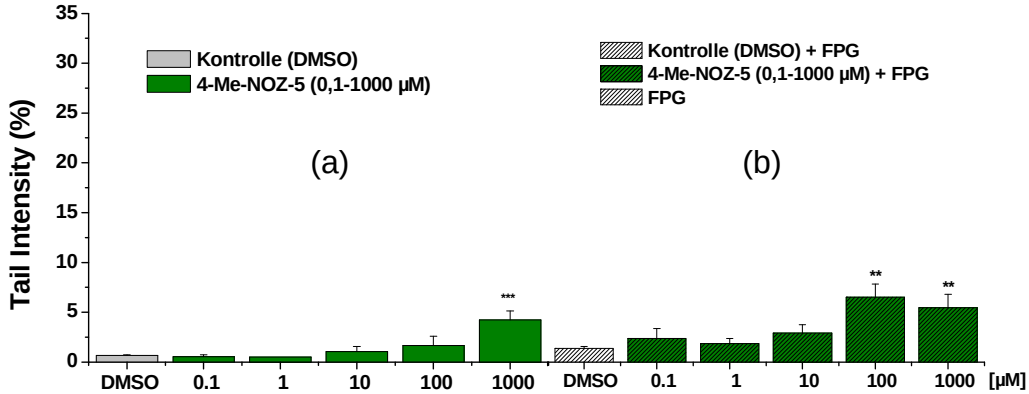


Abb. 50: Induktion von DNA-Schäden durch 2-Me-NOZ-5 und 4-Me-NOZ-5 in humanem Vollblut ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 4 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(2-Me-NOZ-5, 4-Me-NOZ-5)=0,1-1000 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001) [Hoffmann, 2005b]

Die untersuchten *N*-Nitroso-oxazolidinone werden hydrolytisch in DNA-alkylierende Diazoniumionen überführt.

Die Hydrolyse von NOZ-2 führt wie bei α-Acetoxy-NDELA zur Bildung eines 2-Hydroxyethyl-Diazoniumions. Vermutlich werden neben stabilen O^6-G-Addukten, die mittels Comet Assay nicht nachweisbar sind, vor allem instabile N^7-2-Hydroxyethyl-G-Addukte gebildet. Deren Nachweis wird jedoch wahrscheinlich aufgrund der spontan in DNA-Strangbrüche übergehenden instabilen 2-Hydroxyethyl-Phosphotriester überlagert.

Ein widersprüchliches Ergebnis zeigen die beiden methylierenden und / oder carboxymethylierenden NOZ-5 und 2-Me-NOZ-5. Während NOZ-5 im Wesentlichen FPG-sensitive Schäden ab 0,1 µM induziert, verursacht 2-Me-NOZ-5 gleichermaßen Grund- und FPG-sensitive DNA-Schäden ab 100 µM. Prinzipiell kann für beide Verbindungen, unabhängig von der Art der alkylierenden Diazoniumions, die bevorzugte Bildung von instabilen N^7-G-Addukten angenommen werden. Diese werden dann entweder zu AP Stellen depuriniert oder zu FaPy ring-geöffnet. Dass nur NOZ-5 das für N^7-Alkylantien typische Schadensmuster zeigt, hängt möglicherweise mit der Bildung von Phosphotriestern zusammen. Während Methyl-Phosphotriester eine hohe Stabilität in der DNA aufweisen [Conrad et al., 1986; Eisenbrand et al., 1986], sind carboxymethylierte Phosphotriester im Vergleich zu den 2-hydroxyethylierten Analoga möglicherweise instabil und werden spontan in DNA-Strangbrüche überführt. Für 2-Me-NOZ-5 kann daher angenommen werden, dass die Bildung dieser Addukte den Nachweis N^7-G-bedingter DNA-Strangbrüche überlagert. Sollte NOZ-5 die DNA methylieren, tragen die hierbei gebildeten stabilen Methyl-Phosphotriester nicht zur DNA-Strangbruchrate bei, sodass im Comet Assay vornehmlich N^7-G-Addukte nachweisbar sind.

4.1.1.4.3. *N*-Nitrosamide

Als Vertreter der Gruppe der *N*-Nitrosamide wurde *N*-Methyl-N-Nitroso-harnstoff (MNU) auf seine DNA-schädigende Wirkung in humanem Vollblut untersucht.

Dessen Aktivierung erfolgt spontan durch Hydrolyse ohne enzymatische Beteiligung in ein bevorzugt N^7-G-alkylierendes Methyl-Diazoniumion [Lawley et al., 1970; Beranek et al., 1980; Smith et al., 1988; Wurdeman et al., 1989; Fong et al., 1990].

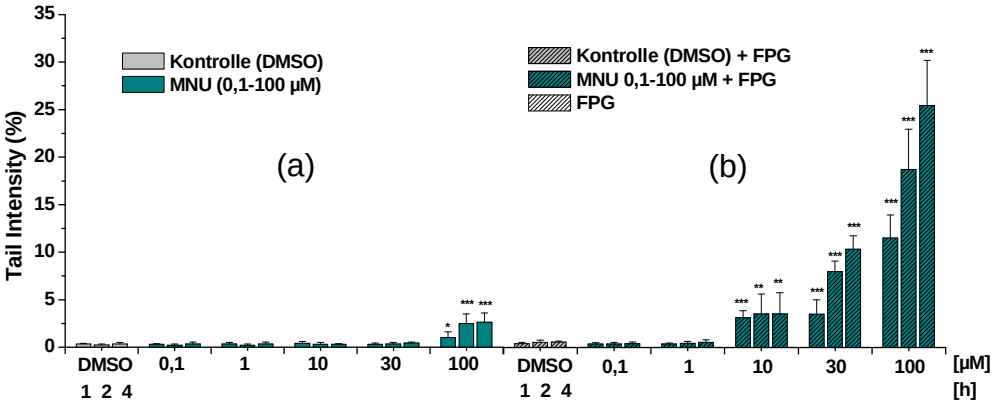


Abb. 51: Induktion von DNA-Schäden durch MNU in humanem Vollblut ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 1-4 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(MNU)=0,1-100 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

MNU induziert ab 100 µM (1 h) signifikant DNA-Strangbrüche (**Abb. 51**). Nach zusätzlicher Behandlung mit FPG ist eine deutliche Zunahme der DNA-Schädigung ab 10 µM (1 h) festzustellen.

MNU methyliert nach hydrolytischer Aktivierung die DNA hauptsächlich am N^7-G und zu geringeren Anteilen am O^6-G [Beranek et al., 1980; Wurdeman et al., 1989] sowie an den Phosphatgruppen des DNA-Rückgrates [Conrad et al., 1986; Müller et al., 1987]. Es ist anzunehmen, dass die im Comet Assay erkennbaren DNA-Strangbrüche hauptsächlich auf N^7-G-Addukte und deren Folgeprodukte (AP Stellen und FaPy) zurückzuführen sind. So werden zum einen O^6-G-Addukte durch die Methyl-Guanin-Methyl-Transferase (MGMT) [Christmann et al., 2003 (rev.)] unter Erhalt der ursprünglichen Guanin-Base repariert. Diese Reparatur führt somit nicht zur Induktion von DNA-Strangbrüchen, die im Comet Assay nachweisbar wären. Zum anderen verbleiben die gebildeten Methyl-Phosphotriester stabil in der DNA und gehen nicht spontan in DNA-Strangbrüche über [Conrad et al., 1986; Müller et al., 1987].

4.1.2. Induktion von DNA-Schäden in humanen isolierten Lymphozyten

Im Vergleich zu humanem Vollblut wurde die Induktion von DNA-Schäden in isolierten Lymphozyten mit Hilfe des alkalischen Comet Assays am Beispiel der α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen Acrolein, 2-Hexenal und Acrylamid sowie dessen Metaboliten Glycidamid untersucht. Die Gegenüberstellung der Ergebnisse soll Rückschlüsse über

den Einfluss entgiftender Komponenten im Vollblut auf die Genotoxizität der Substanzen ermöglichen.

Die Inkubation der Lymphozyten erfolgte zudem serumfrei, um eventuelle detoxifizierende Interaktionen mit Serumproteinen auszuschließen.

Zusätzlich zur Bestimmung des genotoxischen Potentials wurde die Cytotoxizität der Verbindungen mittels Trypanblau-Ausschlußtest ermittelt.

Wie in **Abb. 52** dargestellt, induziert AA auch in isolierten Lymphozyten keine DNA-Strangbrüche. Eine zusätzliche Behandlung der Lymphozyten-DNA mit FPG bewirkt keinen signifikanten Anstieg der DNA-Strangbruchrate.

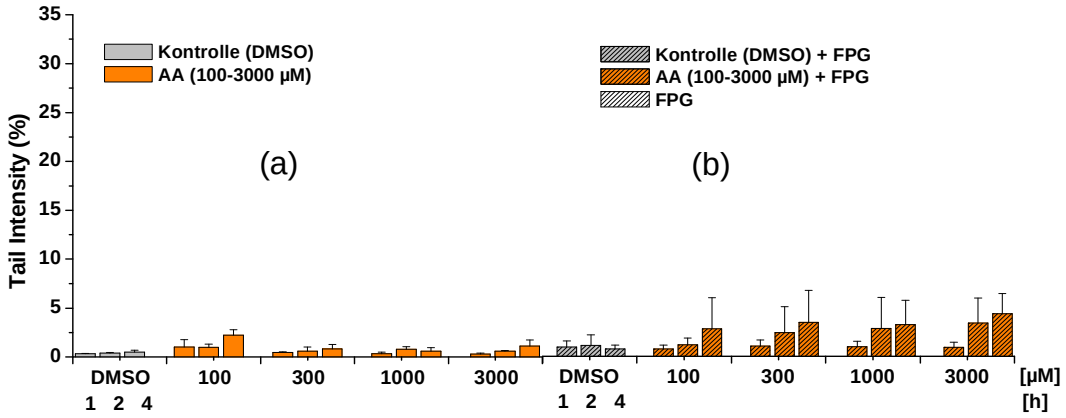


Abb. 52: Induktion von DNA-Schäden durch Acrylamid (AA) in humanem, isolierten Lymphozyten ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 1-4 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(AA)=100-3000 µM; 1% DMSO)

Der Vergleich mit den Ergebnissen in humanem Vollblut verdeutlicht, dass AA unabhängig von einer eventuellen Bindung an entgiftende Blutkomponenten, kein DNA-schädigendes Potential in Lymphozyten besitzt. Dies steht vermutlich im Zusammenhang mit auf der geringen Bindungsaffinität von AA gegenüber der DNA [Solomon et al., 1985; Friedman, 2003].

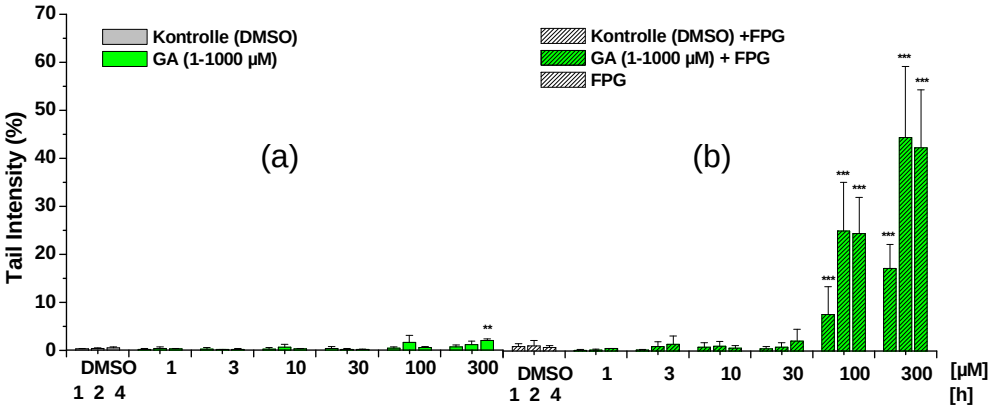


Abb. 53: Induktion von DNA-Schäden durch Glycidamid (GA) in humanem, isolierten Lymphozyten ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 1-4 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(GA)=1-300 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

Im Gegensatz zu AA, ist GA in isolierten Lymphozyten ab 300 µM (4 h) DNA-strangbrechend (**Abb. 53**). Nach zusätzlicher FPG-Behandlung sind DNA-Schäden ab 100 µM bereits (1 h) detektierbar. Ein Einfluss auf die Viabilität der Lymphozyten war unter den gewählten Bedingungen nicht festzustellen (Viabilität > 89 %).

Der Vergleich des genotoxischen Potentials von GA in humanem Vollblut und isolierten Lymphozyten zeigt, dass GA zwar in beiden Systemen in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich DNA-schädigend ist.

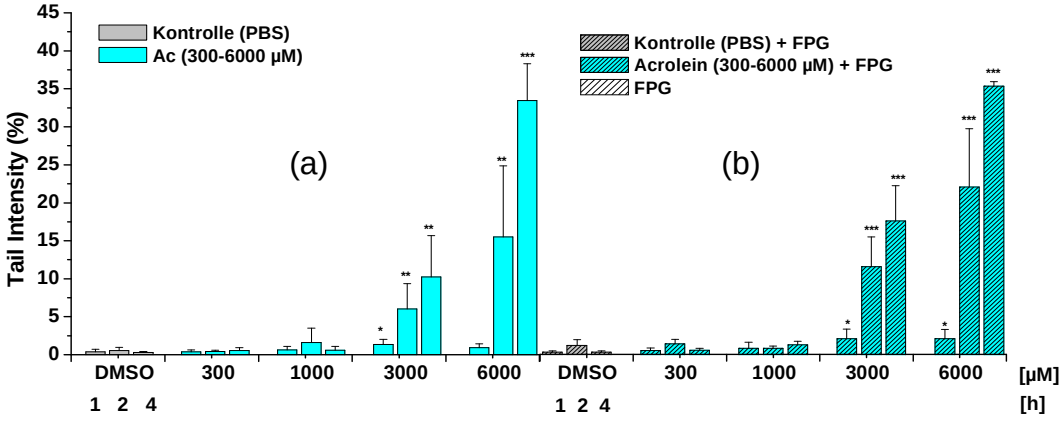


Abb. 54: Induktion von DNA-Schäden durch Acrolein (Ac) in humanem, isolierten Lymphozyten ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 1-4 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(Ac)=300-6000 µM; 1% PBS; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

Aus **Abb. 54** geht hervor, dass Ac, welches in Vollblut bis 6000 µM keine DNA-Strangbrüche induzierte (**Abb. 46**), in isolierten Lymphozyten ab 3000 µM (1 h) konzentrations- und zeitabhängig DNA-Strangbrüche verursacht. Die zusätzliche Behandlung der DNA mit FPG bewirkt keinen signifikanten Anstieg der Tail Intensity. Ac induziert keine cytotoxischen Effekte (Viabilität >92%).

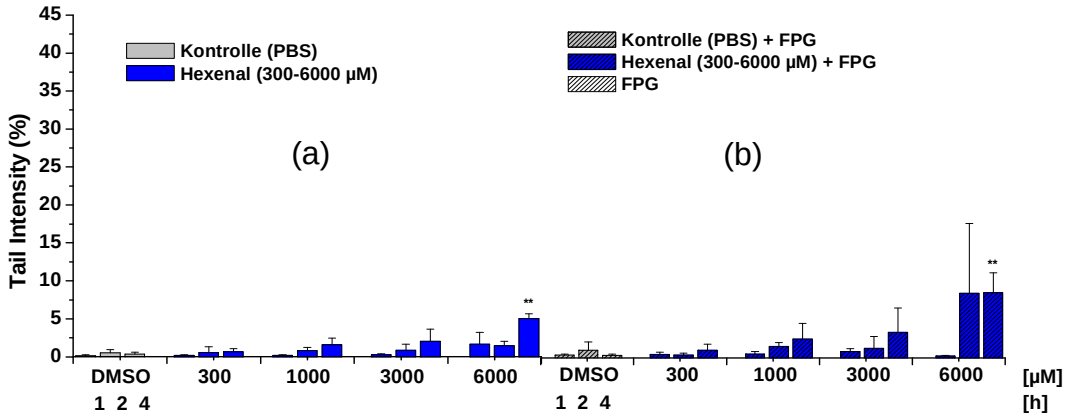


Abb. 55: Induktion von DNA-Schäden durch 2-Hexenal (Hex) in humanem, isolierten Lymphozyten ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 1-4 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(Hex)=300-6000 µM; 1% PBS; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

Während Hex in humanem Vollblut bis 6000 µM keine DNA-Strangbrüche induzierte (**Abb. 46**), zeigt sich in isolierten Lymphozyten eine Zunahme der DNA-Strangbruchrate in der höchsten eingesetzten Konzentration (6000 µM, 4 h; **Abb. 55**). Im Vergleich zu Ac ist Hex geringer genotoxisch. Die Viabilität der Lymphozyten wurde durch Hex nicht beeinflusst (> 94%).

Während Ac und Hex in humanem Vollblut vermutlich bevorzugt an entgiftende Blutbestandteilen binden [Dixit et al., 1982; Beiswanger et al., 1993; Glaab et al., 2001], ist in isolierten Lymphozyten voraussichtlich die Bindung an die DNA favorisiert, wobei zu erwarten ist, dass Ac aufgrund seiner größeren Elektrophilie effektiver an die DNA-Basen bindet als Hex.

Vergleicht man die erhaltenen Ergebnisse mit anderen *in-vitro* Daten, so ist z.B. Hex in isolierten Lymphozyten um Faktor 30-60 geringer genotoxisch als in primären Rattenhepatozyten oder adhärenten Zelllinien [Glaab et al., 2000; Janzowski et al., 2000].

Des Weiteren induziert Hex in humanen, isolierten Lymphozyten in deutlich tieferen Konzentrationen Schwesterchromatid-Austausch-Ereignissen (SCE) und Mikrokernen (5-250 µM) [Dittberner et al., 1995].

4.1.3. Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse in humanem Vollblut und isolierten Lymphozyten

Die Ergebnisse zur Induktion von DNA-Schäden in humanem Vollblut belegen die Eignung des Systems zur Prüfung der Genotoxizität von Fremdstoffen mit Hilfe des Comet Assays. Zusätzlich gibt der Vergleich mit den Resultate in isolierten Lymphozyten orientierende Hinweise auf mögliche entgiftende Interaktionen mit Blutkomponenten.

In **Tab. 9** sind die Ergebnisse zur Induktion von DNA-Schäden in humanem Vollblut und isolierten Lymphozyten zusammengefasst.

	humanes Vollblut		**isolierte Lymphozyten**	
	Induktion von DNA-Schäden (1, 2, 4 h) *		**Induktion von DNA-Schäden (1, 2, 4 h) ***	
Substanz	**- FPG**	**+ FPG**	**- FPG**	**+ FPG**
Acrylamid	inaktiv		inaktiv	inaktiv
Glycidamid	300 µM (4 h)	10 µM (4 h)	300 µM (4 h)	100 µM (1 h)
Acrolein	inaktiv		3000 µM (1 h)	3000 µM (1 h)
2-Hexenal	inaktiv		6000 µM (4 h)	6000 µM (4 h)
BPDE	30 µM (1 h)	30 µM (1 h)	n. b.	n. b.
α-Acetoxy-NDELA	10 µM (1 h)	10 µM (1 h)	n. b.	n. b.
NOZ-2	100 µM (4 h)	100 µM (4 h)	n. b.	n. b.
NOZ-5	gering aktiv	0,1 µM (1 h)	n. b.	n. b.
2-Me-NOZ-5	100 µM (4 h)	100 µM (4 h)	n. b.	n. b.
4-Me-NOZ-5	1000 µM (4 h)	100 µM (4 h)	n. b.	n. b.
MNU	100 µM (1 h)	10 µM (1 h)	n. b.	n. b.

Tab. 9: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Induktion von DNA-Schäden in Vollblut und isolierten Lymphozyten (n. b.: nicht bestimmt); * niedrigste signifikant aktive Konzentration

a) Vergleich der DNA-schädigenden Wirkung in humanem Vollblut

Die α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen AA, Ac und Hex induzieren in humanem Vollblut selbst in millimolaren Konzentrationen keine DNA-Strangbrüche. Im Gegensatz dazu, ist GA potent DNA-strangbrechend und ist nach FPG-Inkubation in gleichen Kon-

zentrationen (10µM; 4 h) aktiv wie das potente Kanzerogen (±)-BPDE oder genotoxische *N*-Nitrosoverbindungen wie MNU oder α-Acetoxy-NDELA. Bertow et al. [2007] zeigte, dass GA in humanem Vollblut ab 3 µM (4 h) an das end-ständige Valin in Hämoglobin bindet. Die Bindung von GA an Hb ist folglich unter den gewählten Bedingungen gegenüber der Reaktion mit der DNA leicht favorisiert.

Die untersuchten *N*-Nitroso-oxazolidinone zeigen in humanem Vollblut ein unterschiedliches DNA-schädigendes Potential. Während NOZ-2 und 2-Me-NOZ-5 gleichermaßen DNA-Grund- und FPG-sensitive DNA-Schäden induzieren, verursacht NOZ-5 hauptsächlich FPG-sensitive DNA-Schäden. Dagegen ist 4-Me-NOZ-5 in humanem Vollblut nur schwach DNA-strangbrechend. Anhand der Ergebnisse des Comet Assay in Kombination mit FPG sind Rückschlüsse auf die gebildeten DNA-Addukte möglich. Prinzipiell kann für die NOZ's die hauptsächliche Bildung von DNA-Addukten am N^7-G angenommen werden. Das lediglich für das methylierende / carboxymethylierende NOZ-5 das hierfür typische Schadensmuster nachzuweisen ist, hängt vermutlich mit der darüber hinaus auftretenden Bildung von Phosphotriestern zusammen. Während Methyl-Phosphotriester stabil in der DNA verbleiben, werden 2-Hydroxyethylphosphotriester spontan in DNA-Strangbrüche gespalten und überlagern somit möglicherweise den Nachweis N^7-G-bedingter DNA-Strangbrüche.

b) Vergleich der Reaktivität in Vollblut und isolierten Lymphozyten

Der Vergleich der Reaktivität ausgewählter Verbindungen in humanem Vollblut und isolierten Lymphozyten erlaubt orientierende Aussagen über deren Interaktionen mit entgiftenden Blutkomponenten.

Während die α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen in humanem Vollblut keine DNA-Schäden verursachen, sind Ac und Hex in isolierten Lymphozyten zumindest in hohen Konzentrationen DNA-strangbrechend. AA ist auch in isolierten Lymphozyten inaktiv. Dessen reaktiver Metabolit GA ist in Vollblut und isolierten Lymphozyten in vergleichbaren Konzentrationen DNA-schädigend.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Bindung von Ac und Hex an detoxifizierende Blutbestandteile in Vollblut gegenüber der Interaktion mit der DNA deutlich favorisiert ist. Dagegen ist in isolierten Lymphozyten eine ungehinderte Bindung an die DNA möglich.

4.2. Genotoxizität in V79 Zellen

Die Bestimmung der Genotoxizität von GA, den α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen Ac und Hex und der *N*-Nitrosoverbindungen MNNG, MNU, HENU sowie vier *N*-Nitroso-oxazolidinonen erfolgte in V79 Zellen vergleichend zu den Untersuchungen in Humanblut.

Neben der Untersuchung der Induktion von DNA-Strangbrüchen wurde die Kinetik deren Reduktion mit Hilfe des alkalischen Comet Assays bestimmt. Ferner sollte der Einfluss von GSH auf die Toxizität der genannten Verbindungen geprüft werden. Des Weiteren wurde durch Veränderung des pH-Wertes der Methode untersucht, welche Arten von DNA-Strangbrüchen ausgewählte Verbindungen induzieren.

Daneben sollte in V79 Zellen die Mutagenität verschiedener Verbindungen mit Hilfe des *hPRT*-Genmutations-Assays bestimmt werden. V79 Zellen tragen in ihrem Genom das auf dem X-Chromosom lokalisierte *hPRT*-Gen zur Exprimierung der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase und werden daher standardisiert im genannten Assay eingesetzt [Bradley et al., 1981; Glatt, 1993].

4.2.1. Induktion von DNA-Schäden in V79 Zellen

Zur Bestimmung der DNA-schädigenden Wirkung von α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen und GA sowie ausgewählten *N*-Nitrosoverbindungen in V79 Zellen wurden diese 4 und 24 h, in einzelnen Fällen zusätzlich für 15 Minuten und 1 h mit den Substanzen inkubiert. Es sollte damit u. a. geprüft werden, wie schnell die einzelnen Verbindungen mit der DNA interagieren und DNA-Strangbrüche induzieren. Die Quantifizierung der DNA-Strangbrüche erfolgte mit Hilfe des alkalischen Comet Assays (± FPG). Hierbei wurden nur Zellkulturen verwendet, deren Viabilität nach der Inkubation > 80% (Bestimmung mittels Trypanblau-Ausschlußtest) betrug.

4.2.1.1. Glycidamid

Die Induktion von DNA-Schäden durch GA in V79 Zellen wurde nach Inkubationszeiten von 15'-24 h untersucht (**Abb. 56**).

Nach einer Inkubation von 15 Minuten sind noch keine DNA-Strangbrüche nachweisbar. Nach 1 h ist GA ab 1000 µM, nach 4 h ab 300 µM DNA-strangbrechend. Die zusätzliche Behandlung der DNA mit FPG bewirkt in beiden Inkubationszeiten einen konzentrationsabhängigen Anstieg der DNA-Schädigung ab 100 µM (1 h) bzw. 10 µM (4 h). Die Inkubation für 24 h verursacht DNA Strangbrüche ab 100 µM.

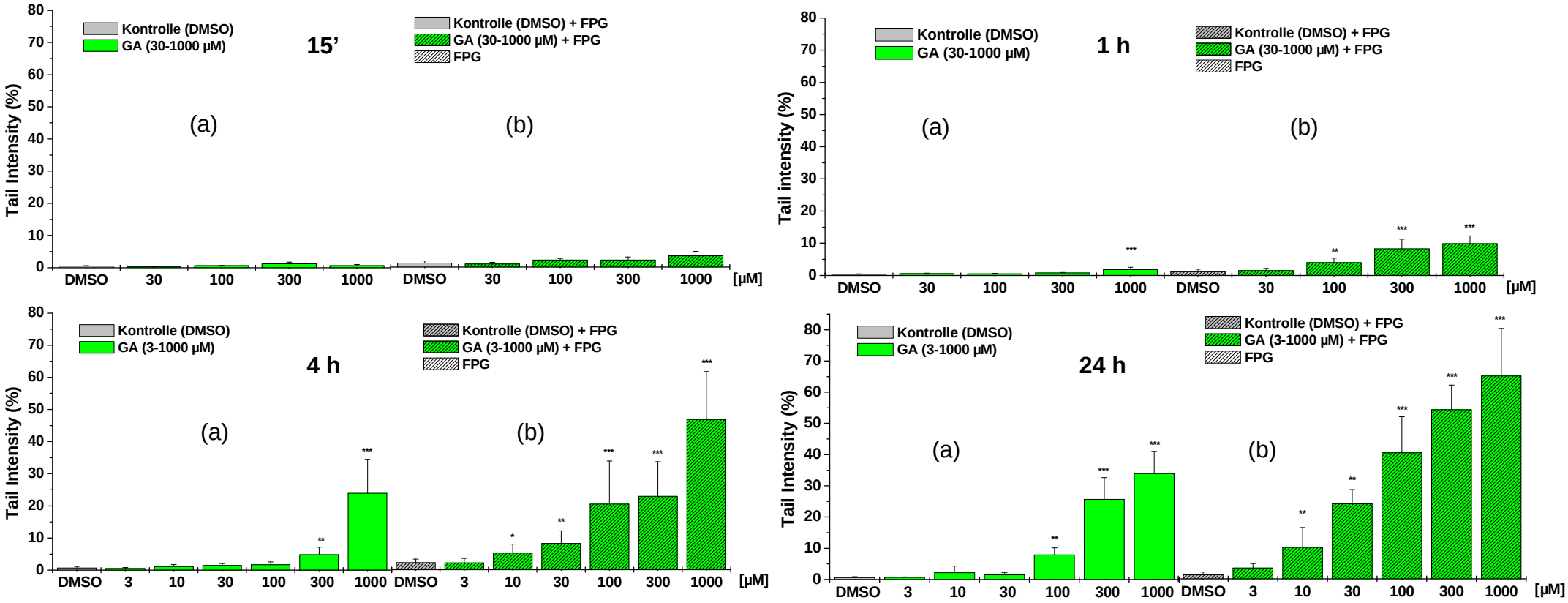


Abb. 56: Induktion von DNA-Schäden durch Glycidamid (GA) in V79 Zellen ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 15', 1, 4, 24 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(GA)=30-1000 µM (15'-1h); c(GA)=3-1000µM (4-24 h); 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001) [4, 24 h: Michael, 2006]

Eine zusätzliche Inkubation mit FPG lässt, wie nach 4-stündiger Inkubation, DNA-Schäden ab 10 µM erkennen, im Vergleich allerdings mit erhöhter Tail Intensity.
In keiner der eingesetzten Konzentrationen und Inkubationszeiten zeigten sich Einflüsse von GA auf die Viabilität der Zellen (> 91%) [Michael, 2006].
Es ist zu vermuten, dass die hauptsächlich durch GA induzierten N^7-G-Addukte [Segerbäck et al., 1995; Gamboa da Costa et al., 2003] für die DNA-Strangbrüche verantwortlich sind. Hierbei sind AP Stellen, die durch Depurinierung entstehen, einerseits als DNA-Grundschäden erkennbar, sie werden jedoch auch gemeinsam mit ring-geöffneten Purinen (FaPy) als FPG-Substrate erkannt und in zusätzliche DNA-Strangbrüche überführt.

4.2.1.2. Acrolein und Hexenal

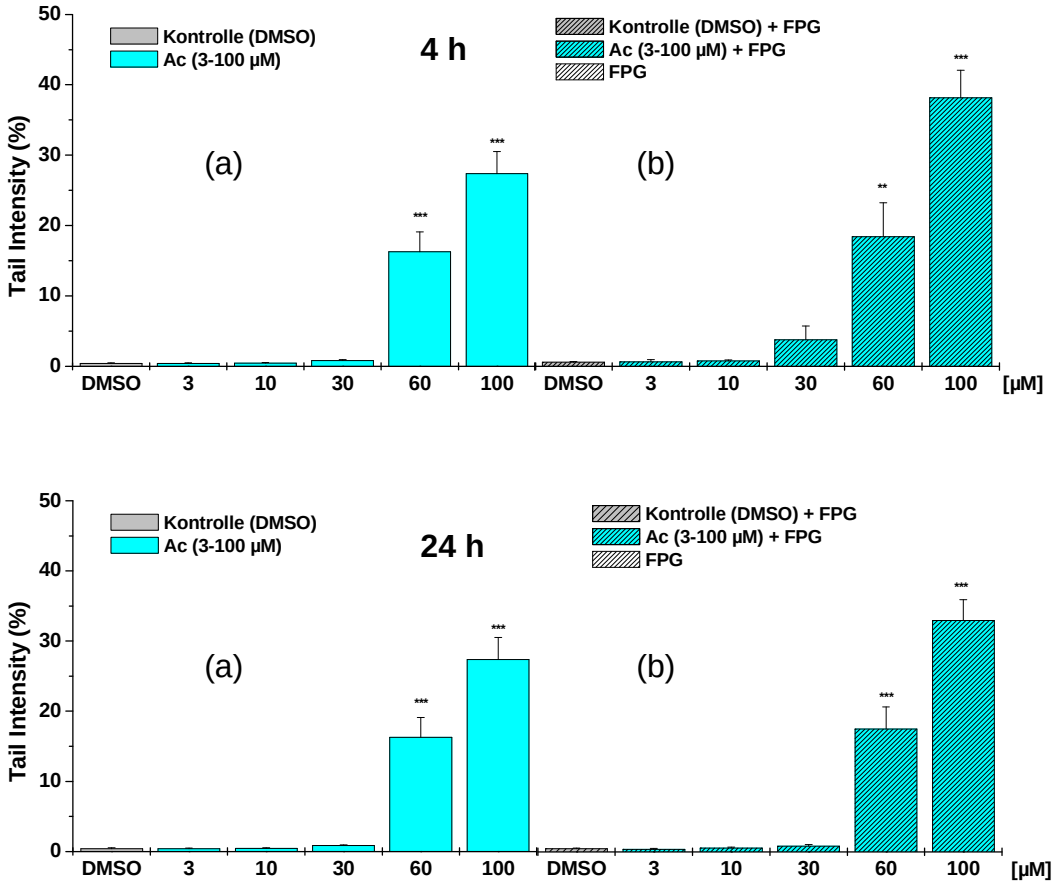


Abb. 57: Induktion von DNA-Schäden durch Acrolein (Ac) in V79 Zellen ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 4, 24 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(Ac)=3-100 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

Ac induziert in V79 Zellen ab 60 µM (4 h) DNA-Strangbrüche (**Abb. 57**). Die Induktion von DNA-Strangbrüchen nimmt konzentrationstabhängig zu. Eine zusätzliche Behandlung mit FPG bewirkt keinen weiteren Anstieg der DNA-Strangbruchrate.

Hex ist im Vergleich zu Ac erst in höheren Konzentrationen DNA-schädigend (100 µM; 4 h). Die Induktion von DNA-Schäden verläuft abhängig von Konzentration und Inkubationszeit (**Abb. 58**). Nach 24-stündiger Inkubation sind bei einer Konzentration von 1000 µM deutliche cytotoxische Effekte zu detektieren (Viabilität < 30 %).
Glaab et al. [2000] fanden nach 1-stündiger Inkubation von V79 Zellen Hex-induzierte DNA-Strangbrüche ab 150 µM.

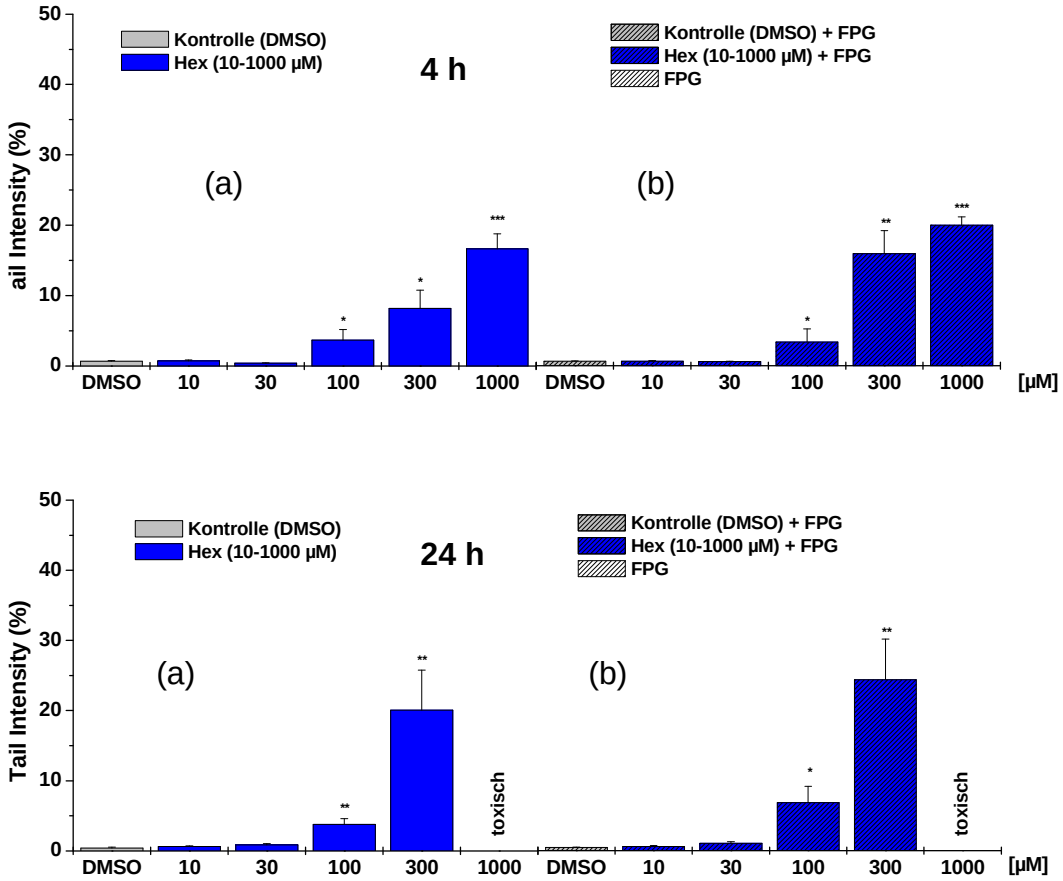


Abb. 58: Induktion von DNA-Schäden durch 2-Hexenal (Hex) in V79 Zellen ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 4, 24 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(Hex)=10-1000 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

4.2.1.3. *N*-Nitrosoverbindungen

4.2.1.3.1. *N*-Nitroso-oxazolidinone

Die untersuchten *N*-Nitroso-oxazolidinone werden durch Hydrolyse in DNA-alkylierende Intermediate überführt. Da diese Aktivierung innerhalb von kürzester Zeit erfolgt [Loeppky, persönliche Mitteilung], ist zu vermuten, dass eine Interaktion der Alkylantien mit der DNA schnell unter Bildung von DNA-Addukten erfolgt. Daher wurden für NOZ-2 und NOZ-5 die Inkubation von V79 Zellen für 15'-24 h durchgeführt.

Das potentiell 2-hydroxyethylierende NOZ-2 induziert bereits nach 15-minütiger Inkubation konzentrationsabhängig DNA-Strangbrüche ab 1 µM (**Abb. 59**). Nach einer Inkubationszeit von 1-4 h ist die höchste DNA-Schädigung durch NOZ-2 zu verzeichnen. Nach 24-stündiger Behandlung der Zellen nimmt das Ausmaß der DNA-Schädigung im gesamten Konzentrationsbereich bis 100 µM im Vergleich zu kürzeren Inkubationszeiten deutlich ab. Die zusätzliche Behandlung mit FPG führt zu keinem weiteren Anstieg der DNA-Strangbruchrate. Cytotoxische Effekte von NOZ-2 konnten anhand einer Viabilität der Zellen von >89% nicht festgestellt werden.
Vermutlich hydroxyethyliert NOZ-2 die DNA hauptsächlich an den Positionen N^7-, O^6-G sowie an der Phosphatgruppe des DNA-Rückgrates unter Bildung von 2-Hydroxyethyl-Phosphotriester, die aufgrund ihrer besonderen Instabilität spontan in DNA-Strangbrüche überführt werden [Conrad et al., 1986; Müller et al., 1987]. Diese überlagern möglicherweise den Nachweis N^7-G-bedingter DNA-Strangbrüche.

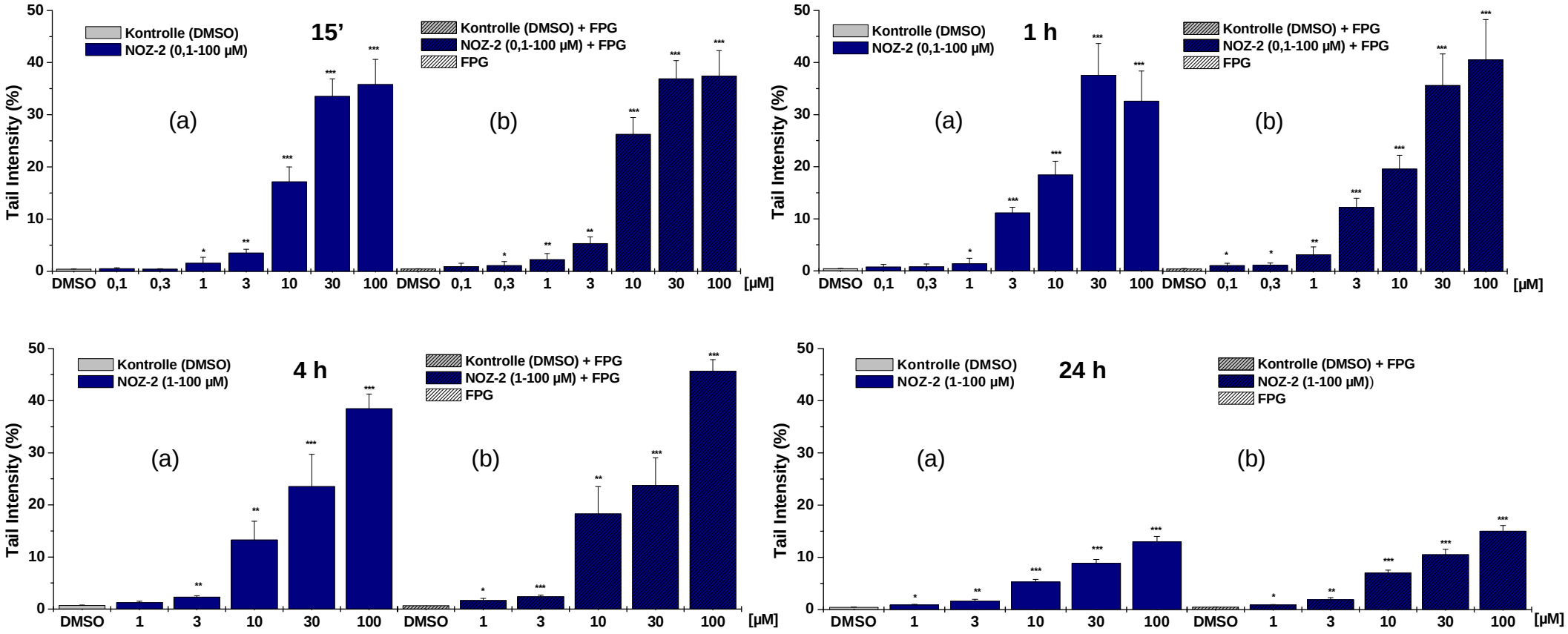


Abb. 59: Induktion von DNA-Schäden durch NOZ-2 in V79 Zellen ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 15', 1, 4, 24 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(NOZ-2)=0,1-100 µM (15'; 1 h); c(NOZ-2)=1-100 µM (4, 24 h); 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

Ähnlich wie NOZ-2 wird auch NOZ-5 schnell hydrolysiert. Die Bildung eines carboxymethylierenden / methylierenden Intermediates kann postuliert werden. Bereits nach 15 Minuten sind DNA-Strangbrüche ab 30 µM ohne FPG-Behandlung und ab 10 µM mit FPG im Comet Assay nachweisbar (**Abb. 60**). Auch NOZ-5 wirkt in V79 Zellen nicht cytotoxisch (Viabilität > 92%).

Im Vergleich zu NOZ-2 zeigt sich ein bedeutender Unterschiede. So erhöht sich die Intensität der DNA-Schädigung signifikant nach zusätzlicher Behandlung der DNA mit FPG.

Die hydrolytische Aktivierung von NOZ-5 erfolgt voraussichtlich in carboxymethylierende und / oder methylierende Diazoniumionen. Diese interagieren vermutlich mit den Positionen N^7-G und O^6-G [Harrison et al., 1997; Shuker et al., 1997; Zurlo et al., 1982] sowie mit den Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats. Methyl-Phosphotriester sind relativ stabil in der DNA und gehen nicht spontan in DNA-Strangbrüche über [Conrad et al., 1996; Müller et al., 1987]. Die Stabilität von Carboxymethyl-Phosphotriester ist in der Literatur nicht beschrieben. Die induzierten N^7-G-Addukte, unabhängig davon ob methyliert oder carboxymethyliert, werden voraussichtlich in die Folgeprodukte FaPy und AP Stellen überführt. Letztere sind dann unter den gewählten Bedingungen des Comet Assays als DNA-Grundschäden detektierbar, werden aber auch gemeinsam mit FaPy von FPG erkannt und aus der DNA als Strangbruch entfernt. Dass im Gegensatz zu NOZ-2, N^7-G-Addukte nun für NOZ-5 unter den gewählten Bedingungen mit FPG nachweisbar sind, hängt möglicherweise damit zusammen, dass die von NOZ-5 vermutlich gebildeten Methyl-Phosphotriester, wie bereits beschrieben, nicht spontan in DNA-Strangbrüche übergehen und somit im Comet Assay nicht nachweisbar sind [Conrad et al., 1986; Müller et al., 1987].

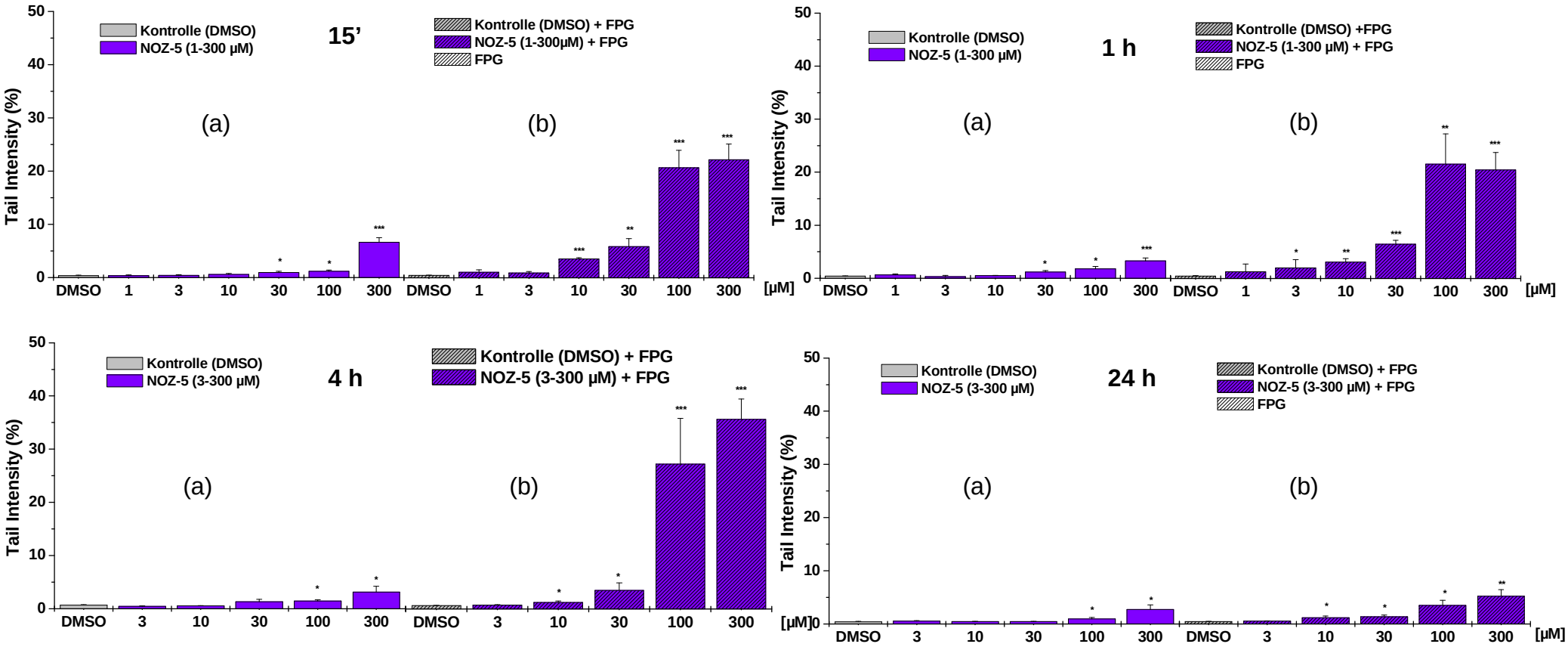


Abb. 60: Induktion von DNA-Schäden durch NOZ-5 in V79 Zellen ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 15', 1, 4, 24 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(NOZ-5)=1-300 µM (15'; 1 h); c(NOZ-5)=3-300 µM (4, 24 h); 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

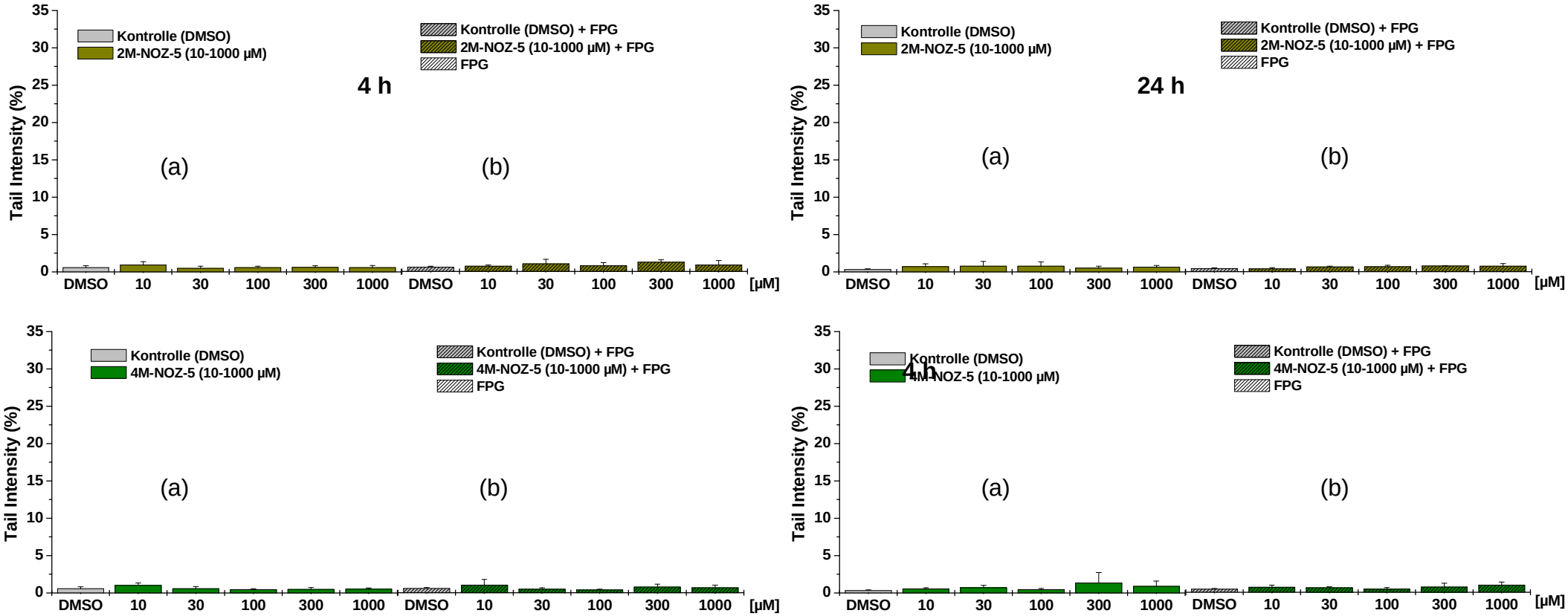


Abb. 61: Induktion von DNA-Schäden durch 2-Me-NOZ-5 und 4-Me-NOZ-5 in V79 Zellen ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=2; unabhängige Versuche; 4, 24 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(2-Me-NOZ-5)=10-1000 µM; 1% DMSO)

Die beiden methylierten NOZ-5-Analoga 2-Me- und 4-Me-NOZ-5 induzieren in V79 Zellen in keiner der eingesetzten Konzentrationen (4 bzw. 24 h) DNA-Strangbrüche. Beide Verbindungen sind in V79 Zellen nicht cytotoxisch (Viabilität > 91%).

4.2.1.3.2. *N*-Nitrosoharnstoffe

Als Vertreter der *N*-Nitrosoharnstoffe wurden 1-Methyl-1-nitrosoharnstoff (MNU) und 1-(2-Hydroxyethyl)-1-nitrosoharnstoff (HENU) untersucht. Beide Verbindungen werden durch Hydrolyse in DNA-alkylierende Agentien überführt. MNU zerfällt in ein Methyl-Diazoniumion [Smith et al., 1988; Wurdeman et al., 1989; Fong et al., 1990], HENU wird in ein 2-Hydroxyethyl-Diazoniumion gespalten.

MNU induziert bereits nach 15-minütiger Inkubation ab 300 µM DNA-Strangbrüche (**Abb. 62)**. Die DNA-Schädigung durch MNU ist nach Inkubationszeiten von 1-4 h maximal.
Es zeigt sich weiterhin eine deutliche Zunahme der DNA-Strangbruchrate nach zusätzlicher FPG-Behandlung. Dabei ist zu beachten, dass in den beiden nicht cytotoxischen Konzentrationen 300 bzw. 1000 µM (Viabilität > 85%) nach 1 und 4 h die zusätzliche Inkubation mit FPG zu einer nahezu vollständigen Fragmentierung der DNA führt. Eine Ermittlung der Tail Intensity war dadurch nicht mehr möglich.
Nach 24-stündiger Inkubation sinkt das DNA-schädigende Potential von MNU. In den beiden höchsten Konzentrationen ist die Tail Intensity nach FPG-Behandlung wieder ermittelbar.

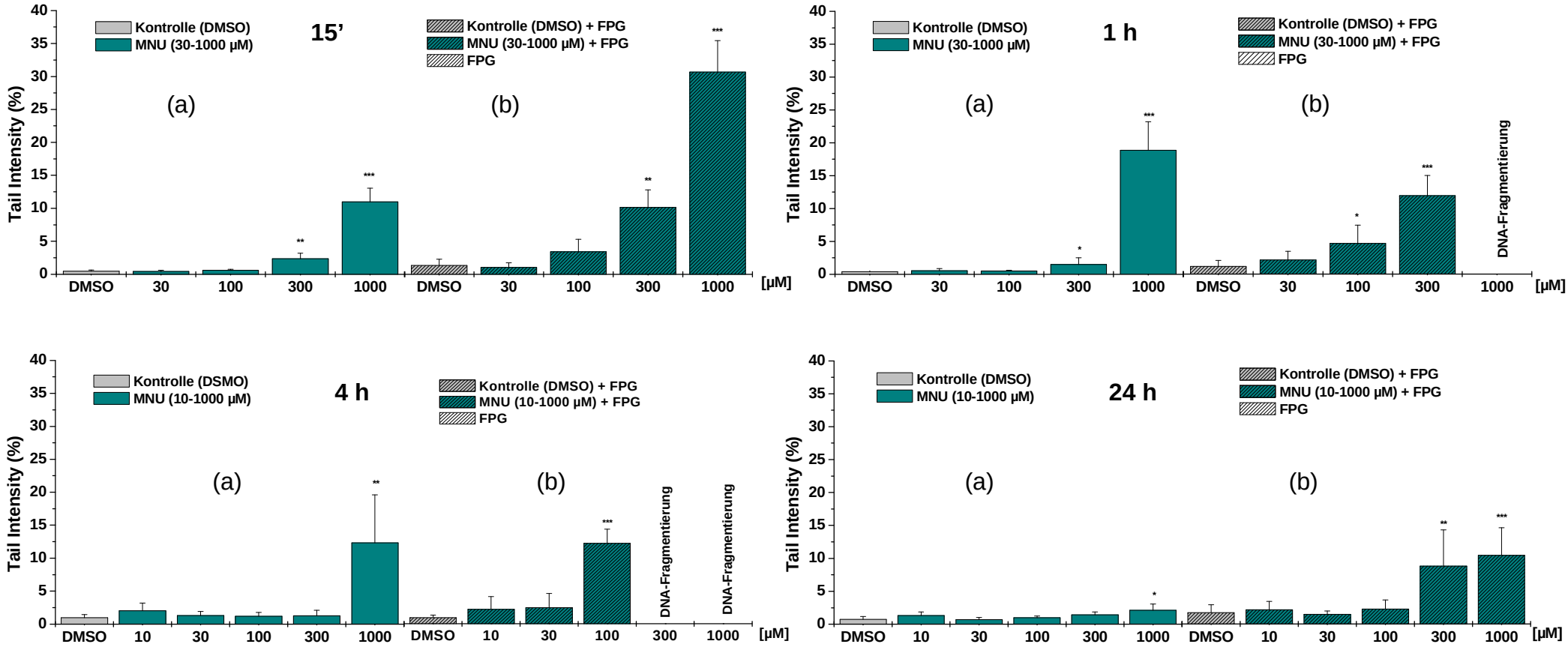


Abb. 62: Induktion von DNA-Schäden durch N-Methyl-N-Nitroso-harnstoff (MNU) in V79 Zellen ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=2-3; unabhängige Versuche; 15', 1, 4, 24 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(MNU)=30-1000 µM (15'; 1 h); c(MNU)=10-1000 µM (4, 24 h); 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

Das 2-hydroxyethylierende HENU schädigt die DNA ähnlich schnell wie MNU. Auch hier können DNA-Strangbrüche ab 100 µM schon 15 Minuten nachgewiesen werden (**Abb. 63**). Im Gegensatz zu MNU ist nach Inkubation mit HENU der Unterschied zwischen Grund- und FPG-sensitiven DNA-Schäden nicht signifikant. Die Inkubation von V79 Zellen mit HENU bewirkt im nicht-cytotoxischen Bereich (Viabilität > 94%) keinen weiteren Anstieg der DNA-Strangbruchrate.

Nach Inkubation von 4 h ist das höchste DNA-schädigende Potential durch HENU zu verzeichnen. Auch HENU ist nach 24 h Inkubation schwächer DNA-strangbrechend als in kürzeren Inkubationszeiten.

Die Reaktivität von HENU ist im Wesentlichen mit der des potentiell 2-hydroxyethylierenden NOZ-2 vergleichbar. Beide zeigen eine ähnliche Zeitabhängigkeit sowie einen nur geringen Unterschied zwischen DNA-Grundschäden und FPG-sensitiven DNA-Schäden, allerdings ist NOZ-2 bereits in 10-30-fach höheren Konzentrationen aktiv.

MNU und HENU alkylieren die DNA hauptsächlich an der N^7-Position von Guanin [Beranek et al., 1980; Wurdeman et al., 1989]. Eine DNA-Adduktbildung am O^6 des Guanins konnte ebenfalls beobachtet werden. Für beide Verbindungen ist des Weiteren die Möglichkeit der Interaktion mit des Phosphat-Gruppen des DNA-Rückgrates beschrieben [Conrad et al., 1986; Müller et al., 1987]. Ein bedeutender Unterschied liegt allerdings in der Stabilität der daraus resultierenden Phosphotriester. Während die durch MNU induzierten Methyl-Phosphotriester äußerst stabil sind, zerfallen die von HENU gebildeten 2-Hydroxyethyl-Phosphotriester innerhalb kurzer Zeit in DNA-Strangbrüche [Conrad et al., 1986; Müller et al., 1987]. Die durch MNU induzierten DNA-Strangbrüche beruhen demnach hauptsächlich auf der Bildung von N^7-G-Addukten. Im Gegensatz dazu, wird deren Nachweis im Fall von HENU vermutlich durch DNA-Strangbrüche aus instabilen Phosphotriestern überlagert.

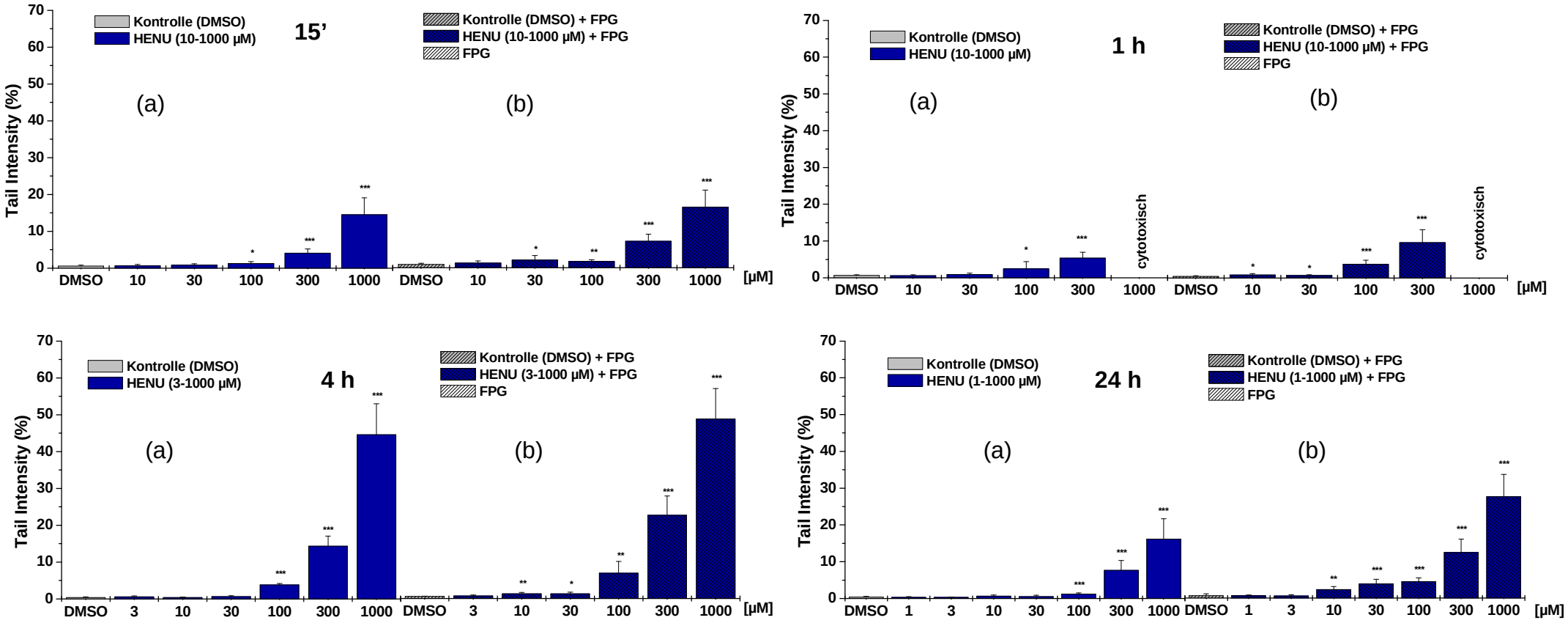


Abb. 63: Induktion von DNA-Schäden durch N-(2-hydroxyethyl)-N-nitroso-harnstoff (HENU) in V79 Zellen ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 15', 1, 4, 24 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(HENU)=10-1000 µM (15'; 1 h); c(HENU)=3-1000 µM (4 h); c(HENU)=1-1000 µM (24 h); 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

4.2.1.3.3. N-Methyl-N'-Nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)

MNNG wird durch nicht-enzymatische Interaktion mit Thiol-Gruppen (Deaminierung) in ein reaktives Methyl-Diazoniumion überführt [Lawley et al., 1970], welches dann wiederum mit der DNA bevorzugt an die N^7-Position, aber auch an O^6 des Guanins bindet. Ähnlich wie bei MNU kann auch für MNNG die Bildung von Methyl-Phosphotriester angenommen werden, welche wiederum äußerst stabil sind.
Die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch MNNG wurde nach Inkubationszeiten von 4 und 24 h ermittelt.

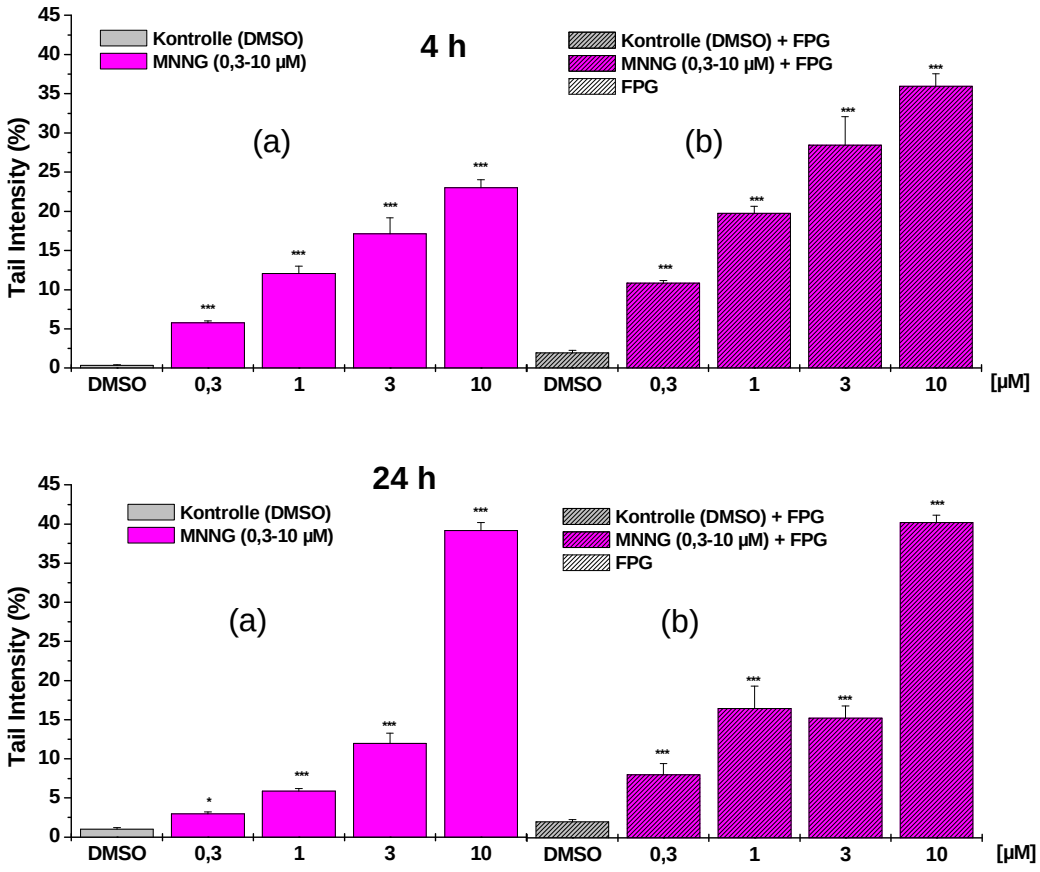


Abb. 64: Induktion von DNA-Schäden durch N-Methyl-N'-Nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) in V79 Zellen ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 4, 24 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(MNNG)=0,3-10 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

MNNG ist in V79 Zellen bereits ab der niedrigsten eingesetzten Konzentration (0,3 µM; 4 und 24 h) signifikant DNA-strangbrechend (**Abb. 64**). Die DNA-Strangbruchrate wird durch zusätzliche FPG-Behandlung der DNA gering erhöht. Mit Ausnahme der höchsten Konzentration ist MNNG nach 24-stündiger Inkubation schwächer DNA-schädigend. Cy-

totoxische Effekte konnten durch Ermittlung einer Viabilität von > 87% nicht nachgewiesen werden.

MNNG ist unter den hier gewählten Bedingungen aktiver als in der Literatur beschrieben. Slamenova et al. [1997] fanden einen signifikanten Anstieg der DNA-Strangbruchrate nach Inkubation von V79 Zellen mit MNNG ab 6 µM (2 h).

Die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch MNNG ist vermutlich auf die Bildung von N^7-Methyl-G-Addukten [Horvathova et al., 1999] zurückzuführen. Es ist zu erwarten, dass die ebenfalls gebildeten, stabilen O^6-G-Addukte und Methyl-Phosphotriestern nicht zur DNA-Strangbruch-Induktion von MNNG beitragen.

4.2.2. Kinetik der Abnahme von DNA-Schäden in V79 Zellen

Das Auftreten von Mutationen ist mit der unzureichenden oder fehlenden Reparatur von DNA-Addukten wesentlich verbunden. Sind DNA-Reparaturmechanismen überlastet oder fehlen vollkommen, erhöht sich das Risiko einer Mutation durch Weitergabe der fehlerhaften Information an die Tochterzelle.

Mit Hilfe eines zweistufigen Inkubationsmodells, in dem V79 Zellen für 4 resp. 24 h mit DNA-schädigenden Verbindungen serumfrei inkubiert und anschließend für 8 h mit serumhaltigem Zellkulturmedium nachbehandelt wurden, ist es möglich, die Abnahme von DNA-Schäden im anschließend durchgeführten alkalischen Comet Assay (± FPG) zu verfolgen. Somit lassen sich orientierende Aussagen darüber treffen, wie effektiv DNA-Schäden repariert werden und inwiefern dies mit der Induktion von *hPRT*-Mutationen (vgl. **4.2.3**) zusammenhängt.

Mertes [2003] zeigte, dass GA ab 800 µM signifikant Mutationen am *hPRT*-Locus von V79 Zellen induziert. Dagegen sind DNA-Strangbrüche bereits ab 10-100 µM feststellbar (vgl. **Abb. 56**). Durch Bestimmung der Abnahme von GA-induzierten DNA-Schäden konnte Michael [2006] zeigen, dass in Konzentrationen <800 µM die durch GA induzierten DNA-Schäden nahezu vollständig repariert werden, und erst in höheren Konzentrationen ein Teil der DNA-Schäden auch nach 8-stündiger Nachkultivierung noch signifikant erhöht ist.

Im Folgenden sind die Ergebnisse zur Kinetik der Abnahme von DNA-Schäden durch NOZ-2 und NOZ-5 sowie zu HENU nach 4- und 24-stündiger Inkubation dargestellt. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die Tail Intensity nach 4 bzw. 24-stündiger Inkubation ohne Nachbehandlung.

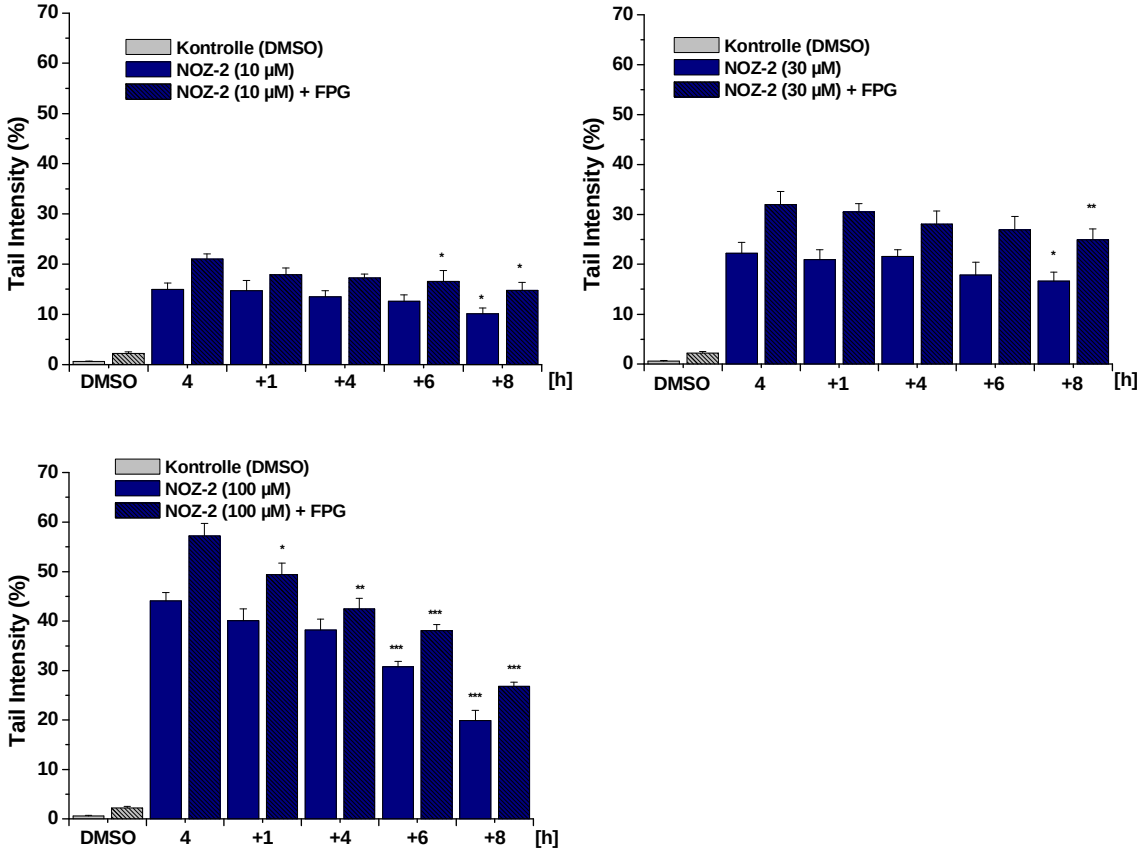


Abb. 65: Kinetik der Abnahme von NOZ-2-induzierten DNA-Schäden (4 h Inkubation) in V79 Zellen durch Nachbehandlung der inkubierten Zellen mit serumhaltigem Zellkulturmedium (0-8 h) ohne (unschraffiert) und mit (schraffiert) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; alkalischer Comet Assay; c(NOZ-2)=10-100 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001) [Michael, 2006]

Die bis zu 8-stündige Nachbehandlung von NOZ-2-behandelten V79 Zellen (4 h Inkubation; **Abb. 65**) zeigt eine zeitabhängige Abnahme der DNA-Schäden mit und ohne zusätzliche FPG-Behandlung. Die Reduktion ist ab einer Nachbehandlungszeit von 4-8 h signifikant, ein Rückgang auf das Niveau der mitgeführten Negativkontrolle DMSO kann nicht festgestellt werden. Vielmehr entsprechen die nach 8-stündiger Nachkultivierung erhaltenen Werte der Tail Intensity den Daten zur Induktion von DNA-Strangbrüchen nach 24-stündiger Inkubation (vgl. **Abb. 59**). Dies deutet darauf hin, dass im Verlauf einer 24-stündigen Inkubation von V79 Zellen mit NOZ-2 bereits Reparaturprozesse ablaufen.

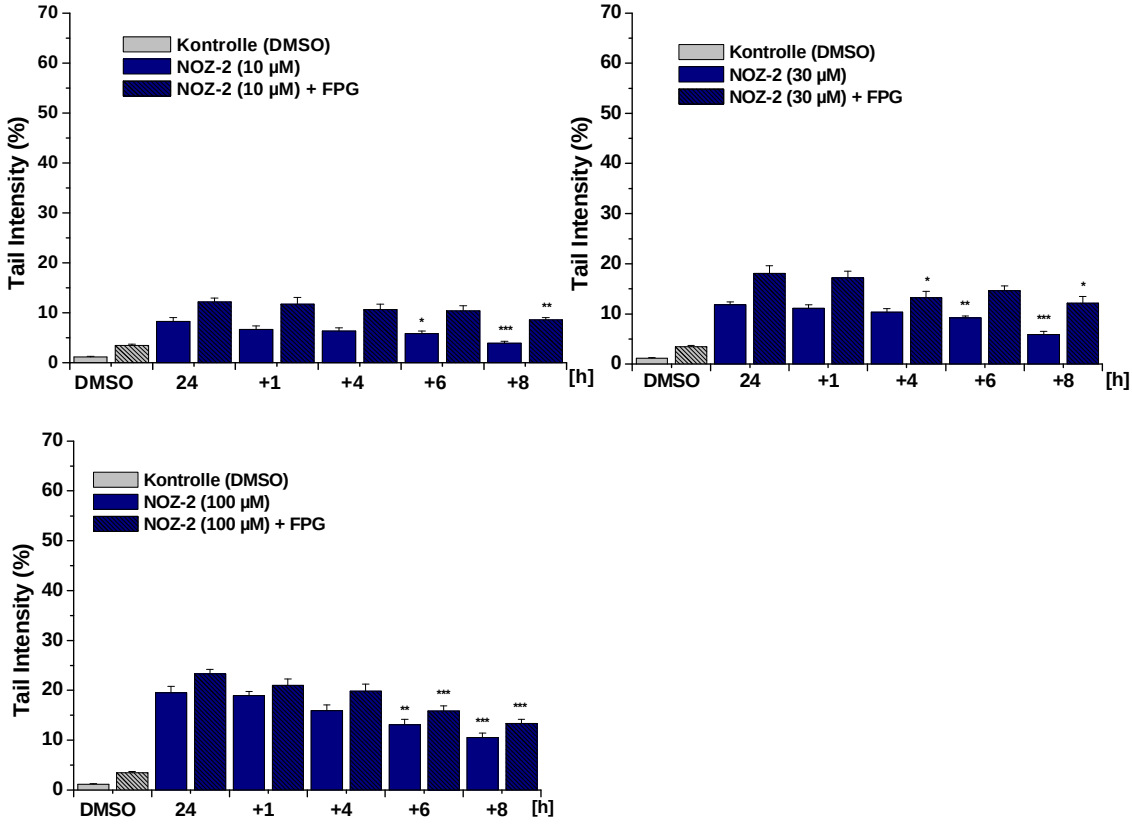


Abb. 66: Kinetik der Abnahme von NOZ-2-induzierten DNA-Schäden (24 h Inkubation) in V79 Zellen durch Nachbehandlung der inkubierten Zellen mit serumhaltigem Zellkulturmedium (0-8 h) ohne (unschraffiert) und mit (schraffiert) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; alkalischer Comet Assay; c(NOZ-2)=10-100 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001) [Michael, 2006]

Auch nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit NOZ-2 (**Abb. 66**) führt die anschließende Nachkultivierung in serumhaltigem Zellkulturmedium nicht zu einer effektiven Reduktion der DNA-Strangbruchrate.

Da NOZ-5 in V79 Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h nur noch ein geringes Maß an detektierbaren DNA-Schäden verursacht (vgl. **Abb. 60**), wurde die Kinetik der Reduktion von DNA-Schäden nur nach einer Inkubationszeit von 4 h verfolgt (**Abb. 67**).
In den Konzentrationen 30 und 100 µM können NOZ-5-induzierte DNA-Schäden (± FPG) innerhalb der Nachkultivierungszeit von 8 h bis auf das Niveau der Negativkontrolle reduziert werden. Erst ab 300 µM ist nach 8 h noch eine deutlich gegenüber DMSO erhöhte DNA-Strangbruchrate nachweisbar.

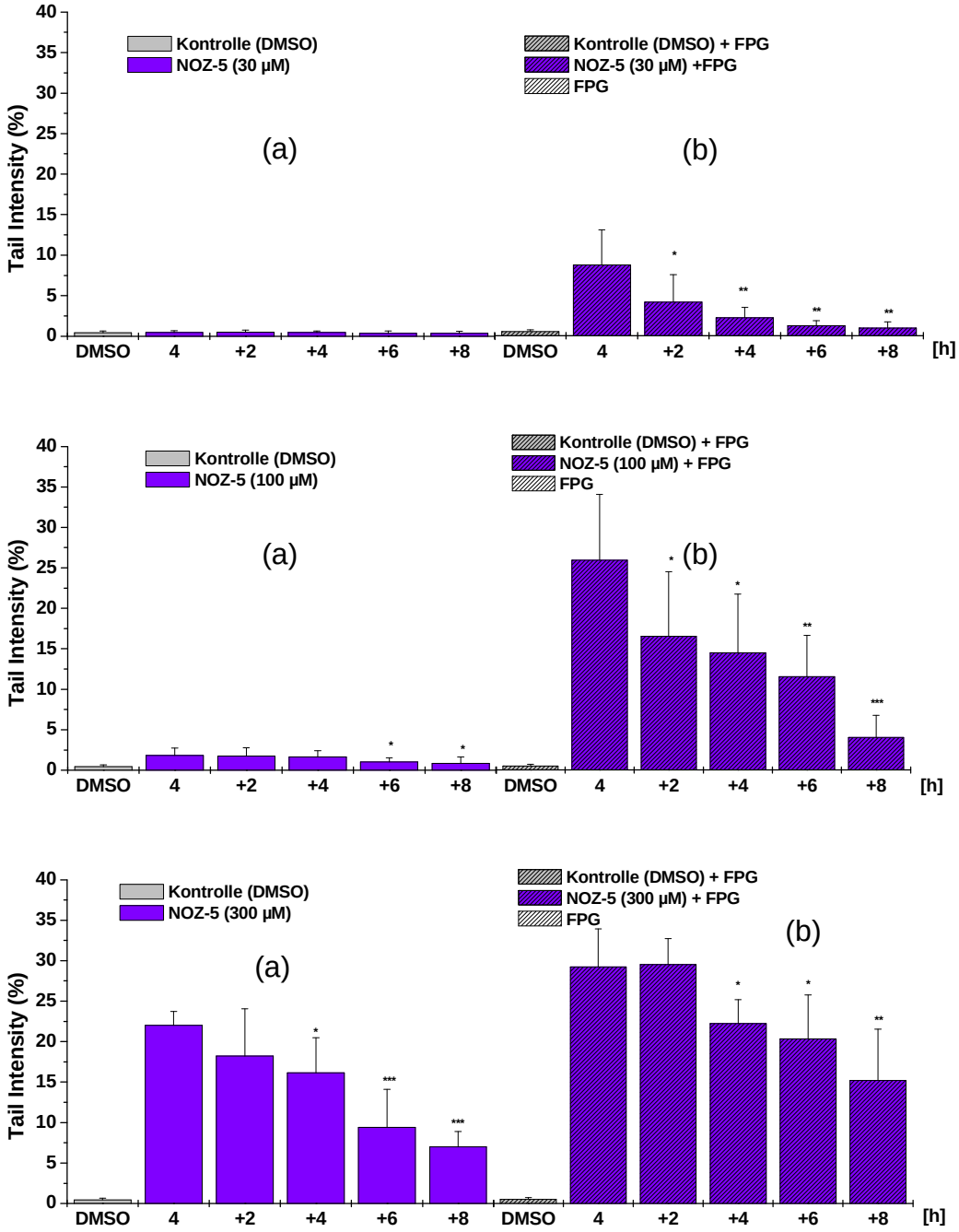


Abb. 67: Kinetik der Abnahme von NOZ-5-induzierten DNA-Schäden (4 h Inkubation) in V79 Zellen durch Nachbehandlung der inkubierten Zellen mit serumhaltigem Zellkulturmedium (0-8 h) ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; alkalischer Comet Assay; c(NOZ-5)=30-300 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

Auch hier entsprechen die DNA-Strangbruchrate nach 8-stündiger Nachkultivierung annähernd den Daten der Induktion von DNA-Schäden nach 24 h Inkubation von V79 Zellen mit NOZ-5 (vgl. **Abb. 60**). Es ist daher anzunehmen, dass nach schneller Induktion

von DNA-Strangbrüchen, diese bereits innerhalb der 24-stündigen Inkubationszeit repariert werden und die DNA-Strangbruchrate somit minimiert wird.

Nach 4-stündiger Inkubation werden HENU-induzierte DNA-Schäden in Konzentrationen bis 300 µM innerhalb der Nachkultivierungszeit von 8 h nahezu bis auf das Niveau der Negativkontrolle reduziert (**Abb. 68)**. Ab 1000 µM ist die DNA-Schädigung auch nach 8 h immer noch signifikant erhöht.

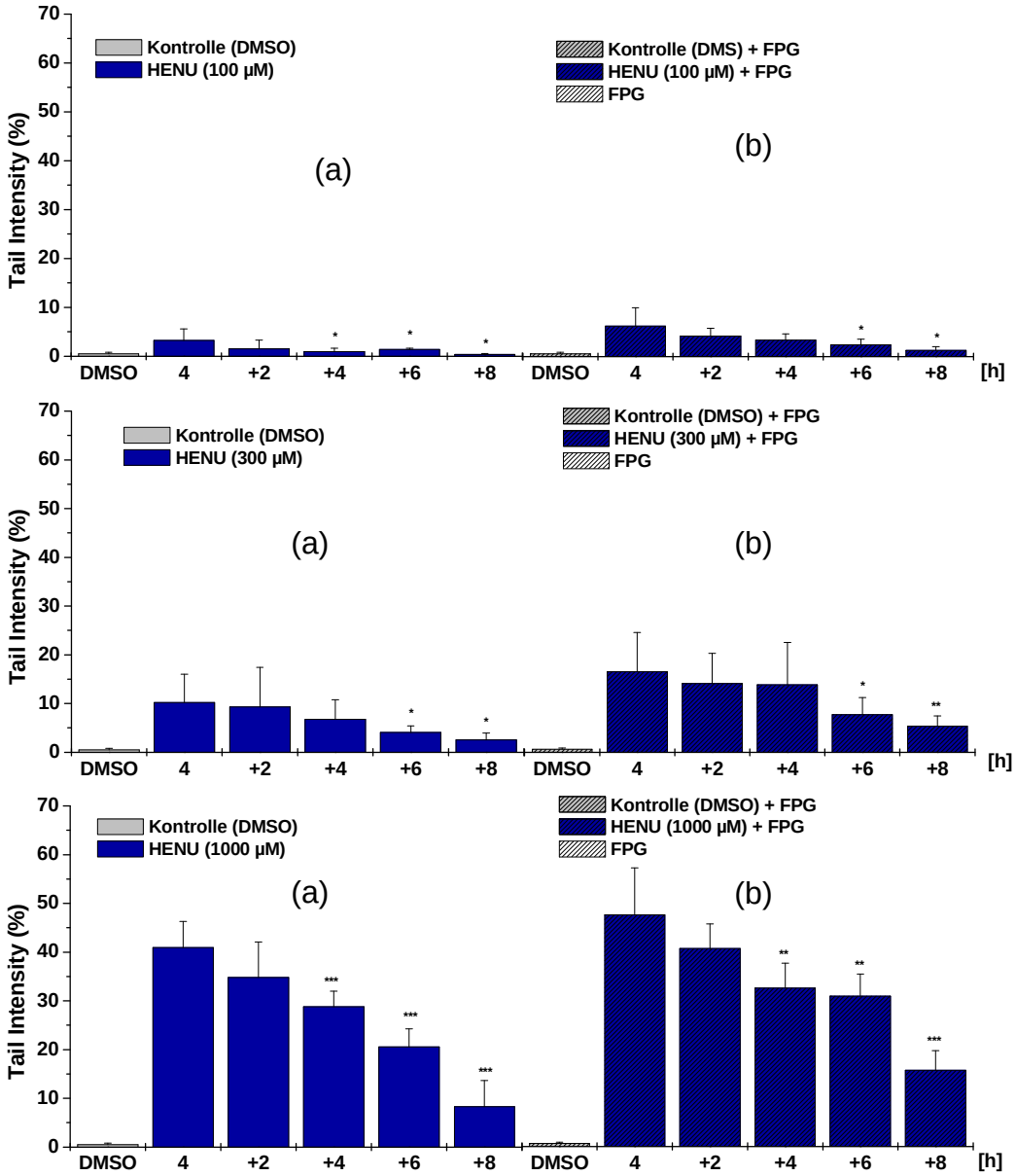


Abb. 68: Kinetik der Abnahme von HENU-induzierten DNA-Schäden (4 h Inkubation) in V79 Zellen durch Nachbehandlung der inkubierten Zellen mit serumhaltigem Zellkulturmedium (0-8 h) ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; alkalischer Comet Assay; c(HENU)=100-1000 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

Auch bei HENU entsprechen die in **Abb. 68** gezeigten DNA-Strangbruchraten nach 8-stündiger Nachkultivierung annähernd den Werten zur Induktion von DNA-Strangbrüchen nach 24-stündiger Inkubation von V79 Zellen mit HENU (vgl. **Abb. 63**). Dies deutet auf eine während der Inkubation ablaufende Reparatur HENU-induzierter DNA-Strangbrüche und folglich der Reduktion der DNA-Strangbruchrate hin.

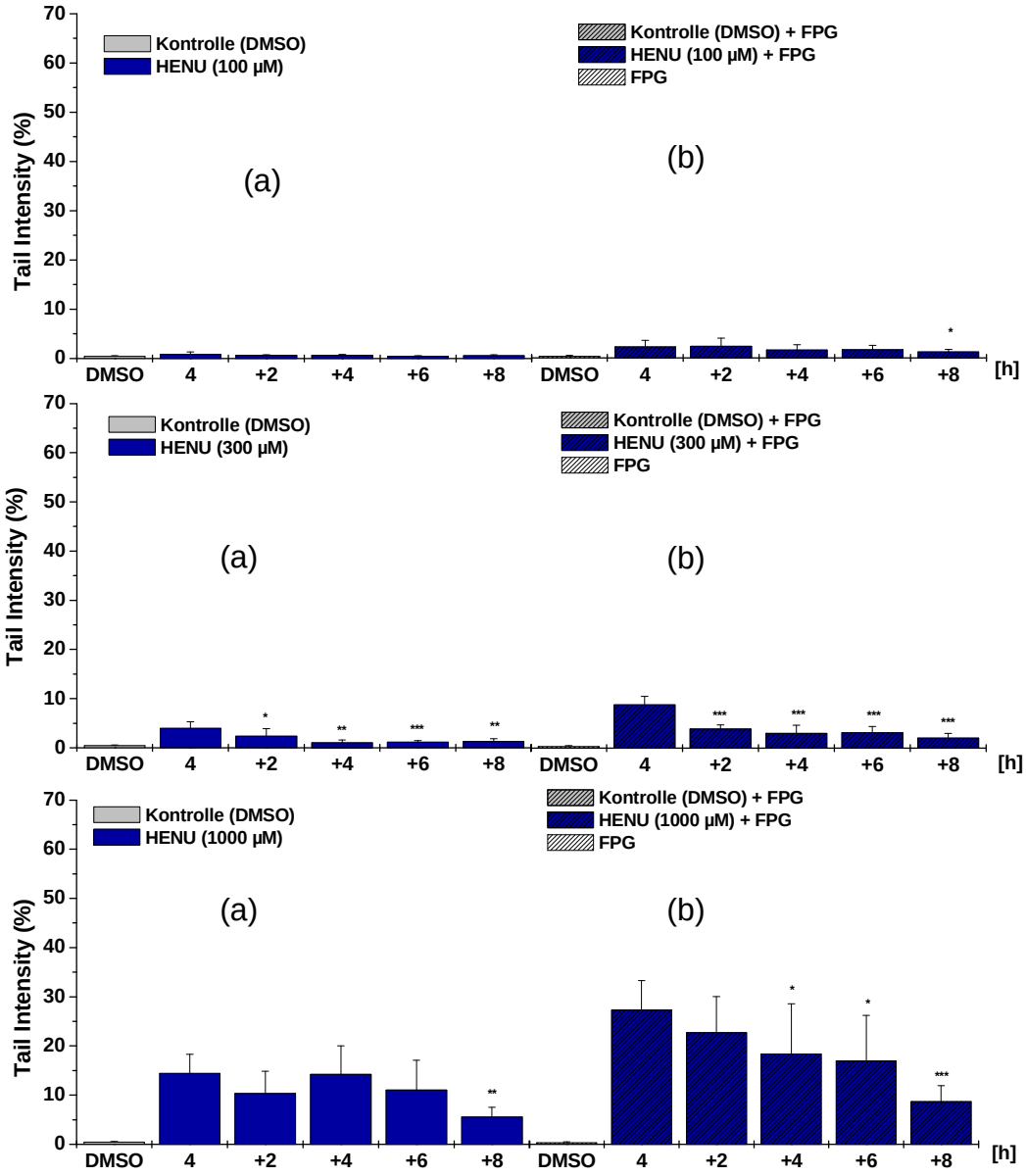


Abb. 69: Kinetik der Abnahme von HENU-induzierten DNA-Schäden (24 h Inkubation) in V79 Zellen durch Nachbehandlung der inkubierten Zellen mit serumhaltigem Zellkulturmedium (0-8 h) ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; alkalischer Comet Assay; c(HENU)=100-1000 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

Die Reduktion von DNA-Strangbrüchen nach 24-stündiger Inkubation mit HENU verläuft innerhalb der Nachkultivierungszeit von 8 h in den Konzentrationen 100 und 300 µM effektiv bis auf Kontrollniveau (**Abb. 69**). Ab 1000 µM ist die DNA-Strangbruchrate nach 8 h signifikant gegenüber der Negativkontrolle erhöht.

4.2.3. Induktion von Mutationen am *hPRT*-Locus in V79 Zellen

Das mutagene Potential von AA und GA wurde bislang in mehreren Studien untersucht. In Abhängigkeit der gewählten Bedingungen zeigten sich allerdings unterschiedliche Ergebnisse. So konnte in Lymphomzellen (L5178Y/TK+/-) der Maus die Induktion von Mutationen am *tk* (Thymidin-Kinase)- und *hPRT* (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase)-Gen durch AA [Moore et al., 1987; Dearfield et al., 1995] gezeigt werden. Im Gegensatz dazu, konnten am *hPRT*-Locus in V79H3 Zellen des Chinesischen Hamsters keine Mutationen durch AA nachgewiesen werden [Tsuda et al., 1993]. Auch in V79 Zellen induziert AA keine *hPRT*-Mutationen [Mertes, 2003].

GA ist sowohl mutagen am *tk*-Locus in Maus-Lymphomzellen [Dearfield et al., 1995] als auch am *hPRT*-Locus in V79 Zellen ab 800 µM [Mertes, 2003]. In V79 Zellen induziert GA demnach erst in 80-fach höheren Konzentrationen *hPRT*-Mutationen als DNA-Schäden (vgl. **Abb. 56**).

Zur Einstufung des genotoxischen Potentials von AA und GA wurden Verbindungen, die im Comet Assay in V79 Zellen oder Vollblut ein signifikantes DNA-schädigendes Potential aufwiesen, auf ihre Mutagenität am *hPRT*-Locus in V79 Zellen geprüft. Die Zellen wurden dazu 24 h mit der entsprechenden Verbindung inkubiert und anschließend nach dem Protokoll des *hPRT*-Genmutations-Assays behandelt.

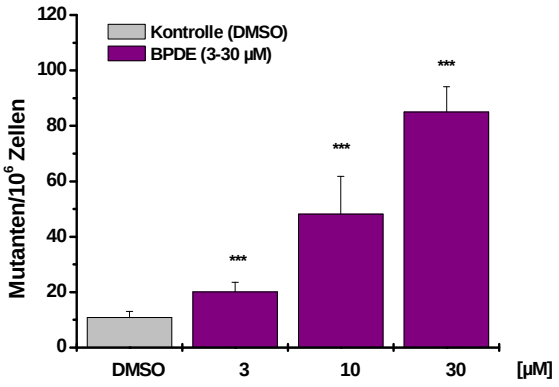


Abb. 70: Induktion von *hPRT*-Mutationen in V79 Zellen durch (±)-anti-BPDE (n=3; unabhängige Versuche; 24 h Inkubation; c(BPDE)=3-30 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

Das potente Kanzerogen (±)-anti-BPDE (**Abb. 70**) induziert bereits ab der niedrigsten eingesetzten Konzentration (3 µM) signifikant *hPRT*-Mutationen in V79 Zellen (D_{3C}-Wert 7 µM). Die Viabilität der Zellen wurde durch (±)-anti-BPDE in den getesteten Konzentrationen nicht beeinflusst (> 98%). Im Vergleich zu GA ist (±)-anti-BPDE somit ca. 300-fach mutagener in V79 Zellen und induziert Mutationen sowie DNA-Strangbrüche (30 µM, 1 h) im gleichen Konzentrationsbereich.

Das Ergebnis ist mit Literaturdaten vergleichbar. Hanelt et al. [1997] zeigten nach Kurzzeitinkubation von humanen fibroblastoiden Zellen (MRC5CV1) in gleichen Konzentrationen eine Induktion von DNA-Strangbrüchen im Comet Assay sowie *hPRT*-Mutagenität von (±)-anti-BPDE. Im Gegensatz dazu, induziert (+)-anti-BPDE, welches unter den BPDE-Isomeren die höchste Mutagenität und DNA-Bindungsaffinität aufweist, 8-Azaguanin-resistente Kolonien in 10-fach geringeren Konzentrationen [Wood et al., 1977; Huberman et al., 1976].

Die Interaktion von BPDE mit der DNA führt zur hauptsächlichen Bildung stabiler N^2-G-Addukte, so genannter „bulky adducts“ [Cheng et al., 1989; Peltonen et al., 1995; Geacintov et al., 1997]. In deutlich geringeren Anteilen werden instabile Addukte, wie z.B. an den Positionen N^7-G und N^3-A [Ochi et al., 1986] gebildet. Während letztere schnell und effektiv durch Enzyme der Base Excision Reparatur (BER) repariert werden [Braithwaite et al., 1998; 1999], werden N^2-G-Addukte mittels Nukleotid-Excisions-Reparatur (NER) aus der DNA entfernt [Gunz et al., 1996; McLeod et al., 1991; Yang et al., 1982]. Die NER verläuft im Vergleich zur BER relativ langsam [Braithwaite et al., 1998; 1999], wodurch sich das Risiko einer Persistenz nicht reparierter Läsionen in der DNA erhöht. Diese geschädigten Nukleotide können folglich während der Replikation zur Bildung von Mutationen beitragen [Suzuki et al., 2002].

Die Entstehung von BPDE-induzierten Mutationen im Verlauf des Zellzyklus resultiert zu einem 3-fach höheren Maße aus der frühen S-Phase als aus der frühen G1-Phase. Somit ist möglicherweise die S-Phasen-Replikation verantwortlich für das Auftreten von Mutationen, da hier im Vergleich zur G-Phase nur wenige Addukte repariert werden können [Chen et al., 1990]. Des Weiteren haben BPDE-induzierte Mutationen Einfluss auf das Tumor-Suppressor-Gen p53 [Denissenko et al., 1996], welches für die globale Genom Reparatur (GGR) von NER bedeutend ist [Lloyd et al., 2000]. p53 besitzt die Eigenschaft, veränderte genomische DNA zu erkennen und den Zellzyklus so lange zu stoppen, bis der Schaden repariert wurde oder der programmierte Zelltod (Apoptose) stattgefunden hat [Hartwell et al., 1995].

Neben der Reparatur der BPDE-induzierten DNA-Schäden sind auch die Art der betroffenen DNA-Sequenz sowie die lokale Konformation der Addukt-Stelle bedeutend für die

Mutagenität [Lobanenkov et al., 1986; Rill et al., 1990; Jenström et al., 1994; Wei et al., 1995; Jelinsky et al., 1995; Huang et al., 2003].

α-Acetoxy-NDELA zeigt ein zu (±)-anti-BPDE vergleichbares mutagenes Potential in V79 Zellen (**Abb. 71**). Ab 10 µM (Viabilität > 97%) sind *hPRT*-Mutationen nachweisbar (D_{3C}-Wert 9 µM). Analog zu (±)-anti-BPDE induziert das DNA-hydroxyethylierende α-Acetoxy-NDELA im gleichen Konzentrationsbereich DNA-Strangbrüchen sowie *hPRT*-Mutationen (10 µM, 1 h) und ist um Faktor 80 mutagener als GA.

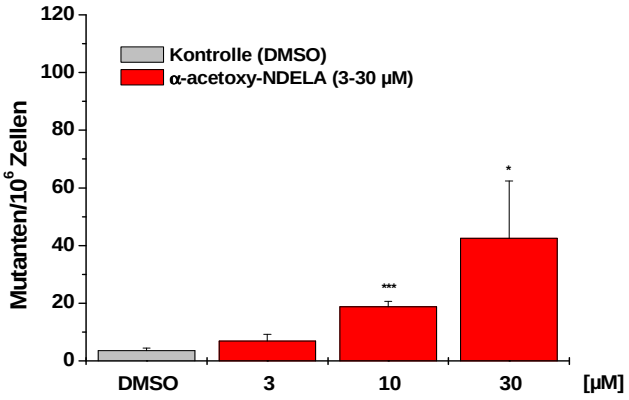


Abb. 71: Induktion von *hPRT*-Mutationen in V79 Zellen durch α-Acetoxy-NDELA (n=3-5; unabhängige Versuche; 24 h Inkubation; c(α-Acetoxy-NDELA)=3-30 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

α-Acetoxy-NDELA wird in ein 2-Hydroxyethyl-Diazoniumion hydrolysiert [Dennehy et al., 2005; Loeppky et al., 2005], welches mit den Guanin-Basen der DNA an den Positionen N^7 und O^6 sowie den Phosphodiestern des DNA-Rückgrates interagiert. Während die instabilen N^7-2-hydroxyethyl-G-Addukte [Christmann et al., 2003 (rev.); Schärer, 2003] sowie die aus den 2-Hydroxyethyl-Phosphotriestern resultierenden DNA-Strangbrüche vermutlich effektiv repariert werden, verbleiben die Läsionen am O^6-G in den MGMT-defizienten V79 Zellen in der DNA [Yarosh et al., 1985]. Neben nicht reparierten instabilen DNA-Modifikationen sind somit vermutlich hauptsächlich die promutagenen Addukte am O^6-G für das mutagene Potential von α-Acetoxy-NDELA verantwortlich.

NOZ-2 (**Abb. 72**) induziert signifikant *hPRT*-Mutationen ab 3 µM (D_{3C}-Wert 2,2 µM; Viabilität > 97%). NOZ-2 ist im gleichen Konzentrationsbereich mutagen wie das ebenfalls DNA-hydroxyethylierende α-Acetoxy-NDELA.

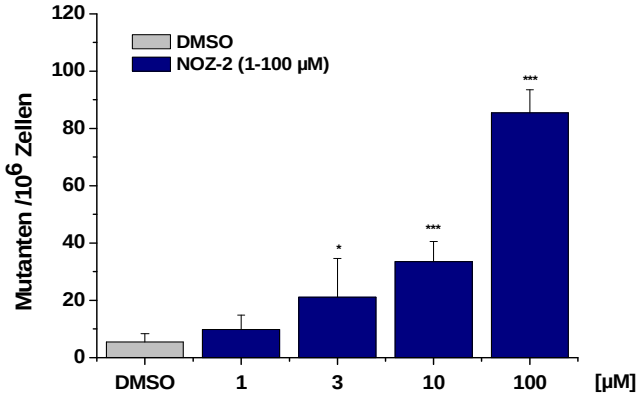


Abb. 72: Induktion von *hPRT*-Mutationen in V79 Zellen durch NOZ-2 (n=3; unabhängige Versuche; 24 h Inkubation; c(NOZ-2)=1-100 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

Die Inkubation von V79 Zellen mit NOZ-5 (**Abb. 73**) führt zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der *hPRT*-Mutationsrate ab 10 µM (D_{3C}-Wert 9 µM). NOZ-5 zeigt keine cytotoxischen Eigenschaften (Viabilität >93%). Es ist damit vergleichbar aktiv wie NOZ-2.

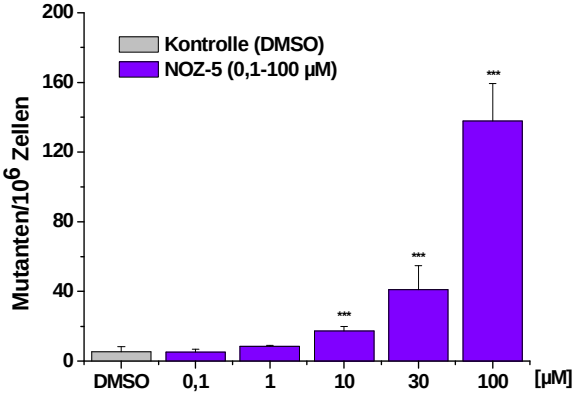


Abb. 73: Induktion von *hPRT*-Mutationen in V79 Zellen durch NOZ-5 (n=3; unabhängige Versuche; 24 h Inkubation; c(NOZ-5)=0,1-100 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

NOZ-2 und NOZ-5 werden hydrolytisch in DNA-alkylierende Intermediate überführt. Für NOZ-2 ist die Bildung eines 2-Hydroxyethyl-Diazoniumions, für NOZ-5 die eines Methyl- und / oder Carboxymethyl-Diazoniumions postulierbar. Diese interagieren vermutlich mit der N^7- und O^6-Position von Guanin sowie den Phosphodiestern des DNA-Rückgrats.
Der Vergleich mit den Ergebnissen zur Kinetik der Reduktion von DNA-Schäden verdeutlicht, dass NOZ-2-induzierte DNA-Strangbrüche im gesamten Konzentrationsbereich bis

100 µM nicht ausreichend repariert werden. Neben promutagenen O^6-Hydroxyethyl-G-Addukten, die in V79 Zellen nicht repariert werden können, tragen demnach zusätzlich andere, nicht reparierte DNA-Addukte zur Mutagenität von NOZ-2 bei.
Im Gegensatz dazu, werden die durch NOZ-5 induzierten DNA-Strangbrüche in schwach mutagenen Konzentrationen nahezu vollständig repariert. Erst in potent mutagenen Konzentrationen ist eine effektive Abnahme der DNA-Schäden nicht mehr möglich. In Konzentrationen bis 30 µM sind demnach vermutlich hauptsächlich promutagene O^6-Hydroxyethyl-G-Addukte, die in V79 Zellen nicht repariert werden können, für die Mutagenität verantwortlich. Dagegen tragen ab 100 µM zusätzlich andere, nicht reparierte DNA-Addukte zur Mutagenität von NOZ-5 bei.

Neben NOZ-5 wurden auch die beiden methylierten Analoga 2-Me- und 4-Me-NOZ-5 auf ihr mutagenes Potential in V79 Zellen untersucht. Wie aus **Abb. 74** hervorgeht, induzieren beide Verbindungen bis 1000 µM keine *hPRT*-Mutationen (Viabilität > 96%).

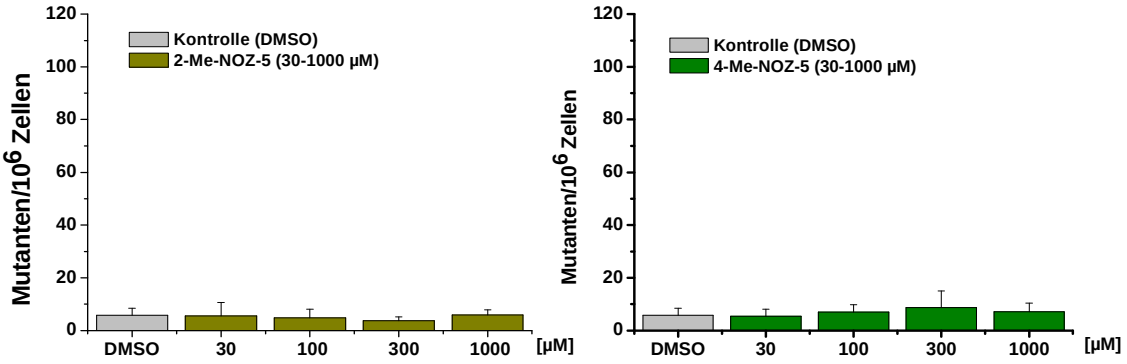


Abb. 74: Induktion von *hPRT*-Mutationen in V79 Zellen durch 2-Me-NOZ-5 und 4-Me-NOZ-5 (n=3; unabhängige Versuche; 24 h Inkubation; c(2-Me-NOZ-5; 4-Me-NOZ-5)=30-1000 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

MNU (**Abb. 75**) ist ab 300 µM mutagen (D_{3C}-Wert 200 µM). In der höchsten Konzentration zeigen sich geringe cytotoxische Effekte (Viabilität 82%).
MNU induziert damit im gleichen Konzentrationsbereich DNA-Schäden und *hPRT*-Mutationen.
MNU zerfällt in ein DNA-reaktives Methyl-Diazoniumion [Smith et al., 1988; Wurdeman et al., 1989; Fong et al., 1990]. Als hauptsächliches DNA-Addukt (ca. 66%) entsteht das N^7-Methyl-Guanin [Beranek et al., 1980; Wurdeman et al., 1989]. Weiterhin ist eine Interaktion mit den Phosphat-Gruppen des DNA-Rückgrates zu stabilen Methyl-Phosphotriestern beschrieben (12-17%) [Conrad et al., 1986; Müller et al., 1987; Beranek et al., 1990]. Eine DNA-Adduktbildung am O^6 des Guanins wurde ebenfalls beobachtet. Trotz des gerin-

gen Anteils am von MNU induzierten DNA-Addukt-Spektrum von etwa 10%, werden diese Läsionen für die mutagene Wirkung von MNU verantwortlich gemacht [Beranek et al., 1980; Kelly et al., 1998].

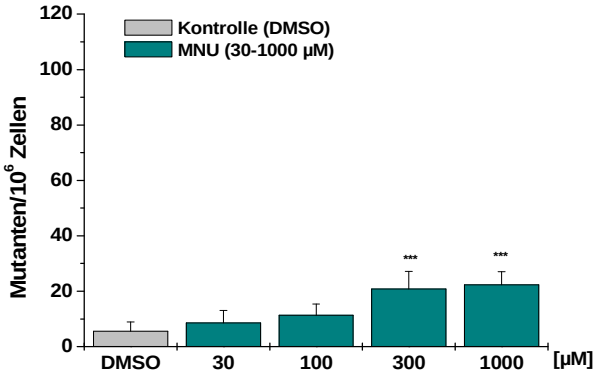


Abb. 75: Induktion von *hPRT*-Mutationen in V79 Zellen durch N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff (MNU) (n=3; unabhängige Versuche; 24 h Inkubation; c(MNU)=30-1000 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

Das 2-hydroxyethylierende HENU induziert Mutationen am *hPRT*-Locus von V79 Zellen ab 30 µM (**Abb. 76**). Eine deutliche Erhöhung der Mutationsfrequenz ist in der höchsten Konzentration von 1000 µM zu verzeichnen. Einen Einfluss auf die Viabilität der Zellen konnte nicht festgestellt werden (>91%).

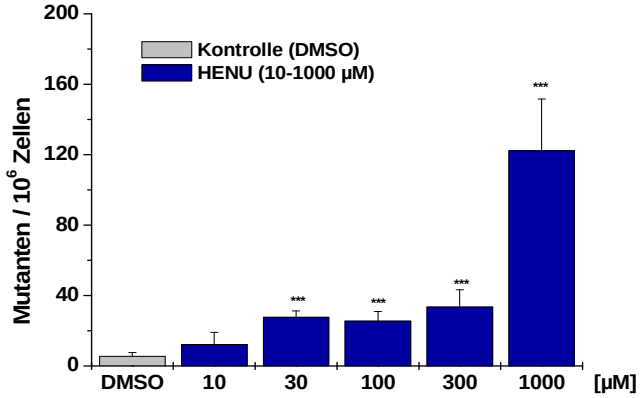


Abb. 76: Induktion von *hPRT*-Mutationen in V79 Zellen durch N-(2-hydroxyethyl)-N-nitroso-harnstoff (HENU) (n=3; unabhängige Versuche; 24 h Inkubation; c(HENU)=30-1000 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

HENU wird in ein DNA-alkylierendes 2-Hydroxyethyl-Diazoniumion aktiviert. Dieses interagiert mit der DNA hauptsächlich an den Positionen N^7 und O^6 von Guanin sowie den Phosphodiestern des DNA-Rückgrats [Conrad et al., 1986; Müller et al., 1987; Beranek et

al., 1990]. Die resultierenden 2-Hydroxyethyl-Phosphotriester werden unter den gewählten Bedingungen innerhalb kurzer Zeit in DNA-Strangbrüche gespalten [Conrad et al., 1986; Müller et al., 1987].

Der Vergleich mit der Untersuchung zur Reduktion von HENU-induzierten DNA-Schäden zeigt, dass in schwach mutagenen Konzentrationen die DNA-Strangbruchrate innerhalb der Nachkultivierung von 8 h bis annähernd auf Kontrollniveau reduziert wird. Hier sind also vermutlich hauptsächlich promutagene O^6-Läsionen für die Mutagenität von HENU verantwortlich. Ab 1000 µM kann ein signifikanter Anteil der DNA-Schäden nicht mehr effektiv repariert werden. Es ist daher anzunehmen, dass in diesem Konzentrationsbereich auch nicht reparierte Addukte am N^7-G oder den Phosphodiestern zur Mutagenität von HENU beitragen.

4.2.4. Einfluss von GSH auf die Induktion von DNA-Schäden in V79 Zellen

Ziel der im Folgenden beschriebenen, orientierenden Untersuchung war es, den Einfluss von GSH auf die Induktion von DNA-Schäden der in V79 Zellen DNA-schädigende Verbindungen GA, Ac, Hex und MNNG zu prüfen.

Dazu wurden V79 Zellen mit GSH und den entsprechenden genotoxischen Agentien 4 h co-inkubiert. Um auszuschließen, dass GSH selbst DNA-Strangbrüche induziert, wurden des Weiteren V79 Zellen ausschließlich mit GSH inkubiert. Nach Bestimmung der Cytotoxizität erfolgte die Quantifizierung der DNA-Schäden im alkalischen Comet Assay (± FPG). Die in den Abbildungen gezeigten Signifikanzen beziehen sich auf die in **4.2.1** erhaltenen Ergebnisse zur Induktion von DNA-Schäden in V79 Zellen nach 4-stündiger Inkubation. Zum Vergleich sind diese Daten jeweils nochmals mit im Liniendiagramm dargestellt.

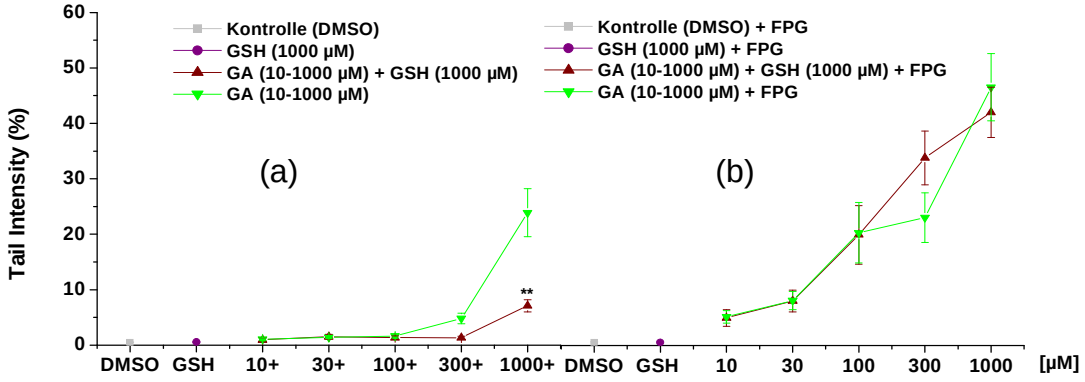


Abb. 77: Einfluss von GSH auf die Induktion von DNA-Schäden durch Glycidamid (GA) nach 4-stündiger Co-Inkubation von V79 Zellen ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 4 h Co-Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(GSH)=1000 µM; c(GA)=10-1000 µM; 1% DMSO))

Abb. 77 (a) zeigt, dass GSH (1000 µM) das DNA-schädigende Potential von GA (10-1000 µM) nach Co-Inkubation von V79 Zellen lediglich in der höchsten eingesetzten Konzentration von 1000 µM gering beeinflusst. Eine Reduktion FPG-sensitiver DNA-Schäden durch GSH ist nicht feststellbar.

Im Gegensatz zu GA, reduziert GSH das DNA-schädigende Potential der beiden α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen Ac und Hex signifikant.
Für Ac ist eine Reduktion der DNA-Strangbruchrate nach Co-Inkubation mit GSH bis nahezu auf das Niveau der Negativkontrolle DMSO festzustellen (**Abb. 78**).

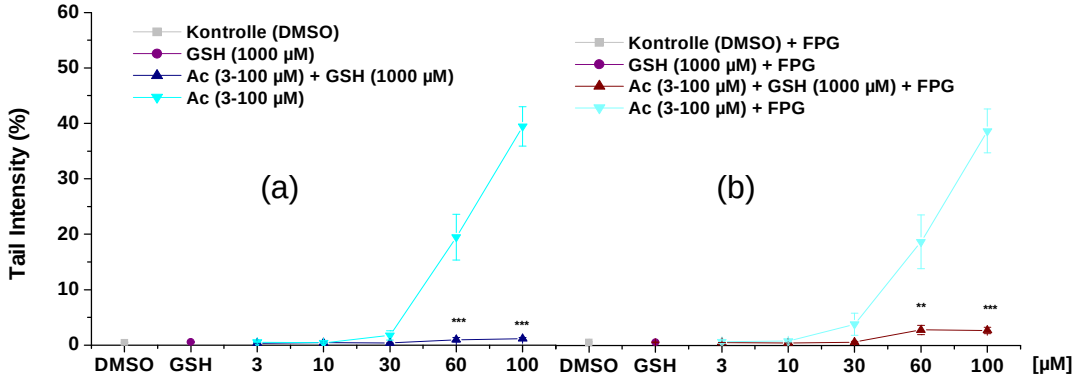


Abb. 78: Einfluss von GSH auf die Induktion von DNA-Schäden durch Acrolein (Ac) nach 4-stündiger Co-Inkubation von V79 Zellen ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 4 h Co-Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(GSH)=1000 µM; c(Ac)=3-100 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001))

Auch die DNA-schädigende Wirkung von Hex wird durch GSH signifikant reduziert. Im Gegensatz zu Ac erfolgt allerdings in der höchsten Konzentration (1000 µM) keine Abnahme der DNA-Strangbruchrate bis auf das Niveau der Negativkontrolle DMSO.

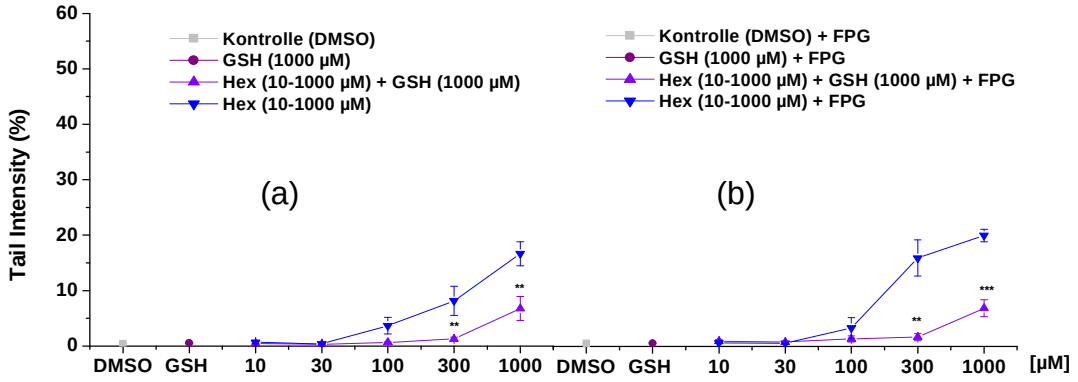


Abb. 79: Einfluss von GSH auf die Induktion von DNA-Schäden durch 2-Hexenal (Hex) nach 4-stündiger Co-Inkubation von V79 Zellen ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 4 h Co-Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(GSH)=1000 µM; c(Hex)=10-1000 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001))

Ac und Hex besitzen eine hohe Bindungsaffinität an GSH. Diese Reaktion, die entweder direkt [Esterbauer et al., 1975] oder GST-katalysiert [Boyland et al., 1967] verläuft, stellt einen wirkungsvollen Entgiftungspfad dar. Mit zunehmender Kettenlänge nimmt die Ge-

schwindigkeit der nicht-enzymatischen Bindung ab [Schuhmacher et al., 1990]. Damit erklärt sch die effektivere Entgiftung von Ac durch GSH, welches im Vergleich zu Hex aufgrund der kürzeren Kettenlänge elektrophiler ist und somit leichter an das Tripeptid bindet.

Wie bereits beschrieben, wird MNNG durch GSH sowohl detoxifiziert als auch aktiviert [Lawley et al., 1970; Jensen et al., 1987 & 1990; Santala et al., 1992], und zwar in Abhängigkeit davon, ob GSH frei oder an die aktive Stelle von GST gebunden vorliegt. Es ist also zu vermuten, dass eine Erhöhung des GSH-Gehaltes zu einer verstärkten Aktivität von MNNG durch vermehrte Bildung von Methyl-Diazoniumionen führt. Unter den gewählten Bedingungen der Co-Inkubation von MNNG und GSH zeigt sich allerdings, dass die DNA-Strangbruchrate von MNNG durch GSH nicht gesteigert, sondern vielmehr reduziert wird (**Abb. 80**).

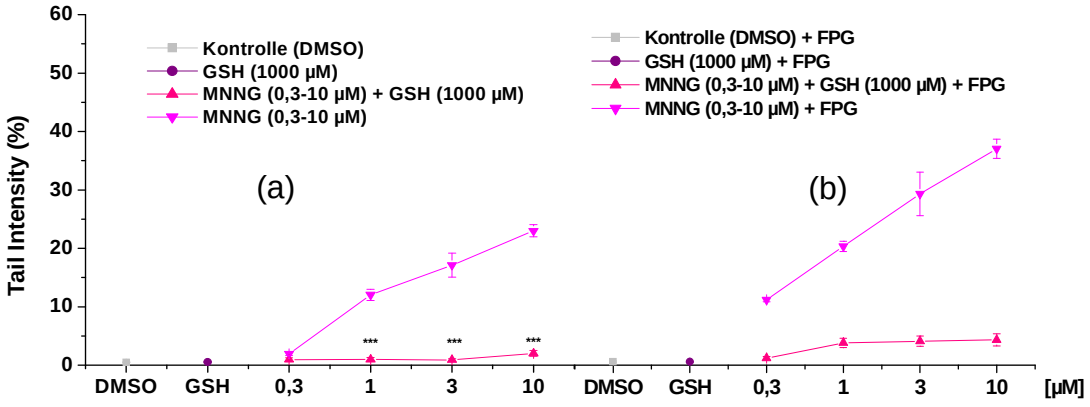


Abb. 80: Einfluss von GSH auf die Induktion von DNA-Schäden durch N-Methyl-N'-Nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) nach 4-stündiger Co-Inkubation von V79 Zellen ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 4 h Co-Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(GSH)=1000 µM; c(MNNG)=0,3-30 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001))

Einen ähnlichen Effekt konnten auch Romert et al. [1997] auf die Mutagenität von MNNG nach Co-Inkubation mit SH-aktiven Verbindungen feststellen. Man fand eine Steigerung des mutagenen Potentials lediglich durch Vorbehandlung der Zellen mit GSH und damit verbundener Erhöhung des intrazellulären GSH-Gehaltes, jedoch eine deutliche Abnahme bei gleichzeitiger Inkubation. Die Vermutung war, dass aufgrund des hohen extrazellulären GSH-Spiegels in Anwesenheit von MNNG die *N*-Nitrosoverbindung möglicherweise bereits außerhalb der Zelle in reaktive Methyl-Diazoniumionen zerfällt, welche dann

wiederum bereits vor Erreichen der DNA aufgrund der geringen Selektivität, aber auch hohen Reaktivität mit zellulären Bestandteilen abreagieren.

4.2.5. Bestimmung des Verhältnisses von AP Stellen und FaPy mit Hilfe des Comet Assays bei pH >13 und 12,1

GA induziert hauptsächlich instabile DNA-Addukte am N^7-Guanin. Durch Schwächung der glykosidischen Bindung entstehen daraus zum einen alkali-labile AP Stellen [Gates et al., 2004 (rev.)], die unter den alkalischen Bedingungen des Comet Assays in DNA-Strangbrüche überführt werden. Ein weiteres Folgeprodukt des alkylierten N^7-G-Addukts sind die so genannten Formamido-pyrimidine (FaPy), in welchen der Imidazolring des alkylierten Guanins geöffnet ist [Chetsanga et al., 1982]. Diese sind chemisch stabil und können unter physiologischen Bedingungen nur durch Enzyme der Base Excision Reparatur aus der DNA entfernt werden [Gates et al., 2004 (rev.)].

Mit Hilfe des alkalischen Comet Assays ohne FPG-Behandlung konnte gezeigt werden, dass GA DNA-Schäden in V79 Zellen ab 300 µM induziert. Diese sind vermutlich hauptsächlich auf AP Stellen zurückzuführen, die aufgrund der alkalischen Bedingungen in DNA-Strangbrüche übergehen (vgl. **4.2.1**). Daneben verursacht das DNA-Reparaturenzym FPG einen deutlichen Anstieg der DNA-Strangbruchrate. FPG erkennt u. a. AP Stellen und FaPy und überführt diese in zusätzliche DNA-Strangbrüche [Laval et al., 1996]. Der Unterschied zwischen DNA-Grund- und FPG-sensitiven DNA-Schäden kann allerdings nicht ausschließlich mit der Entstehung von FaPy erklärt werden, da aufgrund der kurzen DNA-Entwindungszeit im Comet Assay nur ein Teil der AP Stellen in DNA-Strangbrüche übergehen [Collins, 2004]. Eine Bestimmung des Verhältnisses von AP Stellen und FaPy ausgehend von N^7-G-Addukten ist demnach mit Hilfe des alkalischen Comet Assays (± FPG) nicht möglich.

Daher wurde die Induktion von DNA-Strangbrüchen im Comet Assay bei pH 12,1 untersucht und vergleichend den Ergebnissen des alkalischen Comet Assay (vgl. **4.2.1**) gegenübergestellt. Da nach Absenkung des pH-Wertes während DNA-Entwin-dung und E-lektrophorese auf 12,1 alkali-labile Stellen nicht mehr in DNA-Strangbrüche überführt werden [Klaude et al., 1996; Miyamae et al., 1997], ermöglicht der Vergleich zum Comet Assay bei pH >13 Rückschlüsse auf induzierte AP Stellen.

Dazu wurden V79 Zellen zunächst analog zu **4.2.1** mit den jeweiligen Testsubstanzen für 4 h inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Quantifizierung der DNA-Schäden im Comet Assay bei pH 12,1 (± FPG).

Vergleichend sind in den einzelnen Abbildungen nochmals die Ergebnisse der 4-stündigen Inkubation von V79 Zellen im Comet Assay bei pH >13 dargestellt. Die gezeig-

ten Signifikanzen beziehen sich jeweils auf die aus **4.2.1** erhaltenen Werte nach 4-stündiger Inkubation im Comet Assay bei pH >13.

Wie in **Abb. 81** dargestellt, führt die DNA-Entwindung bei pH 12,1 im Vergleich zu pH >13 zu einer signifikanten Abnahme der GA-induzierten DNA-Strangbrüche. Im Gegensatz zum Comet Assay bei pH >13, führt FPG bei pH 12,1 nicht zu einer Erhöhung der DNA-Strangbruchrate.

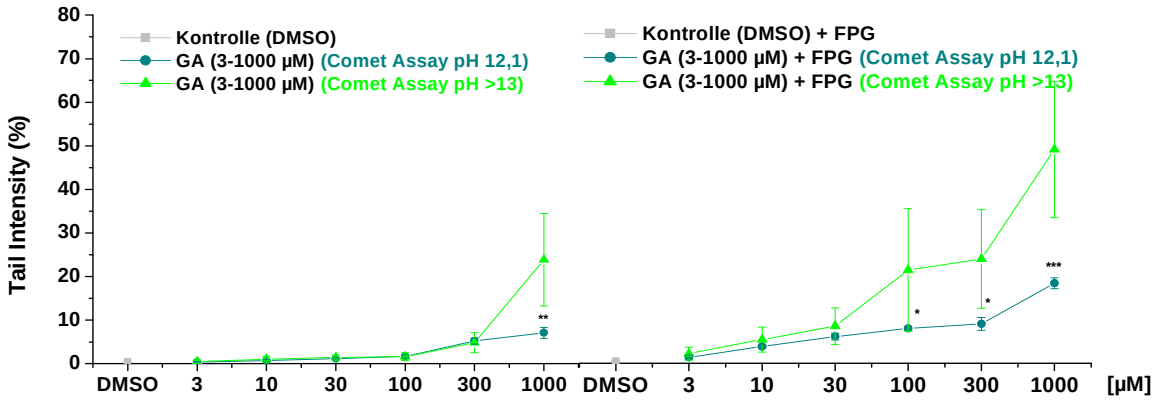


Abb. 81: Nachweis von Glycidamid (GA)-induzierten DNA-Schäden im Comet Assay bei pH >13 und 12,1 nach 4-stündiger Inkubation von V79 Zellen ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 4 h Inkubation; c(GA)=3-1000 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

Dies ist ein Indiz für die Entstehung alkali-labiler AP Stellen aus N^7-GA-G-Addukten. Diese werden unter den schwächer alkalischen Bedingungen nicht mehr in DNA-Strangbrüche überführt. Die ebenfalls zu beobachtende signifikante Abnahme der FPG-sensitiven DNA-Schäden im Vergleich zum alkalischen Comet Assay könnte auf eine unvollständige Entfernung FPG-sensitiver DNA-Schäden zurückzuführen sein. So werden AP Stellen, ob durch spontane Depurinierung oder nach Entfernung von FaPy durch die DNA-Glykosylase-Aktivität von FPG entstanden, durch die AP-Lyase-Aktivität von FPG in DNA-Strangbrüche überführt [Laval et al., 1996]. Erfolgt nun dieser Schritt der Reparatur nur unzureichend, resultiert die Überführung von AP Stellen in DNA-Strangbrüche in der alkalischen Variante des Comet Assays aufgrund des pH-Wertes während der DNA-Entwindung. Im Comet Assay bei pH 12,1 verbleiben diese allerdings in der DNA und sind nicht mehr nachweisbar [Klaude et al., 1996; Miyamae et al., 1997]. Die Frage, ob N^7-GA-G-Addukte nun hauptsächlich depuriniert oder in FaPy überführt werden, kann anhand dieses Ergebnisses nicht eindeutig geklärt werden.

Ac induziert in V79 Zellen ab 60 µM nach 4-stündiger Inkubation signifikant DNA-Schäden, die im Comet Assay bei pH >13 deutlich erkennbar sind. Die Reduktion des pH-Wertes auf pH 12,1 führt zu einer deutlichen Abnahme der Tail Intensity sowohl ohne als auch mit zusätzlicher FPG-Behandlung (**Abb. 82**). Dies lässt auf die Entstehung alkali-labiler Stellen aus Ac-DNA-Addukten schließen, die bei einem pH-Wert von 12,1 nicht mehr in DNA-Strangbrüche überführt werden.

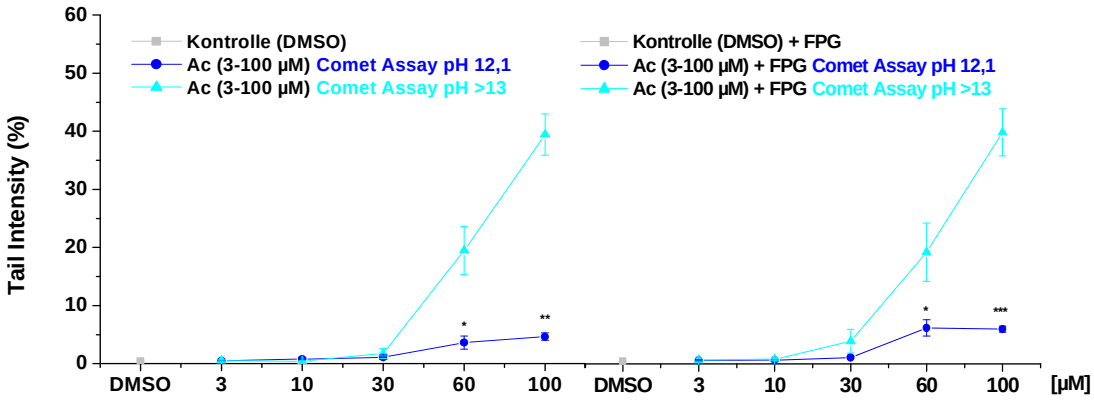


Abb. 82: Nachweis von Acrolein (Ac)-induzierten DNA-Schäden im Comet Assay bei pH >13 und 12,1 nach 4-stündiger Inkubation von V79 Zellen ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 4 h Inkubation; c(Ac)=3-100 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

Ein vergleichbarer Effekt kann auch bei NOZ-2 beobachtet werden. Nach Reduktion des pH-Wertes bei der DNA-Entwindung sind signifikant weniger DNA-Strangbrüche im Comet Assay mit und ohne FPG-Behandlung nachweisbar (**Abb. 83**).

Diese Reduktion deutet darauf hin, dass im alkalischen Comet Assay AP Stellen, die vermutlich aus N^7-Hydroxyethyl-G-Addukten resultieren, zur Gesamtheit der DNA-Strangbrüche beitragen. Auch hier lässt die Abnahme der FPG-sensitiven DNA-Schäden auf eine möglicherweise unvollständige DNA-Reparatur durch FPG schließen.

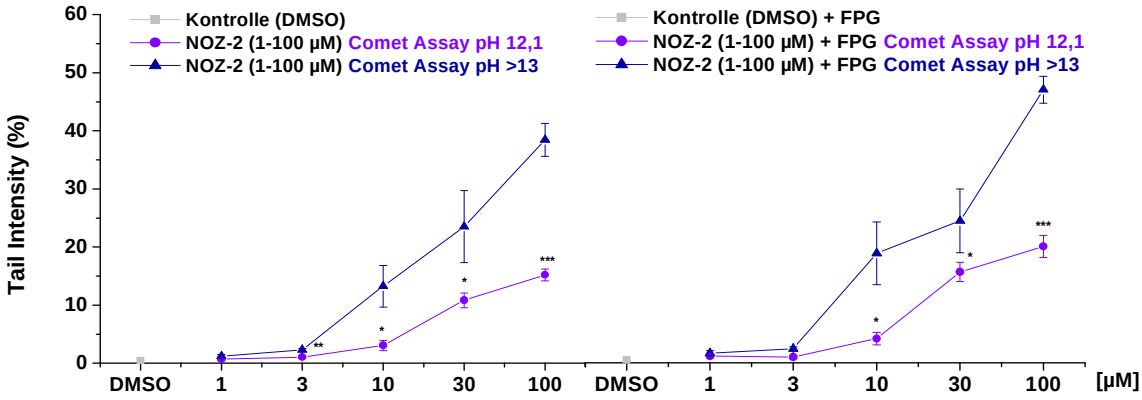


Abb. 83: Nachweis von NOZ-2-induzierten DNA-Schäden im Comet Assay bei pH >13 und 12,1 nach 4-stündiger Inkubation von V79 Zellen ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 4 h Inkubation; c(NOZ-2)=1-100 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

Das hauptsächlich N^7-G-methylierende MNU induziert im Comet Assay bei einem pH >13 DNA-Strangbrüche ab 1000 µM ohne FPG-Behandlung. Die zusätzliche Inkubation mit dem DNA-Reparaturenzym FPG lässt DNA-Schäden ab 100 µM erkennen und erhöht die DNA-Schädigung in höheren Konzentrationen so weit, dass die DNA nahezu vollständig fragmentiert vorliegt. Eine Senkung des pH-Wertes bei der DNA-Entwindung auf 12,1 führt dazu, dass in diesen beiden Konzentrationen die Tail Intensity wieder ermittelbar im Bereich von 10% TI liegt und auch die Tail Intensity für MNU 100 µM (+ FPG) signifikant geringer ist. Ein gegenteiliges Ergebnis kann allerdings für die DNA-Strangbruchrate ohne zusätzliche FPG-Behandlung festgestellt werden. Zwar minimieren sich die DNA-Strangbrüche in der höchsten Konzentration von 1000 µM, in den beiden Konzentrationen 100 und 300 µM sind allerdings in niedrigeren pH-Bereichen mehr DNA-Schäden detektierbar. Ähnlich wie GA ist auch für MNU der Unterschied zwischen DNA-Grundschäden und FPG-sensitiven DNA-Schäden nach Senkung des pH-Wertes nicht mehr signifikant.

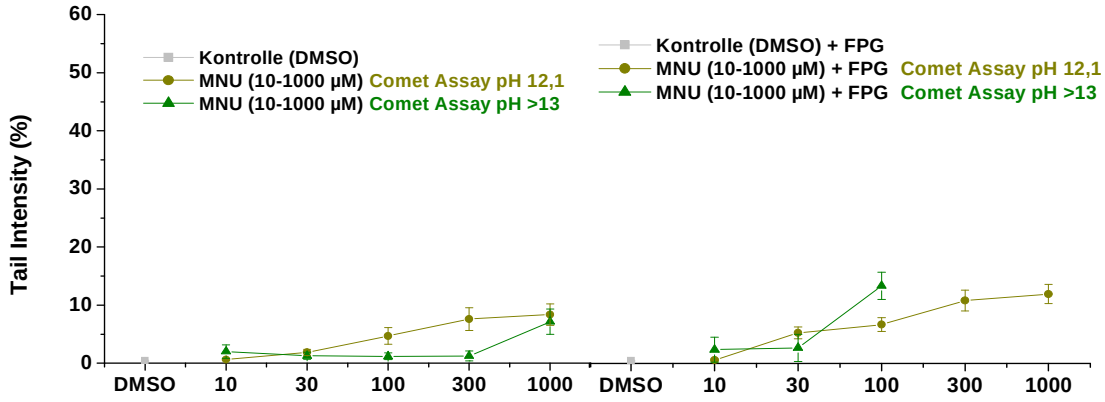


Abb. 84: Nachweis von *N*-Methyl-N-Nitroso-harnstoff (MNU)-induzierten DNA-Schäden im Comet Assay bei pH >13 und 12,1 nach 4-stündiger Inkubation von V79 Zellen ohne (a) und mit (b) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 4 h Inkubation; c(MNU)=10-1000 µM; 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

4.2.6. Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse in V79 Zellen

Im Vergleich zum System humanes Vollblut wurde die DNA-schädigende Wirkung von GA, den α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen Ac und Hex sowie verschiedener *N*-Nitroso-verbindungen in V79 Zellen geprüft. Des Weiteren wurde die Kinetik der Reduktion von DNA-Schäden sowie der Einfluss von Glutathion (GSH) auf die Toxizität der genannten Verbindungen mit Hilfe des alkalischen Comet Assays bestimmt.

Die Mutagenität von Verbindungen mit DNA-schädigendem Potential wurde mit Hilfe des *hPRT*-Genmutations-Assays bestimmt.

In den **Tab. 10** und **Tab. 11** sind die Ergebnisse zusammengefasst.

	V79 Zellen					
	Induktion von DNA-Schäden (15', 1, 2, 24 h) *		**Einfluss von GSH auf die Induktion von DNA-Schäden (4 h) ***		**Induktion von DNA-Schäden (4 h) ***	
	Comet Assay (pH >13)				**Comet Assay (pH 12,1)**	
Substanz	**- FPG**	**+ FPG**	**- FPG**	**+ FPG**	**- FPG**	**+ FPG**
Glycidamid	1000 µM (1 h)*	100 µM (1 h)*	kein Einfluss auf DNA-Strangbruchrate		gering aktiv ab 1000 µM	gering aktiv ab 100 µM
Acrolein	60 µM (4 h)**	60 µM (4 h)**	gering aktiv ab 60 µM		gering aktiv ab 60 µM	gering aktiv ab 60 µM
2-Hexenal	100 µM (4 h)*	100 µM (4 h)*	gering aktiv ab 100 µM		-	-
NOZ-2	1 µM (15')***	0,3 µM (15' h)***	n. b.	n. b.	verringerte Aktivität ab 3-10 µM	
NOZ-5	100 µM (15')***	10 µM (15')***	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
2-Me-NOZ-5	inaktiv		n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
4-Me-NOZ-5	inaktiv		n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
MNU	300 µM (15')***	100 µM (15')***	n. b.	n. b.	leicht erhöhte DNA-Strangbruchrate ab 100 µM	verringerte DNA-Migration
HENU	300 µM (15')***	30 µM (15')***	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
MNNG	0,3 µM (4 h)**	0,3 µM (4 h)**	gering aktiv ab 0,3 µM		n. b.	n. b.

* zeitabhängiger Anstieg der DNA-Migration mit Maximum nach 24 h;

** vergleichbare Tail Intensity nach 4 und 24 h;

*** maximale DNA-Schädigung nach 1-4 h; nach 24 h nur noch gering aktiv

Tab. 10: Induktion von DNA-Schäden in V79 Zellen (n. b.: nicht bestimmt); * niedrigste signifikant aktive Konzentration

	V79 Zellen		
	Induktion von Mutationen am *hPRT*-Locus (24 h) *	**Kinetik der Reduktion von DNA-Schäden (4, 24 h) ***	
	***hPRT*-Genmutations-Assay**	**Comet Assay (pH >13)**	
Substanz		**- FPG**	**+ FPG**
Glycidamid	800 µM [Mertes, 2003]	nahezu vollständige Reduktion der DNA-Schäden in nicht-mutagenen Konzentrationen [Michael, 2006]	
NOZ-2	3 µM	keine effektive Reduktion der DNA-Schäden [Michael, 2006]	
NOZ-5	10 µM	effektive Reduktion von DNA-Schäden nur in schwach-mutagenen Konzentrationen	
2-Me-NOZ-5	inaktiv	n. b.	n. b.
4-Me-NOZ-5	inaktiv	n. b.	n. b.
MNU	300 µM	n. b.	n. b.
HENU	30-300 µM (schwach) 1000µM (potent)	effektive Reduktion von DNA-Schäden nur in schwach-mutagenen Konzentrationen	

Tab. 11: Induktion von *hPRT*-Mutationen und Kinetik der Reduktion von DNA-Schäden in V79 Zellen (n. b.: nicht bestimmt); * niedrigste signifikant aktive Konzentration

I) Vergleich der DNA-schädigenden Wirkung in V79 Zellen

GA ist in V79 Zellen ab 100-1000 µM (1 h) DNA-strangbrechend. FPG bewirkt einen signifikanten Anstieg der DNA-Strangbruchrate.

MNU (100-300 µM) ist vergleichbar DNA-schädigend wie GA, es interagiert allerdings deutlich schneller mit der DNA (15'). Auch bei MNU erhöht FPG die DNA-Strangbruchrate signifikant.
Im Vergleich dazu, ist HENU zwar in einem ähnlichen Konzentrationsbereich aktiv (30-300 µM; 15'), allerdings besitzt FPG keinen Einfluss auf die DNA-Strangbruchrate.

Auch die α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen Ac und Hex sind in V79 Zellen ab 60-100 µM DNA-strangbrechend (4 h). Eine zusätzliche Behandlung mit FPG bewirkt keinen weiteren Anstieg der DNA-Strangbruchrate.

Während die methylierten *N*-Nitroso-oxazolidinone in V79 Zellen keine DNA-Strangbrüche induzieren, sind NOZ-2 und NOZ-5 wesentlich reaktiver und induzieren DNA-Strangbrüche bereits ab 0,3 resp. 10 µM. Für NOZ-2 bewirkt FPG nur einen geringen Anstieg der DNA-Strangbruchrate. Dagegen induziert NOZ-5 kaum DNA-Grundschäden, zeigt dagegen allerdings eine signifikante Induktion FPG-sensitiver DNA-Schäden.

II) Vergleich der Zeitabhängigkeit der Induktion von DNA-Schäden in V79 Zellen

Zur Bewertung des genotoxischen Potentials der untersuchten Verbindungen ist neben der Intensität der induzierten DNA-Schäden vor allem die Geschwindigkeit der Reaktion gegenüber der DNA von Bedeutung. Anhand ausgewählter Konzentrationen ist in **Abb. 85** die Zeitabhängigkeit der Induktion von DNA-Schäden vergleichend dargestellt.

Es zeigt sich, dass GA relativ langsam mit der DNA reagiert und erst nach Inkubationszeiten ab 1 h DNA-Strangbrüche induziert.

Die *N*-Nitrosoharnstoffe MNU und HENU induzieren DNA-Schäden in V79 Zellen bereits ab 15 Minuten und alkylieren die DNA damit deutlich schneller als GA. Die Induktion von DNA-Schäden durch MNU und HENU ist nach 4-stündiger Inkubation maximal. Nach 24 h sinkt das DNA-schädigende Potential beider Verbindungen signifikant ab.

Sowohl NOZ-2 als auch NOZ-5 haben bereits nach 15 Minuten nahezu das vollständige Ausmaß DNA-schädigender Wirkung erreicht. Die DNA-Strangbruchrate steigt nach 1-4 h nur noch gering an und ist nach 4 h maximal. Nach 24-stündiger Inkubation sinkt das DNA-schädigende Potential beider Verbindungen deutlich ab.

Im Vergleich zum relativ reaktionsträgen GA zeigt sich, dass die beiden *N*-Nitroso-oxazolidinone innerhalb weiniger Minuten in DNA-reaktive Intermediate hydrolysiert werden, diese schnell an die DNA binden und DNA-Strangbrüche induzieren. Die Abnahme des genotoxischen Potentials nach 24-stündiger Inkubation ist möglicherweise Indiz für die Reparatur von DNA-Strangbrüchen nach vollständiger, schneller Reaktion der NOZ's. Die Aktivierung von MNU und HENU verläuft langsamer, ist aber wie bei den *N*-Nitroso-oxazolidinonen nach 24 h abgeschlossen. Auch hier deutet die signifikant verringerte DNA-Strangbruchinduktion auf eine Reparatur der DNA-Strangbrüche hin.

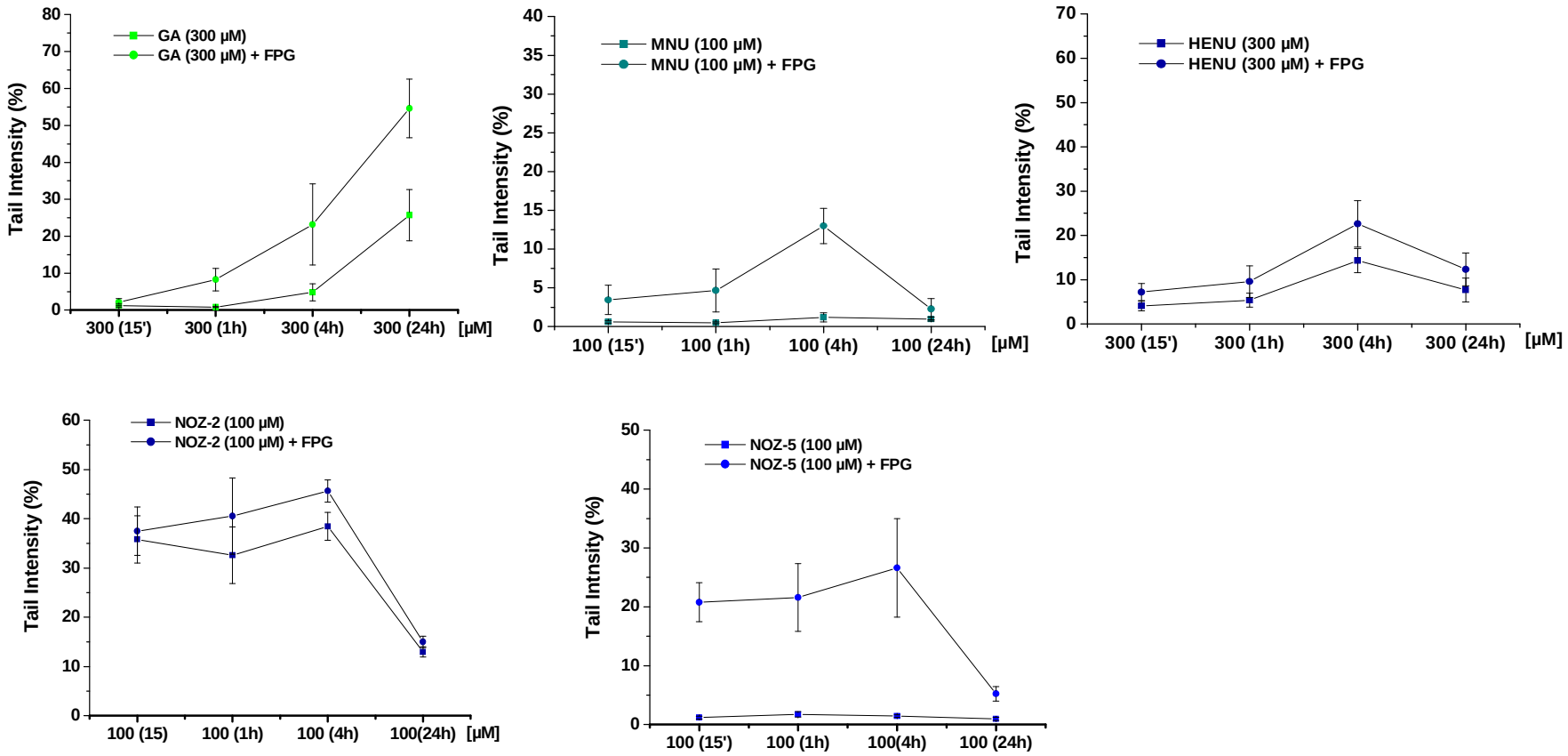


Abb. 85: Zeitabhängigkeit der Induktion von DNA-Schäden durch GA (300 µM), MNU (100 µM), HENU (300 µM), NOZ-2 (100 µM) und NOZ-5 (100 µM) in V79 Zellen ohne und mit zusätzlicher FPG-Behandlung

III) Vergleich der DNA-schädigenden Wirkung in V79 Zellen und Vollblut

GA ist in humanem Vollblut und V79 Zellen gleichermaßen reaktiv. In beiden Systemen zeigt sich ein konzentrations- und zeitabhängiger Anstieg der DNA-Strangbrüche ab 100-300 µM (1-4 h) sowie nach zusätzlicher Behandlung mit FPG ein signifikanter Anstieg der DNA-Strangbruchrate (10 -100 µM; 1-4 h).

Ac und Hex sind in V79 Zellen bedeutend genotoxischer als in Vollblut oder isolierten Lymphozyten. So sind in V79 Zellen DNA-Strangbrüche bereits ab 60 resp. 100 µM (4 h) nachweisbar. Dahingegen sind beide Verbindungen in Vollblut inaktiv und induzieren in isolierten Lymphozyten DNA-Strangbrüche erst in deutlich höheren Konzentrationen von 3000-6000 µM. FPG bewirkt in keinem der Systeme einen weiteren Anstieg der DNA-Strangbruchrate.

MNU ist in humanem Vollblut potenter DNA-schädigend als in V79 Zellen. So sind im Humanblut bereits ab 100 µM ohne und ab 10 µM mit zusätzlicher FPG-Behandlung DNA-Strangbrüche detektierbar. In V79 Zellen zeigt sich eine vergleichbare Intensität der DNA-Schädigung erst in 3-10-fach höheren Konzentrationen.

Da die Genotoxizität der *N*-Nitroso-oxazolidinone in Humanblut nur nach einer Inkubationszeit von 4 h detektiert wurde, erfolgt der Vergleich zur Reaktivität in V79 Zellen für diesen Zeitraum. V79 Zellen sind gegenüber NOZ-2 deutlich sensitiver als humanes Vollblut. Während in Vollblut ab 100 µM DNA-Strangbrüche nachweisbar waren, ist NOZ-2 in V79 Zellen bereits ab 3 µM aktiv. Im Gegensatz dazu zeigen NOZ-5 sowie die beiden methylierten Analoga in V79 Zellen eine deutlich geringere Reaktivität als in Humanblut. Während NOZ-5 in Vollblut bereits ab 0,1 µM signifikant DNA-Schäden induziert, sind in V79 Zellen erst ab 100-fach höheren Konzentrationen DNA-Schäden nachweisbar. 2-Me- und 4-Me-NOZ-5 sind in Humanblut erst in hohen Konzentrationen DNA-strangbrechend, in V79 Zellen sind beide unter den gewählten Bedingungen inaktiv.

IV) Einfluss von GSH auf die Genotoxizität in V79 Zellen

Die Genotoxizität von Fremdstoffen hängt wesentlich vom Gleichgewicht giftender und entgiftender Mechanismen im Organismus ab. Einen Beitrag zur Detoxifizierung leisten u. a. Glutathion (GSH) und andere endogene oder exogene Thiole [Meister et al., 1983]. Hierbei interagieren die nukleophilen Thiole direkt oder durch enzymatische Katalyse mit Elektrophilen unter Bildung von nicht-toxischen Konjugaten.

Das DNA-schädigende Potential von GA (10-1000 µM) wird durch GSH (1000 µM) nach Co-Inkubation von V79 Zellen nicht beeinflusst.

Im Gegensatz dazu, führt die Co-Inkubation von V79 Zellen mit GSH (1000 µM) und Ac bzw. Hex zu einer signifikanten Reduktion des genotoxischen Potentials der Verbindungen.
Ac und Hex besitzen eine hohe Bindungsaffinität an GSH. Diese Reaktion, die entweder direkt [Esterbauer et al., 1975] oder GST-katalysiert [Boyland et al., 1967] verläuft, stellt einen wirkungsvollen Entgiftungspfad dar.

MNNG wird durch GSH sowohl detoxifiziert als auch aktiviert [Lawley et al., 1970; Jensen et al., 1987 & 1990; Santala et al., 1992], und zwar in Abhängigkeit davon, ob GSH frei oder an die aktive Stelle von GST gebunden vorliegt. Die gleichzeitige Behandlung von V79 Zellen mit GSH und MNNG sollte klären, ob das DNA-strangbrechende Potential von MNNG durch Erhöhung des GSH-Gehaltes gesteigert werden kann. Allerdings zeigte sich vielmehr eine signifikante Reduktion der DNA-Schädigung.
Es ist zu vermuten, dass aufgrund des hohen extrazellulären GSH-Spiegels in Anwesenheit von MNNG die *N*-Nitrosoverbindung möglicherweise bereits außerhalb der Zelle in das reaktive Methyl-Diazoniumion zerfällt, welches dann wiederum bereits vor Erreichen der DNA aufgrund seiner geringen Selektivität, aber auch hohen Reaktivität mit zellulären Bestandteilen abreagieren kann.

V) Zusammenhang zwischen hPRT-Mutagenität und Reparatur von DNA-Strangbrüchen ausgewählter Verbindungen

Das Auftreten von Mutationen ist mit der unzureichenden oder mangelnden Reparatur von DNA-Addukten wesentlich verbunden. Sind DNA-Reparaturmechanismen überlastet oder fehlen vollkommen, erhöht sich das Risiko einer Mutation durch Weitergabe der fehlerhaften Information an die Tochterzelle.

Mertes [2003] zeigte, dass GA ab 800 µM signifikant Mutationen am *hPRT*-Locus von V79 Zellen induziert. Dagegen sind DNA-Strangbrüche bereits ab 10-100 µM feststellbar. Durch Bestimmung der Abnahme von GA-induzierten DNA-Schäden konnte Michael [2006] zeigen, dass in Konzentrationen bis 800 µM die durch GA induzierten DNA-Schäden nahezu vollständig repariert werden, und erst in höheren Konzentrationen ein Teil der DNA-Schäden auch nach 8-stündiger Nachkultivierung noch signifikant erhöht ist.

HENU ist bis 300 µM schwach mutagen, ab 1000 µM ist ein deutlicher Anstieg der *hPRT*-Genmutationsfrequenz zu verzeichnen. Der Vergleich mit der Untersuchung zur Reduktion von HENU-induzierten DNA-Schäden zeigt, dass in schwach mutagenen Konzentrationen die DNA-Strangbruchrate innerhalb der Nachkultivierung von 8 h bis annähernd auf Kontrollniveau reduziert wird. Hier sind also vermutlich hauptsächlich promutagene O^6-

Läsionen für die Mutagenität von HENU verantwortlich. Ab 1000 µM kann ein signifikanter Anteil der DNA-Schäden nicht mehr effektiv repariert werden. Es ist daher anzunehmen, dass in diesem Konzentrationsbereich auch nicht reparierte Addukte am N^7-G oder den Phosphodiestern zur Mutagenität von HENU beitragen.

NOZ-2 und NOZ-5 sind ab 3-10 µM mutagen. Für beide Verbindungen zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Mutagenität ab 100 µM.
Der Vergleich mit den Ergebnissen zur Kinetik der Reduktion von DNA-Schäden verdeutlicht, dass NOZ-2-induzierte DNA-Strangbrüche im gesamten Konzentrationsbereich bis 100 µM nicht ausreichend repariert werden. Neben promutagenen O^6-Hydroxyethyl-G-Addukten, die in V79 Zellen nicht repariert werden können, tragen demnach zusätzlich andere, nicht reparierte DNA-Addukte zur Mutagenität von NOZ-2 bei.
Im Gegensatz dazu, werden die durch NOZ-5 induzierten DNA-Strangbrüche in schwach mutagenen Konzentrationen nahezu vollständig repariert. Erst in potent mutagenen Konzentrationen ist eine effektive Abnahme der DNA-Schäden nicht mehr möglich. In Konzentrationen bis 30 µM sind demnach vermutlich hauptsächlich promutagene O^6-Hydroxyethyl-G-Addukte, die in V79 Zellen nicht repariert werden können, für die Mutagenität verantwortlich. Dagegen tragen ab 100 µM zusätzlich andere, nicht reparierte DNA-Addukte zur Mutagenität von NOZ-5 bei.

4.3. Induktion von DNA-Schäden in primären Rattenhepatozyten

Primärkulturen von Hepatozyten sind das am häufigsten eingesetzte *in vitro*-System für Studien zur Biotransformation, da die Leberparenchymzelle über das fast komplette für den Fremdstoffmetabolismus relevante Enzymmuster mit hoher Aktivität verfügt.

In der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe des alkalischen Comet Assays (± FPG) geklärt werden, ob das möglicherweise durch endogene Nitrosierung aus NAPA gebildete *N*-Nitroso-NAPA in der Lage ist, nach metabolischer Aktivierung, DNA-Schäden in primären Rattenhepatozyten zu induzieren. Als Positivkontrolle wurde NDELA verwendet, welches durch metabolische, enzym-katalysierte Aktivierung in DNA-alkylierende Intermediate überführt wird.

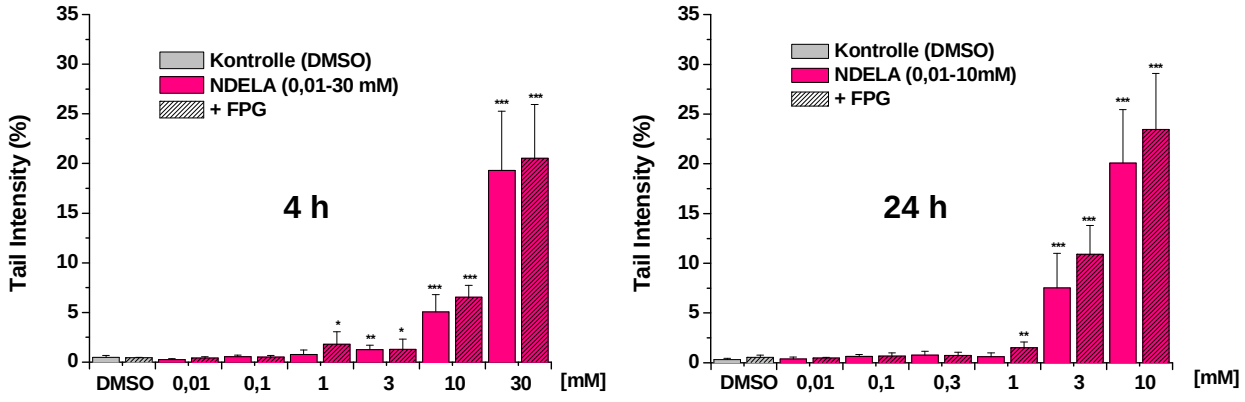


Abb. 86: Induktion von DNA-Schäden durch *N*-Nitroso-diethanolamin (NDELA) in primären Rattenhepatozyten ohne (unschraffiert) und mit (schraffiert) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 4, 24 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(NDELA)=0,01-30 mM (4 h); c(NDELA)=0,01-10 mM (24 h); 1% DMSO; *p<0,1; **p<0,01; ***p<0,001)

Wie in **Abb. 86** dargestellt, induziert NDELA nach 4-stündiger Inkubation signifikant DNA-Strangbrüche ab 3 mM. Durch Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 h sind DNA-Schäden ebenfalls ab 3 mM detektierbar, allerdings mit erhöhter DNA-Strangbruchrate. Für beide Inkubationsbereiche sind FPG-sensitive DNA-Schäden zwar ab 1 mM nachweisbar, im Vergleich zur DNA-Grundschädigung ist die Tail Intensity jedoch nur gering erhöht.

Im Gegensatz zu NDELA induzieren sowohl NAPA als auch *N*-Nitroso-NAPA nach 4 und 24 h Inkubation keine DNA-Strangbrüche in primären Rattenhepatozyten (**Abb. 87** & **Abb. 88**). Es ist zu beachten, dass in der jeweils höchsten Konzentration von 3 mM für NAPA nach beiden Inkubationszeiträumen, für NO-NAPA nach 24-stündiger Inkubation keine Zellen mehr nachweisbar waren. Im Verlauf der Inkubation hatten sich alle Hepatozyten vom Boden der Petrischale abgelöst.

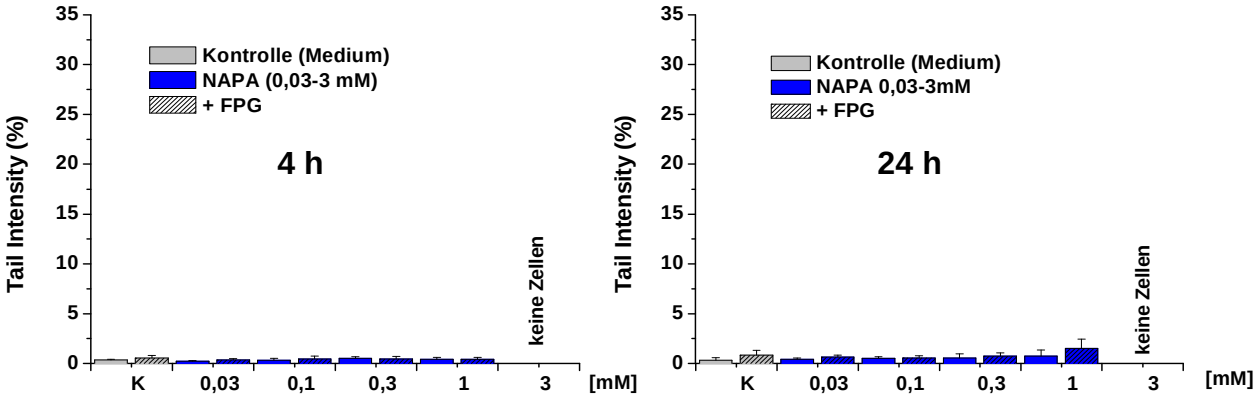


Abb. 87: Induktion von DNA-Schäden durch NAPA in primären Rattenhepatozyten ohne (unschraffiert) und mit (schraffiert) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 4, 24 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(NAPA)=0,03-3 mM; 1% DMSO)

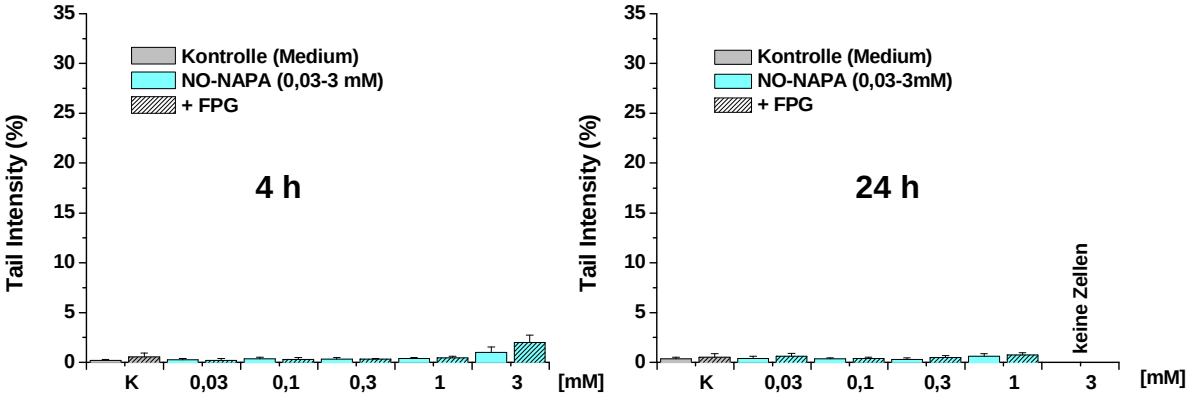


Abb. 88: Induktion von DNA-Schäden durch N-Nitroso-NAPA (NO-Neo) in primären Rattenhepatozyten ohne (unschraffiert) und mit (schraffiert) zusätzlicher FPG-Behandlung (n=3; unabhängige Versuche; 4, 24 h Inkubation; alkalischer Comet Assay; c(NO-NAPA)=0,03-3 mM; 1% DMSO)

4.3.1. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse in primären Hepatozyten

NDELA wird in primären Rattenhepatozyten aktiviert und induziert in der Folge konzentrations- und zeitabhängig DNA-Strangbrüche ab 3 mM. Die metabolische Aktivierung erfolgt wie in **Abb. 27** gezeigt, über zwei Wege. In *in-vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Oxidation sowohl in α- als auch in β-Position erfolgen kann [Loeppky et al., 2002a]. Durch CYP2E1-vermittelte Hydroxylierung des α-C-Atoms [Loeppky et al., 2002] wird zunächst das äußerst instabile α-Hydroxy-NDELA gebildet, welches spontan

in Glycolaldehyd und ein hochreaktives, DNA-alkylierendes 2-Hydroxyethyl-diazoniumion zerfällt [Dennehy et al., 2005]. Zum anderen kann auch eine Metabolisierung via β-C-Oxidation erfolgen. Das dadurch entstehende Aldehyd-Isomer steht im Gleichgewicht mit dem zyklischen *N*-Nitroso-2-hydoxymorpholin (NHMOR), das eine direkte mutagene und genotoxische Wirkung besitzt [Loeppky et al., 1998]. Eine Weiteroxidation von Glycolaldehyd und NHMOR führt zur Bildung von Glyoxal, welches ebenfalls mit der DNA interagieren kann [Dennehy et al., 2005; Loeppky et al., 2005].

Wie *in-vitro* und *in-vivo* gezeigt werden konnte, induziert NDELA 2-Hydroxyethyl-Addukte am N^7 und O^6 des Guanins [Farrelly et al., 1987; Scherer et al., 1991]. Diese Addukte konnten nach Behandlung mit dem Metabolit NHMOR nicht nachgewiesen werden [Scherer et al., 1991], welches stattdessen hauptsächlich stabile 1,N^2-Glyoxal-Addukte mit Guanin bildet [Loeppky et al., 2002b]. Zusätzlich kommt es möglicherweise zur Entstehung von instabilen 2-Hydroxyethyl-Phosphotriestern. Dies konnte bereits mit anderen vergleichbar reaktiven Verbindungen (z. B. N-(2-hydroxyethyl)-N-nitroso-harnstoff (HENU)) gezeigt werden [Conrad et al., 1996; Müller et al., 1987].

Es ist also zu vermuten, dass NDELA zwar hauptsächlich N^7-G-Addukte induziert, die schnell in DNA-Strangbrüche übergehenden 2-Hydroxyethyl-Phosphotriester deren Nachweis im Comet Assay allerdings überlagern. Gleiches gilt möglicherweise auch für DNA-Reparatur-bedingte DNA-Strangbrüche aus Glyoxal-Addukten. Addukte am O^6-G werden von MGMT suizidal repariert. Durch diese Reparatur entstehen keine DNA-Strangbrüche, die im Comet Assay nachweisbar sind.

Die Struktur von NAPA und hierbei insbesondere das Vorliegen eines sekundären Amins lassen vermuten, dass es möglicherweise zu einer metabolischen Bildung eines *N*-Nitrosamins aus NAPA kommen kann. Diese Nitrosierung zu *N*-Nitroso-NAPA (NO-NAPA) könnte sowohl endogen durch nitrosierende Spezies im Gastrointestinal-Trakt, als auch direkt in verschiedenen Lebensmitteln erfolgen. Im Comet Assay in primären Rattenhepatozyten sind nun beide Verbindungen nicht in der Lage, bis zur maximal löslichen Konzentration von 3 mM DNA-Strangbrüche zu induzieren. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Kohl [2007] überein, die in CYP 2E1 profizienten V79MZh2E1 Zellen keine DNA-Strangbrüche durch NO-NAPA im Comet Assay nachweisen konnte.

Sollte also NO-NAPA in DNA-alkylierende Intermediate überführt werden, so kommen aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nur DNA-Addukte in Frage, die mit Hilfe des Comet Assays nicht nachweisbar sind. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass eine Aktivierung unter den gewählten Bedingungen nur unzureichend oder gar nicht erfolgt. Daher sind weitere Versuche, auch mit möglicherweise anderen Aktivierungsmodellen (S9-Mix, Supersomes, etc.) zu empfehlen.

5. Zusammenfassung und Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das genotoxische Potential von Acrylamid (AA) und dessen reaktiven Metaboliten Glycidamid (GA) im Vergleich zu den α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen Ac und Hex, den *N*-Nitrosoverbindungen α-Acetoxy-NDELA, MNU, HENU, MNNG und vier *N*-Nitroso-oxazolidinonen sowie zu (±)-anti-BPDE in den biologischen Systemen humanes Vollblut und V79 Zellen ermittelt. Die Induktion von DNA-Strangbrüchen, der Einfluss von GSH auf die Genotoxizität sowie die Reduktion von DNA-Schäden wurden mit Hilfe des alkalischen Comet Assays bestimmt. Durch Verwendung verschiedener Modifikationen (zusätzliche Inkubation der DNA mit dem DNA-Reparaturenzym FPG, Modifikation des pH-Wertes während der DNA-Entwindung und Elektrophorese) wurden Hinweise auf die Art der DNA-schädigenden Wirkung erhalten.

Der *hPRT*-Genmutations-Assay in V79 Zellen wurde zur Bestimmung der Mutagenität der Verbindungen durchgeführt.

I) Genotoxizität in Vollblut und isolierten Lymphozyten

a) α,β–ungesättigte Carbonylverbindungen

Die α,β–ungesättigten Carbonylverbindungen AA, Ac und Hex induzieren in humanem Vollblut bis 6000 µM keine DNA-Strangbrüche. Dagegen sind Ac und Hex in isolierten Lymphozyten in hohen Konzentrationen DNA-strangbrechend (3000-6000 µM).

AA ist demnach unter den gewählten Inkubationsbedingungen nicht genotoxisch. Dies erklärt sich vor allem damit, dass AA eine äußerst geringe Bindungsaffinität gegenüber der DNA [Friedman, 2003], allerdings eine deutlich größere Reaktivität gegenüber anderen Blutbestandteilen aufweist. So beschrieben Bertow et al. [2007], dass AA bereits ab 0,3 µM (4 h) an das N-terminale Valin in Hämoglobin bindet.

Die unterschiedliche Reaktivität von Ac und Hex gegenüber der DNA in Vollblut und isolierten Lymphozyten können mit deren Elektrophilie erklärt werden. Beide Verbindungen reagieren voraussichtlich im Vollblut mit GSH [Beiswanger et al., 1993; Glaab et al., 2001] oder anderen nukleophilen Blutbestandteilen und werden somit vermutlich vor Erreichen der DNA detoxifiziert. Das gesteigerte DNA-schädigende Potential von Ac und Hex in isolierten Lymphozyten verdeutlicht den Einfluss der Anwesenheit von detoxifizierenden Makromolekülen als Bindungspartner in Vollblut.

b) Glycidamid

GA ist sowohl in Vollblut als auch in isolierten Lymphozyten ab 300 µM signifikant DNA-strangbrechend. Die zusätzliche Behandlung der DNA mit dem DNA-Reparaturenzym FPG führt zu einer deutlichen Erhöhung der DNA-Strangbrüche, welche bereits ab Konzentrationen von 10-100 µM detektiert werden können. Der Vergleich mit den Ergebnissen von Bertow et al. [2007] zeigt, dass GA in humanem Vollblut in vergleichbaren Konzentrationen an die DNA und das N-terminale Valin im Hämoglobin (3 µM, 4 h) bindet.
GA besitzt im Vergleich zu AA eine etwas 100-1000-fach höhere Affinität zur DNA [Friedman, 2003] und interagiert mit deren Basen unter hauptsächlicher Bildung des N^7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-Guanin-Adduktes (N^7-G) [Segerbäck et al., 1995; Gamboa da Costa et al., 2003]. Eine Alkylierung am N^7-G führt u. a. zur Destabilisierung der glykosidischen Bindung zwischen Base und Zucker-Phosphat-Strang. In der Folge wird die veränderte Base mittels Depurinierung aus der DNA unter Bildung von AP Stellen entfernt [Gates et al., 2003 (rev.)]. Unter den alkalischen Bedingungen des Comet Assays während der DNA-Entwindung (pH >13) werden alkali-labile AP Stellen in DNA-Strangbrüche überführt [Tice et al., 2000]. Diese tragen neben DNA-Strangbrüchen aus DNA-Reparaturprozessen zur Gesamtheit der DNA-Schädigung bei. Zusätzlich zur Depurinierung unterliegen N^7-G-Addukte einer Ringöffnung zu Formamido-pyrimidinen (FaPy), welche unter physiologischen Bedingungen in der DNA stabil sind [Chetsanga et al., 1982] und durch Enzyme der BER, wie z.B. FPG, repariert werden [Boiteux et al. 1989 & 1992; Laval et al., 1991; Li et al., 1997]. Hierbei erkennt die DNA-Glykosylase u. a. FaPy und entfernt diese unter Erhalt einer AP Stelle aus der DNA. Diese sowie spontan durch Depurinierung entstandene AP Stellen werden durch die AP-Lyase unter Entfernung des Deoxyribosephosphats in einen DNA-Strangbruch überführt [Laval, 1996]. Für die durch GA induzierten FPG-sensitiven DNA-Schäden sind also vermutlich sowohl die Bildung von FaPy als auch AP Stellen ausgehend vom N^7-G-Addukt verantwortlich.

c) *N*-Nitrosamide

MNU ist in humanem Vollblut vergleichbar genotoxisch wie GA (-FPG: 100 µM; +FPG: 10 µM). Da MNU wie GA hauptsächlich N^7-Addukte am Guanin induziert [Beranek et al., 1980; Wurdeman et al., 1989], lässt sich dessen DNA-strangbrechendes Potential ebenfalls durch die Entstehung von AP Stellen sowie ring-geöffneten Imidazolen ausgehend vom N^7-Methyl-G-Addukt erklären. Zusätzlich zu diesen Addukten konnte für MNU auch die Methylierung am O^6-G [Beranek et al., 1980; Wurdeman et al., 1989] sowie an den Phosphatgruppen des DNA-Rückgrates beobachtet werden [Conrad et al., 1986; Müller et al., 1987]. O^6-G-Addukte werden durch die Methyl-Guanin-Methyl-Transferase (MGMT) [Christmann et al., 2003 (rev.)] unter Erhalt der ursprünglichen Guanin-Base repariert. Diese Reparatur führt nicht zur Induktion von DNA-Strangbrüchen, die im Comet

Assay nachweisbar wären. Die ebenfalls gebildeten Methyl-Phosphotriester verbleiben stabil in der DNA [Conrad et al., 1986; Müller et al., 1987] und gehen nicht in DNA-Strangbrüche über.

d) *N*-Nitroso-oxazolidinone

NOZ-2 induziert DNA-Schäden in humanem Vollblut ab 100 µM. FPG-sensitive DNA-Schäden sind ab 300 µM detektierbar. Im Gegensatz dazu, ist NOZ-5 ohne FPG-Behandlung nur gering DNA-strangbrechend. Durch zusätzliche FPG-Behandlung ist ein deutlicher Anstieg der DNA-Strangbruchrate festzustellen (> 0,1 µM). Die methylierten NOZ-5-Analoga sind deutlich geringer aktiv. Der Einfluss von FPG auf die DNA-Strangbruchrate bei beiden Verbindungen ist gering.

N-Nitroso-oxazolidinone werden durch Hydrolyse in DNA-alkylierende Diazoniumionen überführt; NOZ-2 voraussichtlich in ein 2-hydroxyethylierendes, NOZ-5 sowie 2-Me-NOZ-5 in ein methylierendes und / oder carboxymethylierendes und 4-Me-NOZ-5 in ein carboxyethylierendes Agens. Für Verbindungen, die in vergleichbare DNA-alkylierende Intermediate überführt werden (z.B. NDELA, MNU, Azaserin), ist gezeigt, dass diese mit Guanin an den Positionen N^7- und O^6 sowie an die Phosphatgruppen des DNA-Rückgrates interagieren. Es ist zu erwarten, dass die hauptsächlich gebildeten N^7-G-Addukte, unabhängig von der Art des Substituenten, entweder spontan unter Erhalt einer AP Stelle depuriniert oder durch Ringöffnung in FaPy überführt werden [Gates et al., 2004 (rev.)]. Die alkali-labilen AP Stellen werden während der DNA-Entwindung in DNA-Strangbrüche gespalten, sie sind aber auch Substrat von FPG, welches wiederum beide Modifikationen aus der DNA als DNA-Strangbruchs spaltet. Es zeigt sich allerdings lediglich für NOZ-5 das für hauptsächlich N^7-alkylierende Agentien charakteristische Schadensmuster (vgl. GA und MNU). Eine Erklärung dafür könnten die ebenfalls gebildeten Phosphotriester sein, die sich in Abhängigkeit des jeweiligen Substituenten hinsichtlich ihrer Stabilität deutlich unterscheiden. Während Methyl-Phosphotriester, wie sie möglicherweise von NOZ-5 induziert werden, stabil in der DNA verbleiben [Conrad et al., 1986; Eisenbrand et al., 1986], wird vermutet, dass die 2-hydroxyethylierten Analoga ausgehend von NOZ-2 äußerst instabil sind und unmittelbar nach ihrer Bildung in DNA-Strangbrüche übergehen [Conrad et al., 1986; Eisenbrand et al., 1986]. Eine Hypothese ist daher, dass für NOZ-2 die Bildung instabiler Phosphotriester für das Ausmaß an DNA-Strangbrüchen verantwortlich ist und der Nachweis von N^7-G-Addukten nach FPG-Behandlung überlagert wird. Anders ist die Situation für NOZ-5, welches vermutlich stabile Phosphotriester induziert, sodass ein Nachweis von N^7-G-Addukten mit FPG-Behandlung möglich wird.

e) (±)-anti-BPDE

Das potente Kanzerogen (±)-anti-BPDE ist unter den gewählten Bedingungen ab Konzentrationen von 30 µM potent DNA-strangbrechend. Es ist bekannt, dass BPDE hauptsächlich N^2-G-Addukte induziert [Cheng et al., 1989; Geacintov et al., 1997]. Diese „bulky adducts“ sind äußerst stabil und können nur durch Reparaturenzyme der Nukleotid-Excisions-Reparatur (NER) aus der DNA entfernt werden [Gunz et al., 1996; McLeod et al., 1991; Yang et al., 1982]. In geringeren Anteilen werden instabilere Addukte, wie z.B. N^7-G und N^3-A [Ochi et al., 1986; Braithwaite et al., 1998; 1999] gebildet, die als DNA-Strangbrüche im Comet Assay nachweisbar sind. Die im Comet Assay erhaltenen DNA-Strangbrüche sind also vermutlich hauptsächlich auf AP Stellen instabiler DNA-Addukte [Sage et al., 1984; Ochi et al., 1986] oder auf Reparaturprozesse [Speit et al., 1996] zurückzuführen, spiegeln also demnach möglicherweise nicht die komplette BPDE-induzierte DNA-Schädigung wider.

GA ist folglich im Comet Assay mit FPG in humanem Vollblut in gleichen Konzentrationsbereichen aktiv wie potente genotoxische und kanzerogene Verbindungen, z.B. (±)-anti-BPDE oder verschiedene *N*-Nitrosoverbindungen.

II) Genotoxizität in V79 Zellen

Im Vergleich zu humanem Vollblut wurde in V79 Zellen die Induktion von DNA-Schäden im Comet Assay bei pH >13 und 12,1, die Kinetik der Reduktion von DNA-Strangbrüchen sowie orientierend der Einfluss von GSH auf die Induktion von DNA-Strangbrüchen untersucht. Vergleichend dazu wurde die Induktion von *hPRT*-Genmutationen bestimmt.

a) α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen

Die beiden α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen Ac und Hex sind in V79 Zellen um Faktor 50-100 genotoxischer als in isolierten Lymphozyten. Ac und Hex induzieren DNA-Strangbrüche konzentrationsabhängig ab 60 µM bzw. 100 µM. Beide Verbindungen induzieren keine spezifisch FPG-sensitiven DNA-Schäden. Dies stimmt mit den Daten von Glaab et al. [2000] überein. Zudem konnte durch Co-Inkubation mit 1 mM GSH das DNA-schädigende Potential von Ac und Hex signifikant reduziert werden. Ac und Hex besitzen ein ausgeprägtes elektrophiles Potential. Beide binden daher effektiv an nukleophile Stellen der DNA [Eder et al., 1993b; Gölzer et al., 1996] und werden gleichsam von GSH [Glaab et al., 2000] entgiftet.

Im Comet Assay bei pH 12,1 zeigt sich für Ac eine signifikante Abnahme der DNA-Strangbruchrate im Vergleich zu pH >13. Ein Teil der durch Ac induzierten DNA-Strangbrüche ist demnach vermutlich der Entstehung von alkali-labilen Stellen zuzuschreiben.

b) Glycidamid

GA induziert in V79 Zellen zeit- und konzentrationsabhängig in vergleichbaren Konzentrationsbereichen DNA-Strangbrüche wie in humanem Vollblut ab 1000 µM (1 h). Nach FPG-Behandlung erhöht sich die DNA-Strangbruchrate signifikant (100 µM; 1 h). Die Induktion von DNA-Strangbrüchen ist nach 24-stündiger Inkubation maximal. Im Comet Assay bei pH 12,1 zeigt sich eine signifikante Reduktion der DNA-Strangbruchrate. Im Gegensatz zum Comet Assay bei pH >13 ist die DNA-Schädigung nach FPG-Behandlung nur noch gering gegenüber der Grundschädigung erhöht.

Die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch GA kann mit der Bildung des N^7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin (N^7-G) [Segerbäck et al., 1995; Gamboa da Costa et al., 2003] erklärt werden. Die DNA-Strangbrüche vor FPG-Behandlung können neben Reparatur-bedingten DNA-Strangbrüchen, vor allem auf einen Teil der aus N^7-GA-G gebildeten AP Stellen zurückgeführt werden, die bei pH >13 aus der DNA entfernt werden. Zusätzlich zur Umformung in AP Stellen werden diese Addukte durch Ringöffnung in FaPy überführt, welche gemeinsam mit AP Stellen Substrat des DNA-Reparaturenzyms FPG sind [Boiteux et al., 1989 & 1992; Laval et al., 1991; Li et al., 1997]. Diese erkennt beide Basen-Modifikationen und überführt sie in zusätzliche DNA-Strangbrüche [Laval et al., 1996]. Der Unterschied der Tail Intensity von FPG-sensitiven und nicht sensitiven DNA-Schäden kann jedoch nicht ausschließlich mit der Entstehung von FaPy begründet werden, da im Comet Assay bei pH >13 aufgrund der kurzen DNA-Entwindungszeit nur ein Teil der AP Stellen in DNA-Strangbrüche überführt wird [Collins et al., 2004]. Aussagen über das Verhältnis zwischen Depurinierung und Ringöffnung der N^7-G-Addukte sollten nach Modifikation des pH-Wertes bei DNA-Entwindung und Elektrophorese getroffen werden. Bei einem pH-Wert von 12,1 während der DNA-Entwindung werden AP Stellen nicht in DNA-Strangbrüche überführt [Miyamae et al., 1997]. Die Abnahme der DNA-Strangbrüche bei pH 12,1 im Vergleich zu pH >13 ist also Indiz für die Entstehung von alkali-labilen AP Stellen. Die Reduktion FPG-sensitiver DNA-Schäden bei pH 12,1 gegenüber pH >13 könnte möglicherweise ein Hinweis auf einen unvollständigen Reparaturprozess sein. So werden, wie bereits erwähnt, AP Stellen, ob durch spontane Depurinierung oder nach Entfernung von FaPy durch eine DNA-Glykosylase entstanden, durch die AP-Lyase-Aktivität von FPG in DNA-Strangbrüche überführt. Erfolgt nun dieser Schritt der Reparatur nur unzureichend, verläuft die Spaltung von alkali-labilen AP Stellen in DNA-Strangbrüche in der alkalischen Variante des Comet Assays aufgrund des pH-Wertes während der DNA-Entwindung und Elektrophorese. Im Comet Assay bei pH 12,1 verbleiben diese allerdings in der DNA und sind nicht mehr nachweisbar.

Die Ergebnisse der Co-Inkubation von GA und GSH in V79 Zellen zeigen, dass auch ein extrazellulärer Überschuss an GSH keine Reduktion der DNA-Strangbruchrate verur-

sacht. Im hier gewählten Inkubationsmodell wird GA demnach nicht durch eine Bindung an GSH detoxifiziert.

c) *N*-Nitrosamide

Die *N*-Nitrosoharnstoffe MNU und HENU induzieren im alkalischen Comet Assay ab 300 µM bereits nach 15 Minuten DNA-Strangbrüche. MNNG ist deutlich aktiver und verursacht DNA-Schäden bereits ab 0,3 µM (4 h). Für MNU und HENU ist die maximale DNA-Schädigung nach 1-4 h detektierbar, nach 24 h sinkt das Ausmaß an DNA-Strangbrüchen.

Wenngleich beschrieben ist, dass die *N*-Nitrosamide hauptsächlich DNA-Addukte am N^7-G induzieren [Lawley et al., 1970; Smith et al., 1988; Wurdeman et al., 1989; Fong et al., 1990], führt die Inkubation mit FPG lediglich in MNU- und in geringerem Ausmaß auch in MNNG-behandelten Zellen zu zusätzlichen DNA-Strangbrüchen. Ursächlich dafür scheint die Bildung von Phosphotriestern zu sein, die sich in Abhängigkeit des jeweiligen Substituenten in ihrer Stabilität deutlich unterscheiden [Conrad et al., 1986; Müller et al., 1987]. Die durch HENU hervorgerufenen, instabilen 2-Hydroyxethyl-Phosphotriester [Conrad et al., 1986; Müller et al., 1987] überlagern vermutlich den Nachweis von N^7-G-bedingten DNA-Schäden, da sie unmittelbar nach ihrer Bildung in DNA-Strangbrüche übergehen. Im Gegensatz dazu verbleiben die von MNU und MNNG induzierten Methyl-Phosphotriester stabil in der DNA, sind als DNA-Strangbrüche somit nicht detektierbar und ermöglichen mittels FPG den Nachweis von DNA-Strangbrüchen aus N^7-G-Addukten. O^6-G-Addukte sind aufgrund ihrer Stabilität ebenfalls nicht im Comet Assay nachweisbar, sind aber bezüglich der MGMT-Defizienz der V79 Zellen relevant für die mutagenen Eigenschaften der Verbindungen. So ist MNNG im *hPRT*-Genmutations-Assay abhängig vom gewählten Selektionsreagenz bereits ab 0,5-3 µM aktiv [Bradley et al., 1981; Mertes, 2003]. Im Gegensatz dazu sind sowohl MNU als auch HENU deutlich schwächer aktiv. Für MNU konnten Mutationen am *hPRT*-Locus von V79 Zellen ab 300 µM nachgewiesen werden. Vergleichend dazu, ist HENU in Konzentrationen von 30-300 µM schwach, ab 1000 µM potent mutagen. Die Untersuchung zur Reduktion von HENU-induzierten DNA-Strang-brüchen zeigt, dass in schwach mutagenen Konzentrationen DNA-Strangbrüche bis auf das Niveau der Negativkontrolle reduziert werden können, dies in stark mutagenen Konzentrationen jedoch nicht mehr möglich ist. Bis zu einer Konzentration von 300 µM sind vermutlich im Wesentlichen in V79 Zellen nicht reparierbare DNA-Addukte an der O^6-Position des Guanins für die Mutagenität von HENU verantwortlich. In Konzentrationen ab 1000 µM, in denen im Comet Assay detektierbare DNA-Strangbrüche nicht mehr effektiv reduziert werden können, wird vermutet, dass zusätzlich zu den promutagenen O^6-G-Addukten, auch nicht reparierte Läsionen am N^7-G sowie DNA-Strangbrüche aus instabilen 2-Hydroxyethyl-Phosphotriestern zum mutage-

nen Potential von HENU beitragen. Für MNU ist zu erwarten, dass DNA-Addukte am N^7-G, wie bei GA beobachtet, effektiv und schnell repariert werden und erst bei überlasteter BER mutagen wirken. Bedeutsam für die Mutagenität von MNU scheinen daher insbesondere die in V79 Zellen persistierenden O^6-Methyl-G-Addukte sowie stabile Methyl-Phosphotriester zu sein.

Da MNNG nicht wie MNU und HENU hydrolytisch, sondern durch Thiol-Gruppen aktiviert wird [Lawley et al., 1970], sollte durch Co-Inkubation von MNNG und GSH geklärt werden, ob das DNA-strangbrechende Potential von MNNG durch Erhöhung des GSH-Gehaltes weiter gesteigert werden kann. Allerdings zeigt sich, dass vielmehr hierdurch die Genotoxizität von MNNG signifikant abnimmt. Einen vergleichbaren Effekt beobachteten auch Romert et al. [1997]. Es ist zu vermuten, dass aufgrund des hohen extrazelluläre GSH-Spiegels MNNG möglicherweise bereits außerhalb der Zelle in das reaktive Methyl-Diazoniumion zerfällt, welches dann wiederum bereits vor Erreichen der DNA aufgrund seiner geringen Selektivität und hohen Reaktivität mit anderen zellulären Bestandteilen abreagieren kann.

d) *N*-Nitroso-oxazolidinone

NOZ-2 induziert in V79 Zellen bereits nach 15 Minuten ab 1 µM DNA-Schäden. Die Induktion von DNA-Strangbrüchen ist nach 1-4 h maximal. Der Vergleich der Reaktivität von NOZ-2 in V79 Zellen und humanem Vollblut (1 und 4 h) zeigt, dass NOZ-2 in V79 Zellen potenter DNA-strangbrechend ist als in humanem Vollblut. Die zusätzliche Behandlung der DNA mit FPG bewirkt nur eine leichte Erhöhung der DNA-Strangbruchrate. Im Vergleich dazu, zeigt sich im Comet Assay bei pH 12,1 eine signifikante Abnahme der Tail Intensity von FPG-sensitiven und nicht sensitiven DNA-Schäden. NOZ-2 ist im *hPRT*-Genmutations-Assay potent mutagen ab 3 µM. Die Untersuchungen zur Kinetik der Reduktion von DNA-Strangbrüchen verdeutlicht, dass NOZ-2-induzierte DNA-Strangbrüche zwar im Verlauf der 8-stündigen Nachinkubation auch in potent mutagenen Konzentrationen reduziert werden, ein Rückgang auf das Niveau der Negativkontrolle DMSO kann aber nicht festgestellt werden.

NOZ-5 ist wie NOZ-2 schon nach 15 Minuten DNA-strangbrechend (30 µM). Wie bereits nach Inkubation von humanem Vollblut mit NOZ-5 festgestellt wurde, ist auch in V79 Zellen der Anteil nicht FPG-sensitiver DNA-Schäden nur gering ausgeprägt. Die Behandlung mit FPG führt zu einem signifikanten Anstieg der DNA-Strangbruchrate. Auch für NOZ-5 ist die DNA-Schädigung nach 1-4 h maximal. NOZ-5 ist in V79 Zellen nach Inkubationszeiten von 1 und 4 h geringer DNA-strangbrechend als in Vollblut. NOZ-5 induziert Mutationen am *hPRT*-Locus von V79 Zellen ab 10 µM. Die Untersuchung zur Reduktion von DNA-Strangbrüchen (4 h Inkubation) mit Hilfe des Comet Assays zeigt in schwach mutagenen Konzentrationen bis 30 µM eine effektive Abnahme der FPG-sensitiven DNA-

Schäden. In Konzentration >100 µM wird keine Reduktion bis auf das Niveau der Negativkontrolle beobachtet.
Die ebenfalls untersuchten methylierten NOZ-5-Analoga sind in V79 Zellen sowohl im Comet Assay ± FPG als auch im *hPRT*-Genmutations-Assay nicht aktiv.

Es wird angenommen, dass *N*-Nitroso-oxazolidinone durch Hydrolyse in DNA-alkylierende Diazoniumionen überführt werden, wobei NOZ-2 in ein 2-hydroxyethylierendes, NOZ-5 sowie 2-Me-NOZ-5 in ein methylierendes und / oder carboxymethylierendes und 4-Me-NOZ-5 in carboxyethylierendes Agens zerfallen. Diese binden voraussichtlich an die Positionen N^7- und O^6-G sowie an die Phosphatgruppen des DNA-Rückgrates. Insbesondere letztere nehmen vermutlich entscheidenden Einfluss auf das jeweilige Schadensmuster. So zeigt sich auch in V79 Zellen für das vermutlich 2-hydroxyethylierende NOZ-2 nur ein geringer Unterschied zwischen DNA-Grund- und FPG-sensitiven DNA-Schäden, wohingegen dieser beim potentiell methylierenden und / oder carboxymethylierenden NOZ-5 besonders deutlich ausgeprägt ist. Wie bereits zur Induktion von DNA-Schäden in humanem Vollblut diskutiert, scheinen für NOZ-2 die instabilen 2-Hydroxyethyl-Phosphotriester den Nachweis von N^7-G-bedingten DNA-Strangbrüchen zu überlagern. Die Reduktion der DNA-Strangbrüche im Comet Assay bei pH 12,1 zeigt jedoch, dass AP Stellen, die vermutlich aus N^7-Hydroxyethyl-G-Addukten resultieren, zur Gesamtheit der DNA-Strangbrüche beitragen. Die Ergebnisse zur Reduktion von NOZ-2-induzierten DNA-Strangbrüchen lassen vermuten, dass die durch NOZ-2 induzierten DNA-Schäden teilweise repariert werden, die Reparatur jedoch selbst in schwach mutagenen Konzentrationen nicht vollständig stattfindet, sodass beide DNA-Modifikationen möglicherweise gemeinsam mit nicht reparierbaren O^6-G-Addukten zur Mutagenität von NOZ-2 beitragen.
Die durch NOZ-5 induzierten Methyl-/Carboxymethyl-Phosphotriester sind vermutlich stabil und werden nicht spontan in DNA-Strangbrüche überführt. Daher ist anzunehmen, dass die im Comet Assay nachgewiesenen DNA-Strangbrüche hauptsächlich auf N^7-G-Addukte und deren Folgeprodukte zurückzuführen sind. Die Untersuchungen zur Reduktion von DNA-Strangbrüchen lassen vermuten, dass diese instabilen DNA-Addukte innerhalb der Nachkultivierungszeit zumindest in schwach mutagenen Konzentrationen >30 µM nahezu vollständig repariert werden. Es wird daher angenommen, dass u. a. die stabilen DNA-Läsionen an O^6-G und Phosphatgruppen für das mutagene Potential der Verbindung verantwortlich sind. Erst in höheren Konzentrationen tragen auch möglicherweise N^7-G-Addukte aufgrund ineffektiver Reparatur zur Mutagenität von NOZ-5 bei.

III) Induktion von DNA-Schäden in primären Rattenhepatozyten

Eine Vielzahl von indirekten Kanzerogenen bedarf der metabolischen Aktivierung durch Phase I-Enzyme (z.B. Cytochrom P450) des Fremdstoffmetabolismus, um mit der DNA oder anderen nukleophilen Bestandteilen von Zellen reagieren zu können. Zur Prüfung der Genotoxizität solcher Verbindungen eignen sich besonders Primärkulturen von Hepatozyten, da die Leberparenchymzelle über das fast komplette für den Fremdstoffmetabolismus relevante Enzymmuster mit hoher Aktivität verfügt.

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob das möglicherweise durch endogene Nitrosierung aus NAPA gebildete *N*-Nitroso-NAPA nach metabolischer Aktivierung DNA-Schäden in primären Rattenhepatozyten induziert. Im Vergleich dazu wurde NDELA untersucht, welches durch metabolische, enzym-katalysierte Aktivierung in DNA-alkylierende Intermediate überführt wird.

NDELA induziert in primären Rattenhepatozyten konzentrations- und zeitabhängig DNA-Strangbrüche ab 3 mM (4 h) mit und ohne FPG-Behandlung. Die metabolische Aktivierung von NDELA erfolgt über zwei Wege. In *in-vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Oxidation sowohl in α- als auch in β-Position erfolgen kann [Loeppky et al., 2002a]. Durch CYP2E1-vermittelte Hydroxylierung des α-C-Atoms [Loeppky et al., 2002] wird zunächst das äußerst instabile α-Hydroxy-NDELA gebildet, welches spontan in Glycolaldehyd und ein hochreaktives, DNA-alkylierendes 2-Hydroxyethyl-diazoniumion zerfällt [Dennehy et al., 2005]. Weiterhin kann auch eine Metabolisierung via β-C-Oxidation erfolgen. Das dadurch entstehende Aldehyd-Isomer steht im Gleichgewicht mit dem zyklischen *N*-Nitroso-2-hydoxymorpholin (NHMOR), das eine direkte mutagene und genotoxische Wirkung besitzt [Loeppky et al., 1998]. Eine Weiteroxidation von Glycolaldehyd und NHMOR führt zur Bildung von Glyoxal, welches ebenfalls mit der DNA interagieren kann [Dennehy et al., 2005; Loeppky et al., 2005].

Wie *in-vitro* und *in-vivo* gezeigt werden konnte, induziert NDELA 2-Hydroxyethyl-Addukte am N^7 und O^6 des Guanins [Farrelly et al., 1987; Scherer et al., 1991]. Diese Addukte konnten nach Behandlung mit dem Metabolit NHMOR nicht nachgewiesen werden [Scherer et al., 1991]. NHMOR bildet hauptsächlich stabile 1,N^2-Glyoxal-Addukte mit Guanin [Loeppky et al., 2002b]. Zusätzlich kommt es möglicherweise zur Entstehung von instabilen 2-Hydroxyethyl-Phosphotriestern. Dies konnte bereits mit anderen vergleichbar reaktiven Verbindungen (z. B. N-(2-hydroxyethyl)-N-nitroso-harnstoff (HENU)) gezeigt werden [Conrad et al., 1996; Müller et al., 1987].

Es ist also zu vermuten, dass NDELA zwar hauptsächlich N^7-G-Addukte induziert, die schnell in DNA-Strangbrüche übergehenden 2-Hydroxyethyl-Phosphotriester deren Nachweis im Comet Assay allerdings überlagern. Gleiches gilt möglicherweise auch für DNA-Reparatur-bedingte DNA-Strangbrüche aus Glyoxal-Addukten. Addukte am O^6-G

werden von MGMT repariert. Durch diese Reparatur entstehen keine DNA-Strangbrüche, die im Comet Assay nachweisbar sind.

Die Struktur von NAPA und hierbei insbesondere das Vorliegen eines sekundären Amins geben Anlass zur Besorgnis, dass es zu einer Bildung des *N*-Nitrosamins *N*-Nitroso-NAPA (NO-Neo) aus NAPA kommen kann. Diese Nitrosierung zu könnte sowohl endogen durch nitrosierende Spezies im Gastrointestinal-Trakt, als auch in verschiedenen Lebensmitteln erfolgen. Im Comet Assay in primären Hepatozyten sind beide Verbindungen nicht in der Lage, bis zur maximal löslichen Konzentration von 3 mM DNA-Strangbrüche zu induzieren. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Kohl [2007] überein, die in CYP 2E1 profizienten V79MZh2E1 Zellen keine DNA-Strangbrüchen durch NO-NAPA im Comet Assay nachgewiesen hatte.

Sollte also NO-Neo in DNA-alkylierende Intermediate überführt werden, so kommen aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nur DNA-Addukte in Frage, die mit Hilfe des Comet Assays nicht nachweisbar sind. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass eine Aktivierung unter den gewählten Bedingungen nur unzureichend oder gar nicht erfolgt. Daher sind weitere Versuche mit anderen Aktivierungsmodellen (S9-Mix, Supersomes, etc.) erforderlich.

6. Abschlussdiskussion

Entscheidend für die Risikoabschätzung von Kanzerogenen ist die Bewertung und Charakterisierung des zugrunde liegenden Wirkmechanismus.
Für genotoxische Kanzerogene wird angenommen, dass zwischen der Exposition, der Induktion von DNA-Schäden sowie deren Überführung in mutagene Veränderungen ein linearer Zusammenhang besteht [Henderson et al., 2000]. Folglich wird vermutet, dass für diese Verbindungen aufgrund ihres DNA-Bindungspotentials und der möglichen Bildung von Mutationen, kein Schwellenwert existiert. Zwar wird das Risiko der Krebsinzidenz mit abnehmender Dosis einer genotoxisch-kanzerogenen Substanz unwahrscheinlicher, ist aber theoretisch niemals gleich null [Kirsch-Volders et al., 2000, Barlow et al., 2006].
Diesem klassischen Modell der Wirkung genotoxischer Kanzerogene steht allerdings gegenüber, dass Säugerzellen *in-vivo* in der Lage sind, durch verschiedene Schutzmechanismen, wie z.B. chemische Detoxifizierung und DNA-Reparatur, der Entstehung und Manifestation genotoxischer Veränderungen entgegenzuwirken. Sofern diese Prozesse nicht überlastet oder gesättigt sind, kann die Alkylierung der DNA verhindert, oder durch DNA-Reparatur das Risiko der Entstehung von Mutationen minimiert werden.
Daraus ergibt sich theoretisch ein unterschwelliger Dosisbereich, unterhalb dessen experimentell kein signifikanter Anstieg der Mutationsrate detektierbar sein sollte [Jenkins et al., 2005].

In der vorliegenden Arbeit sollte an ausgewählten Verbindungen der Substanzklassen α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen, Epoxide und *N*-Nitroso-Verbindungen der Zusammenhang zwischen DNA-Schädigung, Detoxifizierung, DNA-Reparatur (Comet Assay) und der Entstehung von Mutationen (*hPRT*-Genmutations-Assay) untersucht werden. Als Zellsysteme wurden V79 Zellen sowie humanes Vollblut verwendet.

Das System humanes Vollblut stellt als erstes Target nach der Darm- und Leberpassage von Fremdstoffen ein interessantes System zur Prüfung deren Genotoxizität dar und besitzt gegenüber den häufiger im Comet Assay verwendeten isolierten Lymphozyten entscheidende Vorteile. So können genotoxische Verbindungen neben der Lymphozyten-DNA zusätzlich an andere Blutkomponenten, wie Hämoglobin (Hb), Albumin oder Glutathion (GSH) binden. Diese Interaktion führt vielfach zur Detoxifizierung der Verbindungen.
Die durchgeführten Untersuchungen belegen die Eignung des Systems Vollblut zur Prüfung auf Genotoxizität im Comet Assay. Zusätzlich zeigt der Vergleich mit isolierten Lymphozyten den Einfluss der Anwesenheit von „unkritischen“ Makromolekülen als Bin-

dungspartner auf die Genotoxizität von α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen, jedoch nicht von GA, welches in beiden Systemen vergleichbar genotoxisch ist. Dies lässt vermuten, dass in humanem Vollblut unter den gewählten Bedingungen die Bindung von GA an die DNA auch in Anwesenheit von möglichen entgiftenden Bindungspartnern nur unwesentlich beeinflusst wird.

In V79 Zellen sollte der Zusammenhang zwischen Induktion von DNA-Strangbrüchen, dem Einfluss von GSH auf die Genotoxizität sowie der Reduktion von DNA-Schäden mit Hilfe des alkalischen Comet Assays (± FPG) bestimmt werden. Die Induktion von Mutationen als Folge mangelnder Entgiftung von genotoxischen Agentien bzw. aufgrund fehlender oder unzureichender Reparatur von DNA-Schäden wurde mit Hilfe des *hPRT*-Genmutations-Assay bestimmt.

Das hauptsächliche N^7-G alkylierende GA induziert DNA-Schäden bereits ab 10-100 µM (1-4 h), *hPRT*-Mutationen sind jedoch erst ab 800 µM [Mertes, 2003] nachzuweisen. Genotoxische Schadensereignisse in tiefen Konzentrationen resultieren somit unter den gewählten Bedingungen nicht in nachweisbaren Mutationen. Die Ergebnisse des Comet Assays sind folglich nicht prädiktiv für die Mutagenität von GA im *hPRT*-Genmutations-Assay. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ergibt sich aus den Ergebnissen von Michael [2006]. Man zeigte, dass in nicht mutagenen Konzentrationen die durch GA induzierten DNA-Schäden in V79 Zellen nahezu vollständig repariert werden. Eine signifikant erhöhte Mutationsrate ist erst in Konzentrationen detektierbar, in denen eine Reduktion der DNA-Schäden nicht mehr effektiv stattfindet.
Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass V79 Zellen im Niedrig-Dosisbereich in der Lage sind, der Entstehung von Mutationen aus GA-induzierten DNA-Schäden durch DNA-Reparaturprozesse entgegenzuwirken.

Die untersuchten *N*-Nitrosoverbindungen induzieren hauptsächlich DNA-Addukte am N^7-Guanin [Lawley et al., 1970; Zurlo et al., 1982; Farrelly et al., 1987; Smith et al., 1988; Wurdeman et al., 1989; Fong et al., 1990; Shuker et al., 1997; Harrison et al., 1997 & 1998]. In geringerem Maß werden O^6-G-Addukte [Smith et al., 1988; Wurdeman et al., 1989; Shuker et al., 1997; Harrison et al., 1997 & 1998; Cupid et al., 2004] und Phosphotriester induziert. Letztere unterscheiden sich in Abhängigkeit des Substituenten in ihrer Stabilität [Conrad et al., 1986; Eisenbrand et al., 1986; Müller et al., 1987]. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass N^7-G-Addukte und DNA-Strangbrüche aus instabilen Phosphotriestern in schwach mutagenen Konzentrationen effektiv repariert werden. In diesen Konzentrationsbereichen haben demnach vermutlich hauptsächlich promutagene O^6-G-Addukte, die in V79 Zellen nicht repariert werden [Yarosh et al., 1985], Relevanz für das mutagene Potential der Verbindungen. Erst bei einer Überlastung der DNA-

Reparatur tragen vermutlich auch nicht reparierte Addukte am N^7-G sowie den Phosphodiestern des DNA-Rückgrats zur Mutagenität der *N*-Nitrosoverbindungen bei.

Es wurde gezeigt, dass der Comet Assay durch verschiedene Modifikationen eine sensitive Methode zum Nachweis der Genotoxizität von direkt oder indirekt DNA-alkylierenden Fremdstoffen darstellt und orientierende Aussagen über möglicherweise gebildete DNA-Addukte zulässt. Die Ergebnisse belegen, das das DNA-Reparaturenzym FPG, welches bislang *in-vivo* und *in-vitro* hauptsächlich zur Detektion spezifisch oxidativer DNA-Schäden eingesetzt wurde, auch zum Nachweis N^7-alkylierter Guanin-Addukte, speziell den daraus resultierenden ring-geöffneten Imidazolen (FaPy) und AP Stellen, geeignet ist.
Orientierende Aussagen über die Funktion von Schutzmechanismen gegenüber genotoxischen Veränderungen der DNA, wie z.B. chemische Detoxifizierung und DNA-Reparatur, können mit Hilfe des Comet Assays getroffen werden. Der Vergleich mit den Ergebnissen des *hPRT*-Genmutations-Assays gibt in der Folge Hinweise auf den Zusammenhang zwischen der Reparatur und Persistenz induzierter DNA-Addukte und deren Relevanz für das mutagene Potential der untersuchten Verbindungen.

Es lässt sich abschließend feststellen, dass durch Kombination von Genotoxizitäts- und Mutagenitätstests orientierende Aussagen über den Zusammenhang zwischen DNA-Alkylierung, Detoxifizierung, DNA-Reparatur und der Entstehung von Mutationen zu treffen sind.

7. Material und Methoden

7.1. Blutentnahme, Lymphozytenisolierung und Zellkultur

7.1.1. Blutentnahme

Alle verwendeten Blutproben stammen von gesunden, männlichen Nichtrauchern im Alter zwischen 25 und 35 Jahren. Diese Auswahl begründet sich darin, dass sowohl das Alter der Probanden als auch durch Zigarettenrauch ausgelöste DNA-Schäden einen Effekt auf die Hintergrundwerte und FPG-sensitiven DNA-Schäden im Comet Assay haben können [Diem et al., 2002; Hoffmann et al., 2005].

Die Entnahme erfolgt unmittelbar vor Versuchsbeginn in EDTA-beschichtete Monovetten. Das Entnahmevolumen beträgt pro Versuchsansatz maximal 8 ml. Um ein eventuelles Absetzen von festen Blutbestandteilen zu verhindern, werden die Monovetten bis zum Versuchsbeginn vorsichtig geschüttelt.

Die Inkubation von Vollblut erfolgt maximal bis 4 h, da in Voruntersuchungen ab Inkubationszeiten von 6 h eine deutliche Abnahme der Zellzahl festzustellen war.

7.1.2. Lymphozytenisolierung

Die Isolierung primärer Lymphozyten erfolgt mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Histopaque®. Bei Histopaque® handelt es sich um eine Lösung aus Polysaccharose und Natriumdiatrizoat mit einer Dichte von 1,077. Hiermit ist eine rasche Gewinnung von mononukleären Zellen aus kleinen Blutvolumina möglich. Dazu werden 7 ml auf Raumtemperatur temperiertes Histopaque® mit 7 ml Antikoagulans-behandeltem, venösem Vollblut vorsichtig überschichtet und anschließend für 25 min mit 1600 rpm bei RT zentrifugiert. Durch die Zentrifugation werden Erythrozyten und Granulozyten durch die Polysaccharose aggregiert und rasch sedimentiert, während die Lymphozyten und andere mononukleäre Zellen in der Plasma-Histopaque®-Interphase verbleiben (**Abb. 89**). Die Lymphozyten können aus dieser Interphase durch vorsichtiges Abpipettieren gewonnen werden.

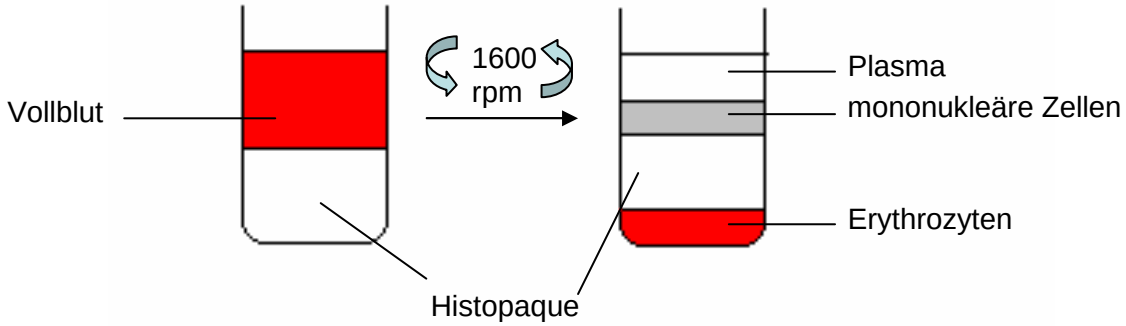


Abb. 89: Prinzip der Lymphozytenisolierung mittels Histopaque®

Mögliche Verunreinigungen, welche durch Thrombozyten oder Erythrozyten entstehen, werden anschließend durch zweimaliges Waschen in FKS-haltigem RPMI-1640 Zellkulturmedium (Zentrifugation 10 min bei 1400 rpm) entfernt. Im Anschluss erfolgt die Bestimmung von Zellzahl und Viabilität mittels Trypanblau-Ausschlußtest (s. **7.1.3.4**).

7.1.3. Kultivierung der V79-Zelllinie

7.1.3.1. Grundlagen

Alle Arbeiten mit V79 Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. V79 Zellen stammen aus einer Kultur vom Lungengewebe eines männlichen chinesischen Hamsters [Glatt et al., 1993]. Die Kultivierung der Zelllinie erfolgt in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) unter Zusatz von 10% FKS, 5 ml Natriumpyruvat, 5 ml Penicillin/Streptomycin und Phenolrot (N-Medium).
Die Zellen werden bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit in Kulturflaschen mit einer Fläche von 25, 50 bzw. 175 cm^2 kultiviert.

7.1.3.2. Mediumwechsel

Zellen benötigen zu ihrem Wachstum und zur Viabilitätserhaltung optimale Bedingungen. Der daher regelmäßig durchgeführte Medienwechsel dient zur Zufuhr neuer Nährstoffe und zum Entfernen von Stoffwechselprodukten. Der Mediumwechsel wird je nach Proliferationsgeschwindigkeit und Metabolismus der Zellen durchgeführt. Der Zeitpunkt wird durch den Farbumschlag von rot nach gelb des im Medium enthaltenen Phenolrots festgelegt (Umschlagsbereich bei pH 6,4 – 8,2).

Nach Entfernen des Mediums werden die Zellen zweimal mit PBS gespült, anschließend wird den Zellen wieder Nährmedium zugefügt.

7.1.3.3. Subkultivierung (Passage)

Um einen Wachstumsstillstand oder Absterben der Kultur zu vermeiden, muss im Abstand von maximal 3 Tagen eine Subkultivierung erfolgen.
Dafür wird das Medium entfernt und die am Flaschenboden haftenden Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen werden anschließend mittels Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflasche gelöst und in verringerter Zahl wieder ausgesät.

7.1.3.4. Bestimmung der Zellzahl und Viabilität

Zur Bestimmung von Zellzahl und Viabilität werden die Zellen mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 angefärbt. Der Farbstoff durchdringt geschädigte Zellmembranen toter Zellen und färbt diese blau. Die ungeschädigte Zellmembran ist undurchlässig für Trypanblau. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wird die Zahl der lebenden und toten Zellen mikroskopisch bestimmt.
Die prozentuale Viabilität ergibt sich als Verhältnis der Anzahl lebender Zellen zur Gesamtanzahl der Zellen mal 100.

7.1.3.5. Einfrieren der Zellen

In 2 ml Kryoröhrchen werden 150 µl DMSO und 150 µl FKS vorgelegt, anschließend werden etwa 1,5 bis 2 Mio. Zellen hinzugefügt. DMSO wird zugegeben um Kristallbildung zu vermeiden. Die Suspension wird zuerst 24 h bei -20 ℃ und danach bei -80 ℃ gelagert. Eine Lagerung von mehr als sechs Monaten erfolgt in flüssigem Stickstoff bei -196℃.

7.1.3.6. Auftauen der Zellen

Die gefrorene Zellsuspension wird aufgetaut, bis sich die Zellen von der Wand des 2 ml Kryoröhrchens ablösen. Anschließend wird die Zellsuspension in ein 15 ml PP Probenröhrchen mit 10 ml Nährmedium gegeben. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 1300 rpm und RT wird das zurückbleibende Zellpellet in 1 ml Nährmedium resuspendiert und anschließend in eine 25 cm^2-Kulturflasche überführt. Nach Zugabe von ca. 5 ml Nährmedium wird die Flasche im Brutschrank kultiviert.

7.1.3.7. Mykoplasmentest

Mykoplasmen sind die kleinsten, sich selbst vermehrenden Prokaryoten. Sie besitzen unterschiedliche Formen und eine Größe zwischen 0,22 und 2 µm. Sie können die üblichen Membranfilter, die eine Porengröße von 0,22 µm haben, passieren. Die meisten Mykoplasmen verwerten als Energiequelle Arginin, so dass befallene Zellen an Argininmangel leiden. Damit eine Proliferationshemmung aufgrund Argininmangels ausgeschlossen werden konnte, sind die Zellen regelmäßig auf Mykoplasmen getestet worden.

Etwa 0,5 Millionen Zellen werden auf einen Objektträger in einer Petrischale ausgestreut und die Petrischale wird mit 10 ml Nährmedium befüllt. Nach 24h wird das Medium entfernt. Der Objektträger wird mit -20°C Methanol gespült und bei –20°C in Methanol mindestens 15 min fixiert. Der Objektträger wird anschließend kurz getrocknet. Nach Zugabe von 50 µl DAPI(4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid)–Lösung werden die fixierten Zellen mit einem Deckglas bedeckt und der Objektträger am Fluoreszenzmikroskop (Anregung: 365 nm, Emission: 420 nm) ausgewertet. Die DNA-haltigen Zellbestandteile erscheinen blau und das Cytoplasma rot. Mykoplasmen sind als kleine, gleichmäßig geformte, hell leuchtende Punkte sichtbar. Kerntrümmer von Zellen sowie Bakterien und Pilze sind größer und anders geformt und daher nicht mit Mykoplasmen zu verwechseln. Diese Nachweismethode beruht auf der Anfärbung der DNA durch die Kopplung des Fluorochroms DAPI an die DNA [Lindl, 2002].

7.1.4. Isolierung und Kultivierung parenchymaler Leberzellen

7.1.4.1. *In-situ* Perfusion einer Rattenleber und Präparation von Hepatozyten

Die Isolierung von Hepatozyten aus der Rattenleber erfolgt modifiziert nach Seglen [1976] mit Hilfe einer zweistufigen *in-situ* Perfusion.

Alle verwendeten Geräte und Lösungen werden zunächst zur Gewährleistung steriler Bedingungen autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Die Perfusionslösungen werden auf 42°C erwärmt, der Waschpuffer wird auf Raumtemperatur gebracht.

Mittels *i. p.* Injektion einer Phentobarbitallösung (300 µl pro 100 g Körpergewicht; 33 mg/ml) wird die Ratte (180-200 g Körpergewicht) narkotisiert und auf dem Operationstisch mit Gewebebändern fixiert.

Nach Öffnung des Abdomens und Freilegung der Leber erfolgt zum Verhindern einer vorzeitigen Blutgerinnung eine Injektion des Antikoagulans Heparin (100 µl pro 100 g Körpergewicht) in die untere Hohlvene (Vena cava inferior). Um die Pfortader (Vena porta hepatica) und den unteren Teil der Hohlvene wird daraufhin zur späteren Fixierung der Braunüle eine lockere Ligatur gelegt. Unmittelbar nach Einführen und Fixierung der

Braunüle in die Pfortader ermöglicht die Durchtrennung der unteren Hohlvene das Abfließen von Blut und Perfusat aus der Leber.
Im ersten Perfusionsschritt wird die Leber für ca. 7-10 min mit EGTA-haltigem Perfusionsmedium bei einer Durchflussrate von 40 ml/min durchspült, um durch den Entzug von Ca^{2+} die Desmosomen zu lösen.
Während diesem Perfusionsschritt wird eine zweite Braunüle in den oberen Teil der Hohlvene eingeführt und fixiert. Diese wird nach dem Verschließen der unteren Hohlvene mit einem Abflussschlauch versehen.
Die anschließende 5-10-minütige rezirkulierende Perfusion mit Ca^{2+}- und Collagen-haltigem (100 collagenase digestion units/ml) Perfusionsmedium bei einer Durchflussrate von 40 ml/min bewirkt den Verdau der extrazellulären Matrix. Ein erfolgreicher Verdau des Gewebes zeichnet sich durch eine netzartige Oberflächenstruktur des Organs aus. Die Leber wird daraufhin vorsichtig herauspräpariert. Nach Öffnen der Leberkapsel über einem sterilen Seidentuch werden die Zellen durch Zugabe von 200 ml Waschpuffer aus dem Organ herausgeschwemmt und durch das Tuch filtriert.
Anschließend wird die entstandene Zellsuspension auf vier 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und 2 min bei 350 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Hierdurch werden tote Zellen und Zelltrümmer abgetrennt. Das entstandene Zellpellet wird im Anschluss in jeweils 20-25 ml Waschpuffer resuspendiert und erneut 2 min bei 350 rpm zentrifugiert. Die verbleibenden Pellets werden schließlich in jeweils 7-8 ml Waschpuffer aufgenommen und vereinigt.

7.1.4.2. Bestimmung von Zellzahl und Viabilität

Die Bestimmung der Viabilität erfolgt mittels Trypanblau-Ausschlußtest (vgl. **7.1.3.4**).
Um eine erfolgreiche Versuchsdurchführung zu gewährleisten, werden nur Zellpräparationen mit einer Viabilität von mindestens 85% eingesetzt.

7.1.4.3. Herstellung der Kollagenlösung

Zur Herstellung einer Kollagenlösung werden ca. 20 Rattenschwänze mit Ethanol desinfiziert, unter der Sterilbank gehäutet und die Kollagenfasern von der Schwanzspitze her mit einer Pinzette herausgezogen. Nach Trocknung der Fasern unter UV-Licht über Nacht werden die Fasern in kleine Stücke geschnitten, durch Reiben aufgespaltet und erneut in einer Petrischale unter UV-Licht über Nacht gelagert. In einer verschlossenen Petrischale sind die Fasern bei –20℃ über längere Zeit lagerfähig.
Zur Herstellung einer Kollagen-Stocklösung werden ca. 2 g der Fasern unter sterilen Bedingungen in einen Erlenmeyerkolben überführt und unter Rühren für eine Stunde mit

H_2O bidest. gewaschen. Das Lösen der Fasern erfolgt unter Rühren in 500 ml 0,1 %-iger Essigsäure für 24 h. Nach der Zentrifugation der Lösung bei 3700 rpm für 3 h zur Abtrennung der nicht gelösten Fasern wird der Proteingehalt der Stocklösung bestimmt.
Zur Verwendung in der Kultivierung von Hepatozyten werden zwei Gebrauchslösungen mit den Konzentrationen 0,5 mg/ml und 1,65 mg/ml angesetzt und zusammen mit der Stocklösung bei 4°C gelagert.

7.1.4.4. Kollagenierung von Gewebekulturschalen

Der Gebrauch der Gewebekulturschalen zur Kultivierung von Rattenhepatozyten bedarf einer vorherigen Beschichtung mit Kollagen. Hierzu wird die Schale mit Kollagenlösung (0,5 mg/ml) vollständig bedeckt und die Lösung in die nächste Schale überführt. Die Kulturschalen werden über Nacht unter UV- Licht in der Sterilbank getrocknet.

7.1.4.4.1. Kultivierung von Hepatozyten auf kollagenierten Gewebekulturschalen

Zur Aussaat der Zellen wird serumhaltiges Williams-E-Medium verwendet (5ml vorgelegt in beschichtete Petrischale). Pro kollagenierte Petrischale werden 500.000 Hepatozyten ausgestreut. Die Anheftungszeit beträgt maximal zwei Stunden im Brutschrank bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO_2.

7.2. Einzelzell-Gelelektrophorese (SCGE; Comet Assay)

Mit der Einzelzell-Gelelektrophorese lassen sich einfach, schnell und sensitiv DNA-Schäden wie z.B. DNA-Einzelstrang, -Doppelstrangbrüche und AP-Stellen direkt auf Einzelzellniveau untersuchen.
Neben verschiedenen adhärenten und Suspensions-Zelllinien ermöglicht der Assay auch die Möglichkeit, DNA-Modifikationen an primären Zellen zu visualisieren. Im Folgenden soll nun die Verwendung von Vollblut im Comet Assay neben den anderen verwendeten Zellsystemen genau beschrieben werden (s. **7.2.2**).
Die hier verwendete Methode orientiert sich im Wesentlichen an Singh et al. (1988), wurde allerdings durch zusätzliche Behandlung der inkubierten Zellen mit dem DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) modifiziert (s. **7.2.3**).
Neben der alkalischen Version (pH>13) gibt es auch Protokollvariationen, bei denen die Zellen nach der Lyse in einem Puffer mit einem niedrigeren pH-Wert der Elektrophorese ausgesetzt werden. So werden z.B. bei einem pH von 12,1 nur Einzel- und Doppelstrangbrüche nachgewiesen. Da in der vorliegenden Arbeit verschiedene Protokolle zur

Anwendung kamen, wird im Folgenden die alkalische Version des Comet Assays genau beschrieben. Das Protokoll bei pH 12,1 wird nur kurz unter Angabe der Modifikationen erläutert (s. **7.2.4**).

7.2.1. Vorbereitung der Objektträger

Auf Objektträger werden zunächst 40 µl NMA (normal melting agarose) aufgetragen und mit einem Flexistrip gleichmäßig verteilt. Nach dem Erstarren der Agarose werden zweimal je 65 µl NMA auf die Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Nach erneutem Erstarren der Gele können die Objektträger bei 4°C mehrere Tage gelagert werden.

7.2.2. Inkubation

7.2.2.1. Vollblut

In 10 ml PP Probenröhrchen wird Vollblut vorgelegt und die Testsubstanzen (gelöst in DMSO) mit einem Lösungsmittelanteil von 1% zudotiert. Die Inkubation erfolgt für 1, 2 und 4 h bei 37°C unter leichtem Schütteln im Wasser bad. Im Anschluss werden jeweils 6 µl inkubiertes Vollblut (≈ 60.000 Lymphozyten) in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Das Vollblut wird mit 65 µl LMA (low melting agarose) gemischt und auf die vorbereiteten Objektträger aufgetragen. Die Gele werden mit Deckgläsern abgedeckt. Nach Erstarren der Agarose werden die Deckgläser vorsichtig entfernt und die Objektträger in eine mit kaltem Lysepuffer gefüllte Lysekammer überführt. Die Lyse der Zellen erfolgt für mindestens 1 h bei 4°C.

7.2.2.2. Lymphozyten

Nach Isolierung der Lymphozyten mittels Histopaque® und anschließender Bestimmung der Zellzahl werden jeweils 1Mio. Lymphozyten in 1 ml serumfreies RPMI-1640 Zellkulturmedium überführt. Nach Zugabe der Testsubstanzen (gelöst in DMSO; Lösungsmittelanteil 1%) erfolgt die Inkubation im Wasserbad bei 37°C unter leichtem Schütteln. Nach Beendigung der Inkubation und Bestimmung der Viabilität mittels Trypanblau-Ausschlußtest werden 60 µl Suspension (≈ 60.000 Lymphozyten) in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 2000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das verbleibende Pellet wird wie unter **7.2.2.1** beschrieben in LMA resuspendiert und auf vorbereitete Objektträger aufgebracht. Im Anschluss erfolgt eine alkalische Lyse für mindestens 1h bei 4°C.

7.2.2.3. V79 Zellen

In 35mm-Petrischalen werden zunächst 1 x 10^6 Zellen in 5 ml FKS-haltigem DMEM Zellkulturmedium (N-Medium) ausgesät und 24 h anwachsen gelassen. Die anschließende Inkubation findet in serumfreien Medium (S-Medium) statt. Die entsprechenden Testsubstanzen werden dazu in DMSO gelöst und in einem Lösungsmittelanteil von 0,1% dem S-Medium zugegeben. Die Inkubation erfolgt bei 37℃, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank dem jeweiligen Versuchsansatz entsprechend für 15 min bis 24 h. Nach Beendigung der Inkubationszeit wird der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen mittels 500 µl Trypsin vom Boden der Petrischale gelöst. Der Verdau wird durch Zugabe von 500 µl N-Medium gestoppt und die Zellsuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Petrischale wird anschließend mit 500 µl S-Medium nachgespült, welches ebenfalls in das Eppendorf- Reaktionsgefäß überführt wird. Nach Bestimmung von Zellzahl und Viabilität mittels Trypanblau-Ausschlußtest werden ≈ 60.000 Zellen in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und bei 2000 rpm für 10 min bei 4℃ zentrifugiert. Das verbleibende Pellet wird wie unter **7.2.2.1** beschrieben in LMA resuspendiert und auf vorbereitete Objektträger aufgebracht. Im Anschluss erfolgt eine alkalische Lyse für mindestens 1 h bei 4℃.

7.2.2.4. Primäre Rattenhepatozyten

Nach Beendigung der 2-stündigen Anheftungszeit wird das N-Medium entfernt und die Kulturschalen mit HPBS gewaschen, um tote Zellen und Zelltrümmer vom Zellmonolayer zu entfernen.

Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit den Testsubstanzen (gelöst und verdünnt in serumfreiem Medium bzw. DMSO) für 4 bzw. 24 h.

Die Inkubation wird durch Absaugen des Mediums gestoppt. Die Zellen werden daraufhin mit 2 ml HPBS gewaschen und mit 500 µl Trypsin versetzt. Das Trypsin wird nach 1 min durch Zugabe von 500 µl N-Medium inaktiviert. Im Anschluss werden die Zellen aus der Petrischale vorsichtig abgespült und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Durch Nachspülen der Petrischale mit 500 µl serumfreiem Medium werden restliche Zellen entfernt und das Medium ebenfalls in das Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert. Nach vorsichtigem Vereinzeln der Zellen werden Zellzahl und Viabilität der Zellen mittels Trypanblau-Ausschlußtest bestimmt. Ausgehend davon werden jeweils 60.000 Zellen in vier Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 1000 rpm und 4℃ zentrifugiert.

7.2.2.5. Reduktion der DNA-Schäden in V79-Zellen

Zum Nachweis der Reduktion von DNA-Schäden in V79 Zellen wird zunächst entsprechend der unter **7.2.2.3** beschriebenen Inkubation verfahren. Nach Beendigung der Inkubationszeit (4 und 24 h) wird der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend die Zellen mit 5 ml N-Medium versetzt und im Brutschrank nachinkubiert. In den Zeitintervallen 0, 2, 4, 6 und 8 h nach Zugabe des N-Mediums wird die Inkubation durch Trypsin-EDTA-Zugabe abgestoppt. Die weitere Vorgehensweise entspricht der in **7.2.2.3** beschriebenen.

7.2.3. Inkubation mit FPG

Die Objektträger werden zunächst dreimal mit Enzympuffer für je 5 min gewaschen. Im Anschluss erfolgt die Behandlung mit dem Reparaturenzym FPG (Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase). Hierzu werden jeweils 50 µl FPG-Gebrauchslösung bzw. Enzympuffer als Kontrolle auf die Gele pipettiert, mit Deckgläsern abgedeckt und für 30 min bei 37℃ inkubiert.

7.2.4. Elektrophorese

7.2.4.1. pH > 13

Nach Entfernen der Deckgläser werden die Objektträger in eine horizontale Elektrophoresekammer überführt. Die DNA der Zellen wird in eiskaltem Elektrophoresepuffer (pH > 13) 20 min entwunden. Anschließend erfolgt eine 20-minütige Elektrophorese bei 25 V, 300 mA und 4℃.

7.2.4.2. pH 12,1

Unter Anlehnung an Miyamae et al. [1997] erfolgt hier die Verwendung eines Elektrophoresepuffers mit einem pH-Wert von 12,1, der durch Zugabe von 37 %iger HCl zum unter **7.2.4.1** verwendeten Elektrophoresepuffer erhalten wird.

7.2.5. Neutralisation, Anfärbung der DNA und mikroskopische Auswertung

Nach der Elektrophorese werden die Zellen durch dreimaliges Waschen mit Neutralisationspuffer neutralisiert. Im Anschluss wird die DNA der Zellen wird mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid angefärbt. Die Visualisierung der Zellen erfolgt mit einem Zeiss Axioskop II; Quantifizierung und mikroskopische Auswertung mit Hilfe des Computerpro-

gramms „Comet II“ (Perspective Instruments). Pro Gel werden 50 zufällig ausgewählte Zellen gemessen. Die dabei ermittelte Tail Intensity (TI) wird zur graphischen Auswertung mit dem Programm Origin 6.0 verwendet.

7.3. *hPRT-Genmutations-Assay*

7.3.1. Durchführung des hPRT-Genmutations-Assay

Ziel des *hPRT*-Tests ist es, Vorwärtsmutationen in Säugerzellen quantitativ zu erfassen. Die Etablierung erfolgt anhand der Empfehlungen von Bradley et al. [1981] und Glatt [1993] mit der V79 Zelllinie. Anhand des folgenden Protokolls wurden die Untersuchungen nach 24-stündiger Inkubation durchgeführt.

0. Tag: Aussaat der Zellen

Für jede Testsubstanz werden pro Konzentration je 1 Mio. V79-Zellen in 75 cm^2 Kulturflaschen ausgesät. Sie werden 24 h im Brutschrank kultiviert.

1. Tag: Inkubationsstart

Für die Stammlösung werden die jeweils entsprechenden Konzentrationen der Testsubstanzen in DMSO angesetzt. Für die Inkubation wird S-Medium mit den Testsubstanzen versetzt, so dass eine maximale DMSO-Konzentration von 0,3% im Inkubationsmedium vorliegt.

Nach dem Entfernen des Nährmediums und zweimaligem Waschen mit PBS werden die Kulturflaschen mit dem Inkubationsmedium befüllt und für weitere 24 h im Brutschrank belassen.

2. Tag: Inkubationsabbruch

Nach 24 h wird die Inkubation durch Mediumwechsel beendet und die Zellen in N-Medium weiterkultiviert.

3. und 5. Tag: Passage / Zellzahl (Expressionszeit)

Die Zellen werden passagiert. Danach werden Zellzahl und Viabilität ermittelt. Pro Ansatz werden 1 Mio. Zellen in neue 75 cm^2 Kulturflaschen ausgestreut.

7. Tag: Passage / Selektionsphase / Cloning-Efficiency (CE)

Die Zellen werden zunächst wie oben beschrieben passagiert und danach ihre Viabilität bestimmt.

Anschließend werden je drei neue 75 cm^2 Kulturflaschen mit je 1 Mio. Zellen angelegt. Die Zellen werden in 15 ml Selektionsmedium kultiviert, das 6-Thioguanin (TG-Medium) und einen verminderten FKS-Gehalt enthält. Zur Erfassung cytotoxischer Effekte der Testsubstanzen wird begleitend die „Cloning Efficiency“ (CE) bestimmt. Hierfür werden je zwei 90 mm Petrischalen mit 240 Zellen ausgesät und in 10 ml N-Medium kultiviert.

16. Tag: Färben der Kolonien

Die *hPRT*-defizienten Mutanten haben Kolonien gebildet, die ohne Hilfsmittel erkennbar sind. Für eine erleichterte Auswertung werden diese mit ethanolischer Methylenblaulösung angefärbt. Hierzu wird der Test abgestoppt, indem das Medium abgegossen und die Zellen zweimal mit Kochsalzlösung gespült werden. Zum Fixieren werden 5 ml Ethanol (-20 °C) zugegeben und die Zellen mind. 15 min bei -20 °C gehalten. Im Anschluss wird das Ethanol verworfen und die Zellen für mindestens 30 min bei -20 °C mit ethanolischer Methylenblaulösung gefärbt. Dann wird der ungebundene Farbstoff abgegossen und die Kolonien vorsichtig mit Leitungswasser gewaschen. Nach dem Trocknen werden die gebildeten Kolonien ausgezählt.

7.3.2. Anhaltspunkte zur Etablierung des Testablaufs

Während des Tests darf die Zellzahl durch cytotoxische Effekte nicht unter 1 Mio. Zellen fallen. Es können daher die Substanzen nicht in cytotoxischen Konzentrationsbereichen auf Mutagenität getestet werden, da ansonsten eine Beeinträchtigung der Mutationsfrequenz zu erwarten ist. Glatt [1993] führte den Test mit Zelldichten von bis zu $4x10^5$ Zellen/cm^2 durch.

Zur Ausdünnung des *hPRT*-Enzyms passagiert man die Zellen nach der Inkubation. Die vorgeschlagene Zeitspanne hierfür beträgt mindestens 5 Tage [Bradley et al., 1981, Glatt, 1993].

Während der Selektionsphase machen Gap junctions die Kommunikation zwischen *hPRT*-profizienten und -defizienten Zellen möglich. Dadurch kann ein Transfer von Nucleotid-Analoga auftreten, der zum Absterben *hPRT*-defizienter Zellen führt. Um einen solchen Nebeneffekt zu minimieren, wird der FKS-Anteil im Selektionsmedium um die Hälfte reduziert [Glatt, 1993].

Für die mitgeführte „Cloning-Efficiency“ (CE) werden üblicherweise 240 Zellen eingesetzt [Glaab et al., 2000].

7.3.3. Auswertung

Für die Auswertung des Tests werden alle erkennbaren Kolonien in den Kulturflaschen und Petrischalen gezählt. Für jede Konzentration werden die ausgezählten Koloniezahlen in den Kulturflaschen und den Petrischalen jeweils gemittelt.

Die Mutationsfrequenz (MF) für eine Testsubstanzkonzentration gibt die Anzahl der *hPRT*-defizienten Mutanten pro 1 Mio. Zellen an. Sie berechnet sich mit folgender Gleichung:

$$MF = MZ \cdot F$$

mit *MZ*: ermittelte Kolonienzahl (bzw. Mutantenzahl) einer Testsubstanzkonzentration

F: Korrekturfaktor

Der Korrekturfaktor (F) erhält man aus dem Quotienten:

$$F = \frac{240}{MCE}$$

mit *MCE*: Mittelwert der Kolonienzahlen der CE

240: Anzahl der erforderlichen Zellen zur CE-Ermittlung.

Die erhaltenen Mutationsfrequenzen (MF) sind somit anhand der zugehörigen CE auf 240 Zellen bezogen und untereinander vergleichbar. Sie werden im Bezug auf die zugehörige Konzentration angegeben.

Die Spontanmutationsfrequenz MF_0 ist die aus der Negativkontrolle (hier DMSO) ermittelte Mutationsfrequenz. Eine Verbindung gilt im Sinne des *hPRT*-Tests bei gegebener Konzentration als mutagen, wenn die Mutationsfrequenz dreimal höher ist als die Spontanmutationsfrequenz MF_0 [Bradley et al., 1981].

Für einen Vergleich des mutagenen Potentials der unterschiedlichen Substanzen wird der ermittelte D_{3C}-Wert angegeben. Dieser wird folgendermaßen berechnet:

$$D_{3C} = \frac{3CD}{Y}$$

mit *C*: spontane Mutationsfrequenz MF_0

Y: beobachtete Mutationsfrequenz (*MF*)

D: Konzentration [µM]

7.4. Reagenzien, Materialien und Geräte

7.4.1. Reagenzien

- α-Acetoxy-NDELA	zur Verfügung gestellt durch R. N. Loeppky, University of Missouri, Columbia
- Acrolein	[Fluka]
- Acrylamid	(für die Elektrophorese) [Merck]
- Antifade-Puffer	100 ml p–Phenylendiamidindihydro-chlorid und 10 ml PBS, 0,5 M wässrige Natrium-hydrogencarbonat–Lösung mit Natrium-hydroxid auf pH 9 einstellen; Gemisch auf pH 8 einstellen, 90 ml Glycerin hinzugeben, bei –20℃ dunkel lagern
- Bleomycin	[Serva]
- Borsäure	[Fluka]
- (±)-anti-BPDE	zur Verfügung gestellt durch P. Steinberg, Universität Potsdam
- Calciumchlorid	p.a. [Merck]
- Dimethylsulfoxifd	für UV-Spektroskopie (41641) [Fluka]
- Dimethylsulfoxifd	für Lysepuffer [Merck]
- Elektrophoresepuffer (pH >13)	30 ml 10 mM NaOH, 2,5 ml 200 mM EDTA-Lösung auf 1l H_2O_{bidest}.
- Elektrophoresepuffer (pH 12,1)	Elektrophoresepuffer (pH >13) mit 37%iger HCl eingestellt auf pH 12,1
- Elektrophoresepuffer (pH 8,3)	90 mM Tris, 2 mm EDTA, 90 mM Borsäure
- Enzympuffer–Stammlösung	9,5 g HEPES, 7,46 g KCl, 0,146 g EDTA, 0,2 g BSA auf 1 H_2O_{bidest}, pH 8 mit KOH einstellen, eingefroren lagern, vor Gebrauch 1:10 verdünnen
- EDTA	p.a. [Serva]
- EDTA-Lösung	11,7 g EDTA (200 mM) in H_2O_{bidest}
- Ethanol	Rotipuran® p.a. ≥ 99,8% [Roth]
- Ethidiumbromid	[Sigma]
- Ethidiumbromid-Stammlösung	100 µl Ethidiumbromid + 4900µl H_2O_{bidest}
- Ethidiumbromid–Gebrauchslösung	Ethidiumbromid–Stammlösung

	(1:10 verdünnen)
- FKS	Fötales Kälberserum [Gibco™]
- FPG–Enzym	100 µl Enzympuffer, 100 µM Glycerin auf 1 ml mit H_2O_{bidest} auffüllen; davon 990 µl + 10 µl Enzym (1:100 verdünnt)
	Lagerung bei -80℃
- FPG-Enzym–Gebrauchslösung	25 µl Enzym + 725 µl Enzympuffer
- Glutathion (GSH)	[Sigma-Aldrich]
- Glycerin	p.a. [Merck]
- Glycidamid	Synthese nach Payne et al., 1961
- HENU	
- Heparinlösung	Heparin 1000 U/ml NaCl 0,9 %
- HEPES	Pufferon ≥ 99.5 % f. d. Gewebezucht [Roth]
- 2-Hexenal	[Sigma-Aldrich]
- HPBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, 0,9 mM $CaCl_2$, 0,5 mM $MgCl_2$, 10 mM Hepes
- Histopaque®	[Sigma-Aldrich]
- Kaliumchlorid	p.a. [Merck]
- Kaliumhydrogenphosphat	p.a. [Merck]
- Kaliumhydroxid	p.a. [Merck]
- Kochsalzlösung	wässrig, physiologisch (0,9 % auf Masse bezogen)
- Natriumchlorid	p.a. [Merck]
- Natriumhydrogenphosphat	p.a. [Merck]
- N–Laurylsarcosin–Natriumsalz	[Sigma-Aldrich]
- LMA (low melting agarose)	[Bio Rad Laboratories]
- LMA-Lösung	700 mg LMA auf 100 ml PBS für Agarose
- Lysepuffer	89 ml Lysepufferstammlösung, 10 ml DMSO, 1 ml Triton X–100
- Lysepufferstammlösung	146,1 g NaCl; 37,2 g Titriplex III; 1,2 g Tris in H_2O_{bidest} lösen; pH 10 einstellen mit Na-OH; Zugabe von 10 g N–Laurylsarcosin-Natriumsalz und auf 1l auffüllen mit H_2O_{bidest}
- Magnesiumchlorid	p.a. [Merck]

- Medien (Zellkultur)	• Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4500 mg/l D-Glucose, mit 584 mg/l L-Glutamin, mit 15 mg/l Phenolrot [Gibco™] • RPMI-1640 [Gibco™] • Williams E Medium [Gibco™]
- Methanol	p.a. [Merck]
- Methylenblau	Reag. Ph Eur (C.I. 52015) [Merck]
- Methylenblaulösung	ethanolisch, 0,5% (auf Masse bezogen)
- 2-Methyl-3-nitrosooxazolidin-5-on	zur Verfügung gestellt durch R. N. Loeppky, University of Missouri, Columbia
- 4-Methyl-3-nitrosooxazolidin-5-on	zur Verfügung gestellt durch R. N. Loeppky, University of Missouri, Columbia
- MNNG (N-Methyl-N'-Nitro-N-nitrosoguanidin)	purum ≥ 97%, moistened with water (≈ 50%) [Fluka]
- MNU	synthetisiert nach Organikum
- Immersionsöl	für Mikroskopie [Merck]
- Natriumchlorid	p.a. [Merck]
- Natriumhydrogencarbonat	p.a. (31437) [Riedel-de Haën]
- Natriumhydrogenphosphat	p.a. [Merck]
- Natriumhydroxid	p.a. (Plätzchen) [Merck]
- Natriumpyruvat	MEM 100MM [Gibco™]
- Neutralisationspuffer	48,5 g Tris mit HCl auf pH 7,5 einstellen; auf 1 l H_2O_{bidest} auffüllen
- 3-Nitrosooxazolidin-2-on	zur Verfügung gestellt durch R. N. Loeppky, University of Missouri, Columbia
- 3-Nitrosooxazolidin-5-on	zur Verfügung gestellt durch R. N. Loeppky, University of Missouri, Columbia
- NMA (normal melting agarose)	[Bio Rad Laboratories]
- NMA–Lösung	500 mg NMA auf 100 ml PBS für Agarose
- Nährmedium (N-Medium)	• 0,5 l DMEM, 50 ml FKS, 5 ml Natriumpyruvat, 5 ml Penicillin - Streptomycin • 0,5 l RPMI-1640, 50 ml FKS, 5 ml Penicillin/Streptomycin • 0,5 l Williams E Medium, 50ml FKS, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml L-Glutamin

- PBS–Stammlösung	5 g NaCl; 0,25 g KCl; 0,72 g Na_2HPO_4; 0,125 g KH_2PO_4 auf 1 l mit H_2O_{bidest} auffüllen; pH-Wert 7.4
- PBS–Lösung	50 ml Stammlösung auf 500 ml auffüllen mit H_2O_{bidest}
- Penicillin–Streptomycin	[Gibco ™]
- Pentobarbitallösung	Pentobarbital 33 mg/ml $H_2O_{bidest.}$
- p–Phenylendiamidindihydrochlorid	
- Propidiumiodid–Lösung	1 mg Propidiumiodid in 1 ml H_2O_{bidest}
- Salzsäure	37 % [J. T. Backer]
- FKS–freies Medium (S-Medium)	▪ 0,5 l DMEM, 5 ml Natriumpyruvat, 5 ml Penicillin–Streptomycin Streptomycin • 0,5 l RPMI-1640, 5 ml Penicillin/Streptomycin • 0,5 l Williams E Medium, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml L-Glutamin
- 6–Thioguanin–haltiges Medium (TG-Medium)	0,5 l DMEM, 25 ml FKS, 5 ml Natriumpyruvat, 5 ml Penicillin-Streptomycin, 0,5 ml 6 – Thioguanin-Stammlösung (54 µM)
- 6–Thioguanin	2–Amino–6–mercaptopurin, Approx. 98% (A-4882) [Sigma]
- 6–Thioguanin–Stammlösung	9 mg 6-Thioguanin pro 1 ml DMSO (53,83 mM)
- Titriplex III	[Merck]
- Triton X–100	[Aldrich]
- Tris	99,9% [Appli Chem; Roth]
- Trypanblau	[Sigma]
- Trypanblau-Lösung	0,5 g Trypanblau; 0,9 g NaCl; mit H_2O_{bidest} auf 100 ml auffüllen; vor Gebrauch 1:1 verdünnen
- Trypsin	1:250, 2,4 DMC-U/mg (aus Rinderpankreas) [Serva]
- Trypsinlösung	0,125 g Trypsin, 0,0625 g EDTA mit PBS-Lösung auf 250 ml auffüllen; pH–Wert 7,4

7.4.2. Geräte

- Auswertesystem (Comet Assay)	Comet Assay II (Perspective Instruments, Suffolk, England)
- Autoklav	Varioklav® [H+P]
- Brutschrank	Cytoperm 8088 [Heraeus]
- Biofreezer	Sanjo
- Elektrophoresekammer	Bio-Rad Sub Cell GT
- Elektrophoresespannungsgerät	Bio-Rad Power Pac 300
- Färbekammer für OT	[Roth], verwendet als Lysekammer
- Fluoreszenzmikroskop	[Zeiss] Axioskop 20; Filter Set 15 (Anregung BP 546/12; Emission LP 590)
- Kamera	COHU High Performance CCD Camera
- Mikroskop	IM; Axioskop II [Zeiss]
- Neubauer–Zählkammer	Tiefe 0,1 mm; 0,0025 mm^2 [Marienfeld]
- Pipetten	Pipetman (verschiedene Volumina) [Gilson]
- Pipettierhilfe	pipetus®-akku [Hirschmann Laborgeräte]
- pH-Meter	WTW 522, Elektrode Schott L737 A
- Sterilbank	LaminAir® HLB 2472 BS [Heraeus]
-	
- Ultraschallbad	Sonorex RK 100 [Bandelin]
- Vortexer	[Scientific Industries]
- Waage	Sartorius CP224S
- Wasserbad	[Labortechnik Köttermann; Julabo]
- Zählmaschine	TRS 1250 PD [Schüt]
- Zentrifuge	Megafuge 1.0 R [Heraeus]

7.4.3. Verbrauchsmaterialien

- Deckgläser	24x50 mm [Menzel-Gläser] 24x24 mm [Menzel]
- Flexistrip	[Roth]
- PP–Reaktionsgefäße	1,5 ml und 2,0 ml [Greiner Bio–One GmbH]
- PP–Probenröhrchen	Steril; 10 ml, 15 ml und 50 ml, CELLSTAR® [Greiner Bio–One GmbH]

-	Kanülen	Sterican; 0,9 mm Durchmesser, 70mm Länge [Braun]
-	Kryoröhrchen	Steril [Greiner, Sarstedt]
-	Kulturflaschen	Zellkulturflasche mit Gasaustausch-schraubverschluss, Bodenfläche: 25 cm^2, 75 cm^2 und 175 cm^2, CELLSTAR® [Greiner Bio–One GmbH]
-	Mikrotiterplatten (96-well)	[Greiner]
-	Monovetten	Sarstedt Monovette® EDTA K2 Gel 9 ml
-	Multifly	Sarstedt Multifly® Set 21 G, Schlauch 20 cm
-	Objektträger	76x26 mm, ISO-Norm 8037, Super Frost [Menzel]
-	Pasteurpipetten	für Einmalgebrauch, Länge ca. 150 mm [Brand]
-	Petrischalen	94/16 mm Qualität TC, steril, CELLSTAR® [Greiner Bio–One GmbH]
-	Pipettenspitzen	verschiedene Größen [Greiner Bio-One GmbH] Combitips (verschiedene Volumina) [Eppendorf]
-	Sterilfilter 0,2 µM	[Sartorius]

8. Literatur

Abramsson-Zetterberg L., The dose-response relationship at very low doses of acrylamide is linear in the flow cytometer-based mouse micronucleus assay. *Mutat. Res.* 2003, *535 (2)*, 215-22.

Adler I. D., Ingwersen I., Kliesch U., el Tarras A., Clastogenic effects of acrylamide in mouse bone marrow cells. *Mutat. Res.* 1988, *206 (3)*, 379-85.

Adler I. D., Clastogenic Effects of Acrylamide in Different Germ-cell Stages of Male Mice. *Banbury Report* 1990, *34*, 115-31.

Aherne S. A., O'Brien N. M., Lack of effect of the flavonoids, myricetin, quercetin, and rutin, on repair of H2O2-induced DNA single-strand breaks in Caco-2, Hep G2, and V79 cells. *Nutr. Cancer* 2000, *38 (1)*, 106-15.

Airoldi L., Bonfanti M., Benfenati E., Tavecchia P., Fanelli R., Identification of an acidic metabolite of N-nitrosodiethanolamine isolated from rat urine. *Biomed. Mass. Spectrom.* 1983, *10 (5)*, 334-7.

Anderson D., Fisher P., Jenkinson P. C., Phillips B. J., Studies of the 'adaptive' repair response in human lymphocytes and V79 cells after treatment with MNNG and MNU. *Hum. Toxicol.* 1988, *7 (4)*, 337-41.

Arand M., Oesch F., in *Lehrbuch der Toxikologie*, 2. ed. (Eds.: Marquardt H., Schäfer S.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2004, 89-116.

Ashby J., Druckrey's definition of genotoxic, *Mut. Res.* 1995, *329*, 225.

Au W., Sokova O. I., Kopnin B., Arrighi F. E., Cytogenetic toxicity of cyclophosphamide and its metabolites in vitro. *Cytogenet. Cell genet.* 1980, *26*, 108-16.

Backer, L. C., Dearfield K. L., Erexsen G. L., Campbell J. A., Westbrook.Collins B., Allen J. W., The effects of acrylamide on mouse germ-line and somatic cell chromosomes. *Environ. Mol. Mutagen.* 1989, *13 (3)*, 218-26.

Backman J., Sjoholm R., Kronberg L., Characterization of the adducts formed in the reactions of glycidamide with thymidine and cytidine. *Chem. Res. Toxicol.* 2004, *17 (12)*, 1652-8.

Bailly V., Verly W. G., O'Connor T., Laval J. Mechanism of DNA strand nicking at apurinic/apyrimidinic sites by Escherichia coli [formamidopyrimidine]DNA glycosylase. *Biochem. J.* 1989, *262 (2)*, 581-9.

Barber D. S., Hunt J. R., Ehrich M. F., Lehning E. J., LoPachin R. M., Metabolism, toxicokinetics and hemoglobin adduct formation in rats following subacute and subchronic acrylamide dosing. *Neurotoxicology* 2001, *22 (3)*, 341-53.

Barlow S., Renwick A.G., Kleiner J., Bridges J.W., Busk L., Dybing E., Edler L., Eisenbrand G., Fink-Gremmels J., Knaap A., Kroes R., Liem D., Müller D.J.G., Page S., Rolland

V., Schlatter J., Tritscher A., Tueting W., Würtzen G., Risk assessment of substances that are both genotoxic and carcinogenic. Report of an International Conference organized by EFSA and WHO with support of ILSI Europe. *Food Chem. Toxicol.* 2006, *44*, 1636–50.

Bartsch H., Nair J., Owen R. W., Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis* 1999, *20*, 2209-18.

Bauer E., Guo Z., Ueng Y. F., Bell L. C., Zeldin D., Guengerich F. P., Oxidation of benzo[a]pyrene by recombinant human Cytochrome P450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* 1995, *8 (1)*, 136-42.

Baum M., Bertow D., Fauth E., Fritzen S., Hermann A., Mertes P., Rudolphi M., Spormann T., Zankl H., Eisenbrand G., Acrylamide and glycidamide: Approach towards risk assessment based on biomarker guided dosimetry of genotoxic/mutagenic effects in human blood. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2005a, *561 (Chemical Safety of Acrylamide in Food)*, 77-88.

Baum M., Fauth E., Fritzen S., Herrmann A., Mertes P., Merz K., Rudolphi M., Zankl H., Eisenbrand G. Acrylamide and glycidamide: genotoxic effects in V79-cells and human blood. *Mutat. Res.* 2005b, *580 (1-2)*, 61-9.

Becalski A., Lau B. P., Lewis D., Seaman S. W., Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. *J. Agric. Food Chem.* 2003, *51 (3)*, 802-8.

Becker K., Gregel C., Fricke C., Komitowski D., Dosch J., Kaina B., DNA repair protein MGMT protects against N-methyl-N-nitrosourea-induced conversion of benign into malignant tumors. *Carcinogenesis* 2003, *24 (3)*, 541-6.

Beiswanger C. M., Mandella R. D., Graessle T. R., Reuhl K. R., Lowndes H. E., Synergistic neurotoxic effects of styrene oxide and acrylamide: glutathione-independent necrosis of cerebellar granule cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1993, *118 (2)*: 233-44.

Bellac C., Dréano Y., Lozach P., Ménez J. F., Berthou F., Cytochrome P450 metabolic dealkylation of nine N-nitrosodialkylamines by human liver microsomes. *Carcinogenesis* 1996, *8 (11)*, 1635-43.

Belyaev I.Y., Eriksson S., Nygren J., Torudd J., Harms-Ringdahl M., Effects of ethidium bromide on DNA loop organisation in human lymphocytes measured by anomalous viscosity time dependence and single cell gel electrophoresis. Biochim. Biophys. Acta 1999, *1428*, 348-56.

Beranek D. T., Weiss C. C., Swenson D. H., A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high-pressure liquid chromatography. *Carcinogenesis* 1980, *1*, 595-605.

Beranek D. T., Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat. Res.* 1990, *231 (1)*, 11-30.

Bergmark E., Calleman C. J., Costa L. G., Formation of hemoglobin adducts of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1991, *111 (2)*, 352-63.

Bergmark E., Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and non-smokers. *Chem. Res. Toxicol.* 1997, *10 (1)*, 78-84.

Berhane K., Mannervik B., Inactivation of the genotoxic aldehydes Acrolein by human glutathione transferase of classes Alpha, mu and Pi. *Mol. Pharmacol.* 1990, *37*, 251-4.

Besaratinia A., Pfeifer G. P., Weak yet distinct mutagenicity of acrylamide in mammalian cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 2003, *95 (12)*, 889-96.

Blasiak J., Gloc E., Wozniak K., Czechowska A., Genotoxicity of acrylamide in human lymphocytes. *Chem. Biol. Interact.* 2004, *149 (2-3)*, 137-49.

Boettcher M. I., Schettgen T., Kutting B., Pischetsrieder M., Angerer J., Mercapturic acids of acrylamide and glycidamide as biomarkers of the internal exposure to acrylamide in the general population. *Mutat. Res.* 2005a, *580 (1-2)*, 167-76.

Boettcher M. I., Angerer J., Determination of the major mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine by LC-ESI-MS/MS. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005b, *824 (1-2)*, 283-94.

Boettcher M. I., Bolt H. M., Drexler H., Angerer J., Excretion of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine after single oral administration of deuterium-labelled acrylamide. *Arch. Toxicol.* 2006, *80*, 55-61.

Boiteux S., Belleney J., Roques B. P., Laval J., Two rotameric forms of open ring 7-methylguanine are present in alkylated polynucleotides. *Nucleic Acids Res*. 1984, *12 (13)*, 5429-39.

Boiteux S., Bichara M., Fuchs R. P., Laval J., Excision of the imidazole ring-opened form of N-2-aminofluorene-C(8)-guanine adduct in poly(dG-dC) by Escherichia coli formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *Carcinogenesis* 1989, *10 (10)*, 1905-9.

Boiteux S., O'Connor R. T., Lederer F., Gouyette A., Laval J., *J. Biol. Chem.* 1990, *265*, 3916 –22.

Boiteux S., Gajewski E., Laval J., Dizdaroglu M., Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry* 1992, *31 (1)*, 106-10.

Bradley M. O., Bhuyan B., Francis M. C., Langenbach R., Peterson A., Huberman E., Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 1981, *87*, 81-142.

Braithwaite E., Wu X., Wang Z., Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms in vitro. *Carcinogenesis* 1998, *19 (7)*, 1239-46.

Braithwaite E., Wu X., Wang Z., Repair of DNA lesions: mechanisms and relative repair efficiencies. *Mutat. Res.* 1999, *424 (1-2)*, 207-19.

Bull R. J., Robinson M., Laurie R. D., Stoner G. D., Greisiger E., Meier J. R., Stober, J., Carcinogenic effects of acrylamide in Sencar and A/J mice. *Cancer Res.* 1984a, *44(1)*, 107-11.

Bull R. J., Robinson M., Stober J. A., Carcinogenic activity of acrylamide in the skin and lung of Swiss-ICR mice. *Cancer Lett.* 1984b, *24(2)*, 209-12.

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Bedeutung der Studie von Mucci et al. für die Risikobewertung von Acrylamid in Lebensmitteln, Stellungnahme des BfR vom 25. Februar 2003.

Calleman C. J., Bergmark E., Costa L. G., Acrylamide is metabolized to glycidamide in the rat: evidence from hemoglobin adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.* 1990, *3 (5)*, 406-12.

Calleman C. J., Wu Y., He F., Tian G., Bergmark E., Zhang S., Deng H., Wang Y., Crofton K. M., Fennell T., et al., Relationships between biomarkers of exposure and neurological effects in a group of workers exposed to acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1994, *126 (2)*, 361-71.

Calleman, C. J., The metabolism and pharmacokinetics of acrylamide: implications for mechanisms of toxicity and human risk estimation. *Drug Metab. Rev.* 1996, *28 (4)*, 527-90.

Canonero R., Martelli A., Marinari U. M., Brambilla G., Mutation induction in Chinese hamster lung V79 cells by five alk-2-enals produced by lipid peroxidation. *Mutat. Res.* 1990, *244*, 153-6.

Chen R. H., Maher V. M., McCormick J. J., Effect of excision repair by diploid human fibroblasts on the kinds and locations of mutations induced by (+/-)-7 beta,8 alpha-dihydroxy-9 alpha,10 alpha-epoxy-7,8,9,10- tetrahydrobenzo[a]pyrene in the coding region of the HPRT gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990, *87 (21)*, 8680-4.

Cheng S. C., Hilton B. D., Roman J. M., Dipple A., DNA adducts from carcinogenic and non-carcinogenic enantiomers of benzo[a]pyrene dihydrodiol epoxide. *Chem. Res. Toxicol.* 1989, *2 (5)*, 334-40.

Chetsanga C. J., Lindahl T., Release of 7-methylguanine residues whose imidazole rings have been opened from damaged DNA by a DNA glycosylase from Escherichia coli. Nucleic Acids Res. 1979, *6 (11)*, 3673-84.

Chetsanga C. J., Bearie B., Makaroff C., Alkaline opening of imidazole ring of 7-methylguanosine. 1. Analysis of the resulting pyrimidine derivatives. *Chem. Biol. Interact.* 1982, *41 (2)*, 217-33.

Christmann M., Tomicic M. T., Roos W. P., Kaina B., Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 2003, *193 (1-2)*, 3-34.

Chuang C.-H., Hu M.-L. Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay *in vivo* and white blood cells for *in vitro* assay**.** *Mutat. Res*. 2004, *564 (1)*, 75-82.

Cook P. R., Brezell I. A., Jost E., Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J. Cell. Sci.* 1976, *22*, 303-24.

Collin S., Osman M., Delcambre S., El Zayat A., Dufour J.P., Investigation of volatile flavour compounds in fresh and ripened Domiati cheeses. *J. Agric. Food Chem.* 1993, *41*, 1659-63.

Collins J. J., Swaen G. M. H., Marsh G. M., Utidjian H. M. D., Caporossi J. C., Lucas L. J., Mortality patterns among workers exposed to acrylamide. *J. Occup. Med.* 1989, *31*, 314-7.

Collins B. W., Howard D. R., Allen J. W., Kinetochore-staining of spermatid micronuclei: studies of mice treated with X-radiation or acrylamide. *Mutat. Res.* 1992, *281 (4)*, 287-94.

Collins A. R., The comet assay for DNA damage and repair- principles, applications, and limitations. *Molec. Biotech*. 2004*, 26*, 249-61.

Conney A. H., Chang R. L., Jerina D. M., Wei S. J., Studies on the metabolism of benzo[a]pyrene and dose-dependent differences in the mutagenic profile of its ultimate carcinogenic metabolite. *Drug Metab. Rev.* 1994, *26 (1-2)*, 125-63.

Conrad J., Müller N., Eisenbrand G., Studies on the stability of trialkyl phosphates and di-(2'deoxythymidine) phosphotriesters in alkaline and neutral solution. A model study for hydrolysis of phosphotriesters in DNA and on the influence of a beta hydroxyethyl ester group. *Chem. Biol. Interact.* 1986, *60 (1)*, 57-65.

Costa L. G., Deng H., Gregotti C., Manzo L., Faustman E. M., Bergmark E., Calleman C. J., Comparative studies on the neuro- and reproductive toxicity of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat. *Neurotoxicology* 1992, *13 (1)*, 219-24.

Costa L. G., Deng H., Calleman C. J., Bergmark E. I., Evaluation of the neurotoxicity of glycidamide, an epoxide metabolite of acrylamide: behavioral, neurochemical and morphological studies. *Toxicology* 1995, *98 (1-3)*, 151-61.

Crofton K. M., Padilla S., Tilson H. A., Anthony D. C., Raymer J. H., MacPhail R. C., The impact of dose rate on the neurotoxicity of acrylamide: the interaction of administered dose, target tissue concentrations, tissue damage, and functional effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996, *139 (1)*, 163-76.

Cupid B. C., Zeng Z., Singh R., Shuker D. E., Detection of O6-carboxymethyl-2'-deoxyguanosine in DNA following reaction of nitric oxide with glycine and in human blood DNA using a quantitative immunoslot blot assay. *Chem. Res. Toxicol.* 2004, *17 (3)*, 294-300.

Curren R. D., Yang L. L., Conklin P. M., Grafstrom R. C., Harris C. C., Mutagenesis of xeroderma pigmentosum fibroblasts by acrolein. *Mutat. Res.* 1988, *209*, 17-22.

Daniels D. S., Mol C. D., Arvai A. S., Kanugula S., Pegg A. E., Tainer J. A., Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical base binding. *Embo J.* 2000, *19 (7)*, 1719-30.

Dearfield K. L., Douglas G. R., Ehling U. H., Moore M. M., Sega G. A., Brusick D. J., Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat. Res.* 1995, *330 (1-2)*, 71-99.

Denissenko M. F., Chen J. X., Tang M. S., Pfeifer G., Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human P53 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1996, *95*, 3893-8.

Denkel E., Pool B. L., Schlehofer J. R., Eisenbrand G., Biological activity of N-nitrosodiethanolamine and of potential metabolites which may arise after activation by alcohol dehydrogenase in Salmonella typhimurium, in mammalian cells, and in vivo. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1986, *111 (2)*, 149-53.

Denkel E., Sterzel W., Eisenbrand G., In-vivo activation of N-nitrosodiethanolamine and other n-nitroso-2-hydroxyalkylamines by alcohol dehydrogenase and sulfotransferase. *IARC Sci. Publ.* 1987, *84*, 83-6.

Dennehy, M. K., Loeppky R. N., Mass spectrometric methodology for the determination of glyoxaldeoxyguanosine and O6-hydroxyethyldeoxyguanosine DNA adducts produced by nitrosamine bident carcinogens. *Chem. Res. Toxicol.* 2005, *18 (3)*, 556-65.

Diem E., Ivancsits S., Rudiger H. W., Basal levels of DNA strand breaks in human leukocytes determined by comet assay. *J. Toxicol. Environ. Health A* 2002, *65 (9)*, 641-8.

Dittberner, U., Eisenbrand G., Zankl H., Cytogenetic effects of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) and NDELA-monoacetate in human lymphocytes*. J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1988, *114 (6)*, 575-8.

Dittberner U., Eisenbrand G., Zankl H., Genotoxic effects of the α,β-unsaturated aldehydes 2-trans-butenal, 2-trans-hexenal and 2-trans,6-cis-nonadienal. *Mutat. Res*. 1995, *335*, 259-65.

Dixit R., Das M., Seth P. K., Mukhtar H., Interaction of acrylamide with glutathione in rat erythrocytes. *Toxicol. Lett.* 1984, *23 (3)*, 291-8.

Dodson M. L., Michaels M. L., Lloyd R. S., Unified catalytic mechanism for DNA glycosylases, *J. Biol. Chem.* 1994,*269*, 32709-12.

Doerge D. R., Gamboa da Costa G., McDaniel L. P., Churchwell M. I., Twaddle N. C., Beland F. A., DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats. *Mutat. Res.* 2005, *580 (1-2)*, 131-41.

Dong H., Bonala R. R., Suzuki N., Johnson F., Grollman A. P., Shibutani S., Mutagenic Potential of Benzo[a]pyrene-Derived DNA Adducts positioned in Codon 273 of human p53 gene, *Biochemistry* 2004, *43*, 15922-5.

Drawert F., Tressel R., Heimann W., Emberger R., Speck M., Über die Biogenese von Aromastoffen bei Pflanzen und Früchten XV*; Enzymatisch-oxidative Bildung von c6-Aldehyden und Alkoholen und deren Vorstufen bei Äpfeln und Trauben. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 1973, *2*, 10-22.

Dybing E., Farmer P. B., Andersen M., Fennell T. R., Lalljie S. P., Muller D. J., Olin S., Petersen B. J., Schlatter J., Scholz G., Scimeca J. A., Slimani N., Tornqvist M., Tuijtelaars S., Verger, P., Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food Chem. Toxicol.* 2005, *43 (3)*, 365-410.

Eder E., Scheckenbach S., Deininger C., Hoffman C., The possible role of alpha, beta-unsaturated carbonyl compounds in mutagenesis and carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* 1993, *67 (1-3)*, 87-103.

Eder E., Hoffman C., Sporer S., Schneckenbach S., Biomonitoring studies and susceptibility markers for acrolein congoners and allylic and benzyl compounds. *Environm. Health Persp.* 1993b, *99*, 245-7.

EFSA-Entwurf zu einer harmonisierten Strategie für die Risikobewertung von genotoxischen kanzerogenen Substanzen 2005; http://www.efsa.eu.int/advisory_forum/adv_meetings/876_de.html

Eisenbrand G., Müller N., Denkel E., Sterzel W., DNA adducts and DNA damage by antineoplastic and carcinogenic N-nitrosocompounds. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1986, *112 (3)*, 196-204.

Eisenbrand G., Schumacher J., Gölzer P., The influence of glutathione and detoxifying enzymes on DNA damage induced by 2-alkenals in primary rat hepatocytes and human lymphoblastoid cells. *Chem. Res. Toxicol*. 1995, *8*, 40-46.

Eisenbrand G., Metzler M., Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner. Thieme-Verlag; 1. Auflage, 2005.

Eisenstadt E., Warren A. J., Porter J., Atkins D., Miller J. M., Carcinogenic epoxides of benzo[a]pyrene and cyclopenta[cd]pyrene induce base substitutions via specific transfersions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1982, *79*, 1945-9.

Ellahuene M. F., Perez-Alzola L. P., Farfan-Urzua M., Gonzalez-Hormazabal P., Garay M., Olmedo M. I., Last J. A., Preliminary evaluation of DNA damage related with the

smoking habit measured by the comet assay in whole blood cells. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004, *13 (7)*, 1223-9.

Farrelly, J. G., Thomas B. J., Lijinsky W., Metabolism and cellular interactions of N-nitrosodiethanolamine. *IARC Sci. Publ.* 1987, *84*, 87-90.

Faust F., Kassie F., Knasmuller S., Boedecker R. H., Mann M., Mersch-Sundermann V., The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 2004, *566 (3)*, 209-29.

FDA (Food and Drug Administration), Food additives permitted for direct addition to food for human consumption: Neotame. Washington, DC: Federal Register; April, 3 1998 2002. 21 CFR 172.829.

Fennell T. R., Snyder R. W., Krol W. L., Sumner S. C., Comparison of the hemoglobin adducts formed by administration of N-methylolacrylamide and acrylamide to rats. *Toxicol. Sci.* 2003, *71 (2)*, 164-75.

Fennell T. R., Sumner S. C., Snyder R. W., Burgess J., Spicer R., Bridson W. E., Friedman M. A., Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol. Sci.* 2005, *85 (1)*, 447-59

Fernandes A., Liu T., Amin S., Geacintov N. E., Grollman A. P., Moriya M., Mutagenic potential of stereoisomeric bay region (+)- and (-)-cis-anti-Benzo[a]pyrene Diol Epoxide-N2´-deoxyguanosin adducts in Escherichia coli und Simian Kidney cells, *Biochemistry* 1998, *37*, 10164-72.

Feron V. J., Til H. P., de Vrijer F., Woutersen R. A., Cassee F. R., van Bladeren P. J., Aldehydes: Occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutat. Res*. 1991, *259*, 363-85.

Fichtl B., Mückter H., in *Lehrbuch der Toxikologie*, 2. ed. (Eds.: Marquardt H., Schäfer S.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2004, 41-88.

Fong L. Y., Jensen D. E., Magee P. N., DNA methyl-adduct dosimetry and O6-alkylguanine-DNA alkyl transferase activity determinations in rat mammary carcinogenesis by procarbazine and N-methylnitrosourea. *Carcinogenesis* 1990, *11 (3)*, 411-7.

Friedberg E. C., Walker G. C., Siede W., DNA Repair and Mutagenesis, *Am. Soc. for Microbiol. Press* 1995, Washington D. C.

Friedberg E. C., How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2001, *1 (1)*, 22-33.

Friedman M. A., Dulak L. H., Stedham M. A., A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide*. Fundam. Appl. Toxicol*. 1995, *27 (1)*, 95-105.

Friedman M., Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J. Agric. Food Chem.* 2003, *51 (16)*, 4504-26.

Fuhr U., Boettcher M. I., Kinzig-Schippers M., Weyer A., Jetter A., Lazar A., Taubert D., Tomalik-Scharte D., Pournara P., Jakob V., Harlfinger S., Klaassen T., Berkessel A., Angerer J., Sorgel F., Schomig E., Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006, *15 (2)*, 266-71.

Gamboa da Costa G., Churchwell M. I., Hamilton L. P., Von Tungeln L. S., Beland F. A., Marques M. M., Doerge, D. R., DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chem. Res. Toxicol.* 2003, *16 (10)*, 1328-37.

Gates K. S., Nooner T., Dutta S., Biologically relevant chemical reactions of N7-Alkylguanine residues in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 2004, *17 (7)*, 840-56.

Gaunt I. F., Colley J., Wright M., Creasey M., Grasso P., Gangolli S. D., Acute and short-term toxicity studies on trans-2-hexenal. *Food Cosmet Toxicol.* 1971, *9*, 775-86.

Geacintov N. E., Cosman M., Hingerty B. E., Amin S., Broyde S., Patel, D. J., NMR solution structures of stereoisometric covalent polycyclic aromatic carcinogen-DNA adduct: principles, patterns, and diversity. *Chem. Res. Toxicol.* 1997, *10 (2)*, 111-46.

Ghanayem B. I., Witt K. L., Kissling G. E., Tice R. R., Recio L., Absence of acrylamide-induced genotoxicity in CYP2E1-null mice: evidence consistent with a glycidamide-mediated effect. *Mutat. Res.* 2005a, *578 (1-2)*, 284-97.

Ghanayem B. I., Witt K. L., El-Hadri L., Hoffler U., Kissling G. E., Shelby M. D., Bishop J. B., Comparison of germ-cell mutagenicity in male CYP2E1-null and wild-type mice treated with acrylamide: evidence supporting a glycidamide-mediated effect, *Biol. Reprod.* 2005b, *72*, 157-63.

Ghissassi F. E., Barbin A., Nair J., Bartsch H., Formation of 1,N6-Ethenoadenine and 3, N4-Ethenocysteine by Lipid Peroxidation Products and Nucleic Acid Bases. *Chem. Res. Tox.* 1995, *8*, 278-83.

Gilbert P., Rollmann B., Rondelet J., Mercier M., Poncelet F., Mutagenicity of N-nitrosodiethanolamine and its acetyl derivates. Societe Belge de Biochimie-Reunion der Beerse 1979.

Glaab V., Collins A. R., Eisenbrand G., Janzowski C., DNA damaging potential and glutathione depletion of 2-cyclohexene-1-one in mammalian cells, compared to food relevant 2-alkenals. *Mutat. Res*. 2001, *497*, 185-97.

Glatt H., Gemperlein I., Turchi G., Heinritz H., Doehmer J., Oesch F., Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolizing activities and their use in toxicological studies. *Mol. Toxicol.* 1987, *1 (4)*, 313-34.

Glatt H.-R., in: Fahrig R. (ed.) Mutationsforschung und genetische Toxikologie, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, 1993, 243-62.

Gölzer P., Janzowski C., Pool-Zobel B. L., Eisenbrand G., (E)-2-Hexenal-induced DNA damage and formation of cyclic 1,N2 -(1,3-propano)-2'-deoxyguanosine adducts in mammalian cells. *Chem. Res. Toxicol.* 1996, *9*, 1207-13.

Gooma E. A., Gray J. I., Rabie S., Lopez-Bote C., Booren A. M., Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products and commercial liquid smoke flavourings*. Food Add. Contam.* 1993, *10*, 503-21.

Grafström R. C., Edman C. C., Sundqvist K., Liu Y., Hybbinette S. S., Atzori L., Nicotera P., Dypbukt J., Cultured human bronchial cells as a model system in lung toxicology and carcinogenesis: implications from studies with acrolein. *Altern. Lab. Anim*. 1986, *16*, 231-243.

Grafström R. C., Dypbukt J. M., Willey J. C., Sundqvist K., Edman C. Atzori L., Harris C., *Cancer Res.*1988, *48*, 1717-21.

Granvogl M., Jezussek M., Koehler P., Schieberle P., Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes-a minor but potent precursor in acrylamide formation. *J. Agric. Food Chem.* 2004, *52 (15)*, 4751-7.

Guillen M. D., Sopelana P., Partearroyo M. A., Food as a source of polycyclic aromatic carcinogens. *Rev. Environm. Health* 1997, *12*, 133-46.

Gunz D., Hess M. T., Naegeli H., Recognition of DNA adducts by human nucleotide excision repair. Evidence for a thermodynamic probing mechanism. *J. Biol. Chem.* 1996, *271 (41)*, 25089-98.

Hagmar L., Tornqvist M., Nordander C., Rosen I., Bruze M., Kautiainen A., Magnusson A. L., Malmberg B., Aprea P., Granath F., Axmon A., Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scand. J. Work Environ. Health* 2001, *27 (4)*, 219-26.

Hanelt S., Helbig R., Hartmann A., Lang M., Seidel A., Speit G., A comparative investigation of DNA adducts, DNA strand breaks and gene mutations induced by benzo[a]pyrene and (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells. *Mutat. Res.* 1997, *390 (1-2)*, 179-88.

Hales B., Comparison of the mutagenicity and teratogenicity of cyclophosphamide and its active metabolites, 4-Hydroxycyclophosphamide, phophoramide mustard, and Acrolein. *Cancer Res.* 1982, *42*, 3016-21.

Harrison K. L., Fairhurst N., Challis B. C., Shuker D. E., Synthesis, characterization, and immunochemical detection of O6-(carboxymethyl)-2'-deoxyguanosine: a DNA adduct formed by nitrosated glycine derivatives. *Chem. Res. Toxicol.* 1997, *10 (6)*, 652-9.

Harrison K. L., Jukes R., Cooper D. P., Shuker D. E. G., Detection of concomitant formation of O^6-carboxymethyl- and O^6-methyl-2'-deoxyguanosine in DNA exposed to nitrosated

glycine derivatives using a combined immunoaffinity/HPLC method. *Chem. Res. Toxicol. 1999*, *12 (1)*, 106-11.

Hartwell I. H., Kastan M. B., Cell cycle control and cancer. *Science* 1995, *266*, 1821-28.

Hashimoto K., Hayashi M., Tanii H., Sakamoto J., Toxicological aspects of acrylamide neuropathy. *J. UOEH*, 1988, *10*, 209-18.

He Y. H., Xu Y., Kobune M., Wu M., Kelley M. R., Martin W. J., 2nd, Escherichia coli FPG and human OGG1 reduce DNA damage and cytotoxicity by BCNU in human lung cells*. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2002, *282 (1)*, L50-5.

Hemminki K., Falck K., Vainio H., Comparison of alkylation rates and mutagenicity of directly acting industrial and laboratory chemicals. Epoxides, glycidyl ethers, methylating and ethylating agents, halogenated hydrocarbons, hydrazine derivates, aldehydes, thiuram and dithiocarbamate derivates. *Arch. Toxicol.* 1980, *46*, 277-85.

Henderson L., Albertini S., Aardema M., Threshold in genotoxicity responses. *Mutat. Res.* 2000, *464*, 123-8.

Henn I., Eisenbrand G., Zankl H., Increased mutagenicity of N-nitrosodiethanolamine in human lymphocyte cultures after activation by alcohol dehydrogenase. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1989, *115 (5)*, 445-8.

Hilfrich, I., Schmeltz, I., Hoffmann, D., Effects of N-Nitroso-diethanolamine and 1,1-diethanolhydrazine in Syrian golden hamsters. *Canc. Lett.* 1978, *4*, 55-60.

Hoffmann H., Speit G., Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. *Mutat. Res.* 2005, *581 (1-2)*, 105-14.

Hoffmann M., Genotoxisches Potential von Nitrosaminen und Nitrosoharnstoffen in humanem Vollblut und V79–Zellen, Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern, 2005b.

Horvathova E., Slamenova D., Gabelova A., Use of single cell gel electrophoresis (comet assay) modifications for analysis of DNA damage. *Gen. Physiol. Biophys.* 1999, *18*, 70-4.

Houten van B., Nucleotide excision repair in Escherichia coli. *Mikrobiol. Rev.* 1990, *54*, 18-51.

Huang X., Kolbanovskiy A., Wu X., Zhang Y., Wang Z., Zhuang, P., Amin S., Geacintov N. E., Effects of base sequence context on translesion synthesis past a bulky (+)-trans-anti-B[a]P-N2-dG lesion catalyzed by the Y-family polymerase pol kappa. *Biochemistry* 2003, *42 (8)*, 2456-66.

Huberman E., Sachs L., Shen K., Yang T, Gelboin H. T., Identification of mutagenic metabolites of benzo[a]pyrene in mammalian cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1976, *73 (2)*, 607-11.

IARC (International Agency for Research on Cancer, World Health Organisation), Acrylamide. In: Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans 1994, *60*, 389-433.

IARC (International Agency for Research on Cancer, World Health Organisation), Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans 1995, *63*, Lyon, 373-91.

Ikeda G. J., Miller E., Sapienza P. P., Michel T. C., Inskeep P. B., Comparative tissue distribution and excretion of [1-^{14}C]-acrylamide in beagle dogs and miniature pigs. *Food Chem. Toxicol.* 1987, *25*, 871-5.

IPCS, Selected Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Environmental Health Criteria 1998, 202. International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva.

Janzowski C., Scharner A., Eisenbrand G., Activation of Nitrosamines by cytochrome P450 isoenzymes expressed in transfected V79 cells. *Eur. J. Canc. Prev.* 1996, *5 (1)*, 154.

Janzowski, C., Glaab V., Samimi E., Schlatter J., Eisenbrand G., 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food Chem. Toxicol.* 2000, *38 (9)*, 801-9.

Janzowski C., Hemm I., Eisenbrand G., Organische Verbindungen/N-Nitrosamine; Handbuch Umweltmedizin VI-4, 2000,1-30.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 61st meeting: Summary and conclusions. www.who.int/pcs/jecfa/Summary61.pdf. September, 26, 2003.

Jelinsky S. A., Liu T. M., Geacintov N. E., Loechler E. L., The major N2-Gua adduct of the (+)-anti-benzo[a]pyrene diol epoxide is capable for inducing G→A and G→C, in addition to G→T mutations. *Biochemistry* 1995, *34*, 13545-53.

Jenkins G. J. S., Doak S. H., Johnson G. E., Quick E., Waters E. M., Parry J.M., Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents? *Mutagenesis* 2005, *20*, 389-98.

Jensen D. E., Stelman G. J., Spiegel A., Species differences in blood-mediated nitrosocimetidine denitrosation. *Cancer Res.* 1987, *47*, 353-9.

Jensen D. E., Stelman G. J., Williams A. W., Microsomally-mediated denitrosation of nitrosoguanidinium compounds. *Carcinogenesis* 1990, *11 (7)*, 1075-82.

Jenström B., Gräslund A., Covalent binding of benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol 9,10-epoxide to DNA: molecular structures, induced mutations and biological consequences. *Biophys. Chem.* 1994, *49*, 185-99.

Johnson K. A., Gorzinski S. J., Bodner K. M., Campbell R. A., Wolf C. H., Friedman M. A., Mast R. W., Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1986, *85 (2)*, 154-68.

Kadlubar F. F., Beranek D. T., Weis C. C., Evans F. E., Cox R., Irving C. C., Characterization of the purine ring-opened 7-methylguanine and its persistence in rat bladder epithelial DNA after treatment with the carcinogen N-methylnitrosourea. *Carcinogenesis* 1984, *5 (5)*, 587-92.

Kadry A. M., Friedman M. A., Abdel-Rahman M. S., Pharmacokinetics of acrylamide after oral administration in male rats. *Environm. Pharmacol. Toxicol.* 1999, *7*, 127-33.

Kaina B., Fritz G., Coquerelle T., Transfection and expression of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis* 1991, *12 (10)*, 1857-67.

Karl H., Leinemann M., Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fishery products from different smoking kilns. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1996, *202*, 458-64.

Kawachi T., Kogure K., Kamijo Y., Sugimura T., The metabolism of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1970, *222 (2)*, 409-15.

Kelly J. D., Shah D., Chen F. X., Wurdeman R., Gold B., Quantitative and qualitative analysis of DNA methylation at N3-adenine by N-methyl-N-nitrosourea. *Chem. Res. Toxicol.* 1998, *11 (12)*, 1481-6.

Kirsch-Volders M., Aardema M., Elhajouji A., Concepts of thresholds in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 2000, *464*, 3-11.

Kjuus H., Goffeng L. O., Heier M. S., Sjoholm H., Øvrebø S., Skaug V., Paulsson B., Tornqvist B., Brudal S., Effects on the peripheral nervous system of tunnel workers exposed to acrylamide and N-methylol acrylamide. *Scandinavian Journal of Work Environment and Health* 2004, *30*, 21–29.

Klaude M., Eriksson S., Nygren, J., Ahnström, G., The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.* 1996, *363*, 89-96.

Klaunig J. E., Kamendulis L. M., Mechanisms of acrylamide induced rodent carcinogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2005, *561*, 49-62.

Kleinsasser N. H., Wallner B. C., Kastenbauer E. R., Muenzenrieder R. K., Harréus A., Comparting the genotoxic sensitivties of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of upper aerodigestive trat using the Comet Assay. *Mutat. Res.* 2000, *467*, 21-30.

Knaap A. G., Kramers P. G., Voogd C. E., Bergkamp W. G., Groot M. G., Langebroek P. G., Mout H. C., van der Stel J. J., Verharen, H. W., Mutagenic activity of acrylamide in eukaryotic systems but not in bacteria. *Mutagenesis* 1988, *3 (3)*, 263-8.

Knippers R., Mutationen. DNA-Schäden und DNA-Reparatur. In: Molekulare Genetik. 8. Auflage, Georg Thieme-Verlag, 2001, 245-83.

Kohl Y., Vergleichende Untersuchungen zur Genotoxizität und Mutagenität von verbraucherrelevanten, nitrosierten sekundären Amin-Verbindungen. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern, 2007.

Köhl W., Eisenbrand G., in *Lehrbuch der Toxikologie*, 2. ed. (Eds.: Marquardt H., Schäfer S.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2004, 747-61.

Koopman G., Reutelingsberger C. P. M., Kuijten G. A. M., Keehnen R. M. J., Pals S. T., Oers van M. H. J., Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994, *84 (5)*, 1415-20.

Kosower N. S., Kosower E. M., The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.* 1978, ***54***, 109-60.

Kozack R. E., Loechler E. L., Molecular modelling of the conformational complexity of (+)-anti-BPDE-adducted DNA using simulated annealing, *Carcinogenesis* 1997, *18*, 1585-93.

Lähdetie J., Suutari A., Sjoblom T., The spermatid micronucleus test with the dissection technique detects the germ cell mutagenicity of acrylamide in rat meiotic cells. *Mutat. Res.* 1994, *309 (2)*, 255-62.

Laval J., Lopes F., Madelmont J. C., Godeneche D., Meyniel G., Habraken Y., O'Connor T. R., Boiteux S., Excision of imidazole ring-opened N7-hydroxyethylguanine from chloroethylnitrosourea-treated DNA by Escherichia coli formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *IARC Sci. Publ.* 1991, *105*, 412-6.

Laval J., Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress, *Pathol. Biol.* (Paris) 1996, *44*, 14-24.

Lawley P. D., Thatcher C. J., Methylation of Deoxyribonucleic Acid in Cultured Mammalian Cells by N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Biochem. J.* 1970, *116*, 693-707.

Lee S. Y., Guttenplan J. B., A correlation between mutagenic and carcinogenic potencies in a diverse group of N-nitrosamines: determination of mutagenic activities of weakly mutagenic N-nitrosamines. *Carcinogenesis* 1981, *2 (12)*, 1339-44.

Lehning E. J., Balaban C. D., Ross J. F., Reid M. A., Lo Pachin R. M., Acrylamide neuropathy. I. Spatiotemporal characteristics of nerve cell damage in rat cerebellum. *Neurotoxicology* 2002a, *23 (3)*, 397-414.

Lehning E. J., Balaban C. D., Ross J. F., Lo Pachin, R. M., Acrylamide neuropathy. II. Spatiotemporal characteristics of nerve cell damage in brainstem and spinal cord. *Neurotoxicology* 2002b, *23 (3)*, 415-29.

Levin W., Wood A., Chang R., Ryan D., Thomas P., Yagi H., Thakker D., Vyas K., Boyd C., Chu S.-Y., Conney A., Jerina D., Oxidative metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons to ultimate carcinogens. *Drug Metab. Rev*. 1982, *13*, 555-80.

Lewin M. H., Bailey N., Bandaletova T., Bowman R., Cross A. J., Pollock J., Shuker D. E., Bingham S. A., Red meat enhances the colonic formation of the DNA adduct O6-carboxymethyl guanine: implications for colorectal cancer risk. *Cancer Res.* 2006, *66 (3)*, 1859-65.

Li Q., Laval J., Ludlum, D. B., Fpg protein releases a ring-opened N-7 guanine adduct from DNA that has been modified by sulfur mustard. *Carcinogenesis* 1997, *18 (5)*, 1035-8.

Licea-Perez H. L., Cheong H. K., Yang J. S., Osterman-Golkar S., Simultaneous analysis of hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide by gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 1999, *274*, 59–68.

Lijinsky W., Andrews A. W., The superiority of hamster liver microsomal fraction for activating nitrosamines to mutagens in Salmonella typhimurium. *Mutat. Res.* 1983, *111*, 135-44.

Lijinsky, W., Reuber, M. D., Carcinogenicity of hydroxylated alkylnitrosoureas and of nitrosooxazolidones by mouse skin painting and by gavage in rats. *Cancer Research* 1983, *43(1)*, 214-21.

Lijinsky, W., Thomas, B. J., Kovatch, R. M., Systemic and local carcinogenesis by directly acting N-nitroso compounds given to rats by intravesicular administration. *Carcinogenesis* 1992, *13(7)*, 1101-5.

Lindahl T., Andersson A., Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 1972, *11 (19)*, 3618-23.

Lindl T., Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 1992, Spektrum, Akademischer Verlag, 5. Auflage.

Lloyd D. R., Hanawalt P. C., p53-dependent global genomic repair of benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide adducts in human cells. *Cancer Res.* 2000, *60 (3)*, 517-21.

Lobanenkov V. V., Plumb G. H., Goodwin G. H., Grover P. L., The effect of neighbouring bases on G-specific DNA-cleavage mediated by treatment with the anti-diol Epoxide of benzo[a]pyrene in vitro. *Carcinogenesis* 1986, *7*, 1689-95.

Lodovici M., Dolara P., Casalini C., Ciappellano S., Testolini G., Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Italian diet. *Food Add. Contam.* 1995, *12*, 703-13.

Loeb L. A., Preston B. D., Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annu. Rev. Genet.* 1986, *20*, 201-30.

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. *Chem. Res. Toxicol.* 1998, *11 (12)*, 1556-66.

Loeppky, R. N., Goelzer P., Microsome-mediated oxidation of N-nitrosodiethanolamine (NDELA), a bident carcinogen. *Chem. Res. Toxicol.* 2002a, *15 (4)*, 457-69.

Loeppky, R. N., Ye Q., Gölzer 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. *Chem. Res. Toxicol.* 2002b, *15 (4)*, 470-82.

Loeppky, R. N., Sukhtankar S., Gu F., Park M., The Carcinogenic Significance of Reactive Intermediates Derived from 3-Acetoxy- and 5-Acetoxy-2-hydroxy-N-nitrosomorpholine. *Chem. Res. Toxicol.* 2005, *18 (12)*, 1955-66.

Loveless A., Possible relevance of O-6 alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. *Nature* 1969, *223 (5202)*, 206-7.

Ludlum D. B., The chloroethylnitrosoureas: sensitivity and resistance to cancer chemotherapy at the molecular level. *Cancer Invest.* 1997, *15 (6)*, 588-98.

Lutz W. K., Endogenous genotoxic agents and processes as a basis of spontaneous carcinogenesis. *Mutat. Res.* 1990, *238 (3)*, 287-95.

Maniere I., Godard T., Doerge D. R., Churchwell M. I., Guffroy M., Laurentie, M., Poul J. M., DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide. *Mutat. Res.* 2005, *580 (1-2)*, 119-129.

Manjanatha M. G., Aidoo A., Shelton S. D., Bishop M. E., McDaniel L. P., Lyn-Cook L. E., Doerge D. R., Genotoxicity of acrylamide and its metabolite glycidamide administered in drinking water to male and female Big Blue mice. *Environ. Mol. Mutagen.* 2006, *47 (1)*, 6-17.

Marlowe C., Clark M. J., Mast R. W., Friedman M. A., Waddell W. J., The distribution of [14C]-acrylamide in male and pregnant Swiss-Webster mice studied by whole-body autoradiography. *Toxicol. Apll. Pharmacol.* 1986, *86*, 457-65.

Marnett L. J., Hurd H. K., Hollstein M. C., Levin D. E., Esterbauer H., Ames B. N., Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in Salmonella tester strain TA 104. *Mutat. Res.* 1985, *148*, 25-34.

Marquardt H., Pfau W., in *Lehrbuch der Toxikologie*, 2. ed. (Eds.: Marquardt H., Schäfer S.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2004, 157-93.

Marsh G. M., Lucas L. J., Youk A. O., Schall L. C., Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up. *Occup. Environ. Med.* 1999, *56 (3)*, 181-90.

McLeod M. C., Daylong A., Adair G., Humphrey R. M., Differences in the rate of DNA adduct removal and the efficiency of mutagenesis for two benzo[a]pyrene diol epoxides in CHO cells. *Mutat. Res.* 1991, *261*, 267-79.

Meister A., Anderson M. E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 1983, *52*, 711-60.

Mertes P., Acrylamid und Glycidamid: Induktion von Mutationen am *hPRT*-Locus in V79 Zellen und Synthese eines Pentafluorphenyl-Thiohydantoins las Referenz zum Nachweis

von Glycidamid-Hämoglobin-Addukten. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern, 2003.

Michael S., Untersuchungen zur Reparatur von Glycidamid-induzierten DNA-Schäden in V79 Zellen und zur Induktion der SOS-Reparaturenzymkaskade in *Salmonella typhimurium* Stämmen, Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern, 2006.

Miller M. J., Carter D. E., Sipes I. G., Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1982, *63 (1)*, 36-44.

Mirvish S. S., Ross A. E. Gold, B., Drake N., In vitro and in vivo formation of 7-(2'-carboxyethyl)guanine from the liver carcinogen 1-nitroso-5,6-dihydrouracil and its reactions with water and methanol. *J. Natl. Cancer Inst.* 1985, *74 (5)*, 1105-10.

Mirvish, S. S., Markin, R. S., Lawson, T. A., Nickols, J. G., Induction of hyperplastic liver nodules in Wistar and MRC-Wistar rats by phenobarbital and the liver carcinogens acetoxime, 1-nitroso-5,6-dihydrouracil and 3-nitroso-2-oxazolidinone. *Cancer Letters* 1988, *41(2)*, 211-16.

Mirvish S. S., Experimental Evidence for Inhibition of N-Nitroso-compound Formation as a Factor in the Negative Correlation between Vitamin C Consumption and the Incidence of certain Cancers*. Cancer Res.* 1994, *54*, 1948-51.

Miyamae Y., Iwasakai K., Kinae N., Tsuda S., Murakami M., Tanaka M., Sasaki, Y. F., Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell electrophoresis (Comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutat. Res.* 1997, *393*, 107-13.

Moore M. M., Amtower A., Doerr C., Brock K. H., Dearfield K. L., Mutagenicity and clastogenicity of acrylamide in L5178Y mouse lymphoma cells. *Environ. Mutagen.* 1987, *9 (3)*, 261-7.

Mottram D. S., Wedzicha B. L., Dodson A. T., Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 2002, *419 (6906)*, 448-9.

Mucci L. A., Dickman P. W., Steineck G., Adami H. O., Augustsson K., Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: absence of an association in a population-based study in Sweden. *Br. J. Cancer* 2003, *88 (1)*, 84-9.

Mucci L. A., Lindblad P., Steineck G., Adami H. O., Dietary acrylamide and risk of renal cell cancer*. Int. J. Cancer* 2004, *109 (5)*, 774-6.

Mucci L. A., Adami H. O., Wolk A., Prospective study of dietary acrylamide and risk of colorectal cancer among women. *Int. J. Cancer* 2006, *118 (1)*, 169-73.

Müller, N., Conrad J., Eisenbrand G., Alkylation of 2'-deoxythymidylyl(3'----5')-2'-deoxythymidine with 2-hydroxyethylnitrosourea and stability of the resulting phosphotriester. *IARC Sci. Publ.* 1987, *84*, 194-6.

Nair J., Fürstenberger G., Bürger F., Marks F., Bartsch H., Promutagenic Etheno-DNA Adducts in Multistage Mouse Skin Carcinogenesis: Correlation with Lipoxygenase-Catalyzed Arachidonic Acid Metabolism. *Chem. Res. Toxicol.* 2000, *13*, 703-9.

Neuhauser-Klaus, A., Schmahl W., Mutagenic and teratogenic effects of acrylamide in the mammalian spot test. *Mutat. Res.* 1989, *226 (3)*, 157-62.

Neumann H.-G., in *Lehrbuch der Toxikologie*, 2. ed. (Eds.: Marquardt H., Schäfer S.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2004, 1099-1113.

NICNAS, National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme, Acrylamide. Priority Existing Chemical Assessment Report 2002, No. 23.

Ochi T., Ishiguro T., Ohsawa M., Induction of alkali-labile sites in DNA by benzo[a]pyrene and the repair of those lesions in cultured Chinese hamster cells. *Mutat. Res*. 1986, *165*, 31-8.

O'Connor T. R., Laval J., Physical association of the 2,6-diamino-4-hydroxy-5N-formamidopyrimidine-DNA glycosylase of Escherichia coli and an activity nicking DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1989, *86 (14)*, 5222-6.

Odland I., Romert L., Clemedson C., Walum E., Glutathione content, glutathione transferase activity and lipid peroxidation in acrylamide-treated neuroblastoma NIE 115 cells. *Toxicol. In Vitro* 1994, *8*, 263-7.

Ohshima H., Bartsch H., Quantitative estimation of endogenous nitrosation in humans by monitoring N-nitrosoproline excreted in urine. *Cancer Res.* 1981, *41*, 3658-62.

Ostling O. und Johanson K. J., Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984, *123*, 291-8.

Pacchierotti F., Tiveron C., D'Archivio M., Bassani B., Cordelli E., Leter G., Spano M., Acrylamide-induced chromosomal damage in male mouse germ cells detected by cytogenetic analysis of one-cell zygotes. *Mutat. Res.* 1994, *309 (2)*, 273-84.

Park M., Gu F., Loeppky R. N., The synthesis of highly reactive, multi-functional alpha,beta-epoxy- and alpha-Acetoxy-Nitrosamines. *Tetrahedron Letters* 1998, *39*, 1287-90.

Park J., Kamendulis L. M., Friedman M. A., Klaunig J. E., Acrylamide-induced cellular transformation. *Toxicol. Sci.* 2002, *65 (2)*, 177-83.

Patel J. M., Wood J. C., Leibman K. C., The biotransformation of allyl alcohol and acrolein in rat liver and lung preparations. *Drug Metab. Disp.* 1980, *8 (5)*, 305-8.

Paulsson B., Grawe J., Tornqvist M., Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or N-methylolacrylamide treatment. *Mutat. Res.* 2002, *516 (1-2)*, 101-11.

Paulsson B., Grawe J. K., N. Kotova, Henderson A., Granath F., Golding B., Tornqvist M., Induction of micronuclei in mouse and rat by glycidamide, genotoxic metabolite of acrylamide. *Mutat. Res.* 2003, *535 (1)*, 15-24.

Payne G. B., Williams P. H., Reactions of hydrogen peroxide. VI. Alkaline epoxidation of acrylonitrile. *Journal of Organic Chemistry* 1961, *26*, 651-9.

Pegg A. E., Scicchitano D., Dolan M. E., Comparison of the rates of repair of O6-alkylguanines in DNA by rat liver and bacterial O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Cancer Res.* 1984, *44 (9)*, 3806-11.

Pegg A. E., Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat. Res.* 2000, *462 (2-3)*, 83-100.

Peltonen K., Dipple A., Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry of DNA Addukt Formation. *JOM* 1995, *37*, 52-8.

Pelucchi C., Franceschi S., Levi F., Trichopoulos D., Bosetti C., Negri E., La Vecchia C., Fried potatoes and human cancer. *Int. J. Cancer* 2003, *105 (4)*, 558-60.

Phillips D. H., Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat. Res*. 1999, *443*, 139-47.

Preat V., Schulze C., Sterzel W., Eisenbrand G., Roberfroid M., Comparison of induction of DNA single-strand breaks and initiation of rat hepatocarcinogenesis by different nitrosamines. *IARC Sci. Publ.* 1987, *84*, 200-1.

Preussmann, R., Habs, M., Habs, H., Schmaehl, D., Carcinogenicity of N-nitrosodiethanolamine in rats at five different dose levels. *Canc. Res.* 1982, *42*, 5167-71.

Puppel N., Tjaden Z., Fueller F., Marko D., DNA strand breaking capacity of acrylamide and glycidamide in mammalian cells. *Mutat. Res.* 2005, *580 (1-2)*, 71-80.

Rao K. T., Young J. A., Lijinsky W., Epler J. L., Mutagenicity of aliphatic nitrosamines in Salmonella typhimurium. *Mutat. Res.* 1979, *66*, 1-9.

Rill, R. L., Marsch G. A., Sequence preferences of covalent DNA binding by anti-(+)- and anti-(-)-benzo[a]pyrene diol epoxides. *Biochemistry* 1990, *29 (25)*, 6050-8.

Romert L., Jenssen D., Mechanism of N-acetylcysteine (NAC) and other thiols as both positive and negative modifiers of MNNG-induced mutagenicity in V79 Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 1987, *8 (10)*, 1531-5.

Rydberg B. und Johanson K. J., (Eds.: Hanawalt P. C., Friedberg E. C., Fox D.), Academic press, New York, 1978, 465-8.

Sage E., Haseltine W. A., High ratio of alkali-sensitive lesions to total DNA modification induced by benzo(a)pyrene diol epoxide. *J. Biol. Chem.* 1984, *259 (17)*, 11098-102.

Santala T., Fishbein J. C., Thiolytic decomposition of the carcinogen N-Methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine. A change in rate-limiting step with nucleophilic basicity controls alkylating activity. *J. Am. Chem. Soc* 1992, *114*, 8852-7.

Scientific Committee on Food, Opinion of the Scientific Committee on Food on new findings regarding the presence of acrylamide in food, 2000a

Scientific Committee on Food, Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food, 2002b.

Schärer, O., Chemie und Biologie der DNA-Reparatur, *Angew. Chemie* 2003, *115 (26)*, 3052-82.

Scherer G., Ludeke B., Kleihues P., Loeppky R. N., Eisenbrand G., Mutagenicity, DNA damage and DNA adduct formation by N-nitroso-2-hydroxyalkylamine and corresponding aldehydes. *IARC Sci. Publ.* 1991, *105*, 339-42.

Schmezer P., Pool B. L., Preussmann R., Schmahl D., Analysis of N-nitrosamines for genotoxicity in primary hepatocytes derived from various species. *IARC Sci. Publ.* 1987, *84*, 270-3.

Schuhmacher J., Dissertation: Untersuchungen zur Gentoxizität und zum Metabolismus aromawirksamer α,β-ungesättigter Aldehyde. 1990, Universität Kaiserslautern.

Schulte-Hermann R., Marian B., Bursch W., Grasl-Kraupp B., in *Lehrbuch der Toxikologie*, 2. ed. (Eds.: Marquardt H., Schäfer S.), Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2004, 195-242.

Sedgwick B, Robins P., Isolation of mutants of Escherichia coli with increased resistance to alkylating agents: mutants deficient in thiols and mutants constitutive for the adaptive response. *Mol. Gen. Genet.* 1980, *180 (1)*, 85-90.

Sedgwick B., Lindahl T., Recent progress on the Ada response for inducible repair of DNA alkylation damage. *Oncogene* 2002, *21 (58)*, 8886-94.

Segal A., Solomon J. J., Mignano J., Dino J., The isolation and characterization of 3-(2-carboxyethyl)cytosine following in vitro reaction of beta-propiolactone with calf thymus DNA. *Chem. Biol. Interact.* 1981, *35 (3)*, 349-61.

Segerback D., Calleman C. J., Schroeder J. L., Costa L. G., Faustman E. M., Formation of N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [14C]acrylamide. *Carcinogenesis* 1995, *16 (5)*, 1161-5.

Seglen P. O., Preparation of isolated rat liver cells. *Meth. Cell. Biol.* 1976, *13*, 29-83.

Shu L., Hollenberg P. F., Identfication of the cytochrom P450 isoenzymes involved in the metabolism of N-Nitrosodibutyl- and N-Nitroso-n-butyl-n-propylamine. *Carcinogenesis* 1996, *17 (4)*, 839-48.

Shuker D. E. G., Margison G. P., Nitrosated glycine derivatives as a potential source of O^6-methylguanine. *Cancer Res.* 1997, *57*, 366-9.

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. *Exp. Cell Res.* 1988, *175*, 184-91.

SKLM (DFG-Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln), Toxikologische Beurteilung (α,β-ungesättigter aliphatischer Aldehyde in Lebensmitteln, Endfassung vom 18/19. April 2002.

Slamenova D., Gabelova A., Ruzekova L., Chalupa I., Horvathova E., Farkasova T., Bozsakyova E., Stetina R., Detection of MNNG-induced DNA lesions in mammalian cells; validation of comet assay against DNA unwinding technique, alkaline elution of DNA and chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 1997, *383 (3)*, 243-52.

Smith R. H., Koepke S. R., Tondeur J., Denlinger C. L., Michejda C. J., The methanediazonium ion in water: competition between hydrolysis and proton exchange. *J. Chem. Soc.* 1988, *1985*, 936-7.

Sobel W., Bond G. G., Parsons T. W., Brenner F. E., Acrylamide cohort mortality study. *Br. J. Int. Med.* 1986, *43*, 785-8.

Solomon J. J., Fedyk J., Mukai F., Segal A., Direct alkylation of 2'-deoxynucleosides and DNA following in vitro reaction with acrylamide. *Cancer Res.* 1985, *45 (8)*, 3465-70.

Speit G., Hanelt S., Helbig R., Seidel A., Hartmann A., Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. *Toxicol. Lett.* 1996, *88 (1-3)*, 91-8.

Srivenugopal K. S., Yuan X. H., Friedman H. S., Ali-Osman F., Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochemistry* 1996, *35 (4)*, 1328-34.

Stadler R. H., Blank I., Varga N., Robert F., Hau J., Guy P. A., Robert M. C., Riediker S., Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 2002, *419 (6906)*, 449-50.

Sterzel W., Eisenbrand G., N-nitrosodiethanolamine is activated in the rat to an ultimate genotoxic metabolite by sulfotransferase. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1986, *111 (1)*, 20-4.

Stillwell W. G., Xu H. X., Glogowski J., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R., Correa P., Comparison of urinary nitrate, N-nitrosoproline, 7-methylguanine and 3-methyladenine levels in a human population at risk for gastric cancer. *IARC Sci. Publ.* 1991, *105*, 83-7.

Stryer L., Biosynthese der Nucleotide. In: Biochemie, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 2003, 779-802.

Sumner S. C., MacNeela J. P., Fennell T. R., Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1,2,3-13C]acrylamide in rats and mice using 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* 1992, *5 (1)*, 81-9.

Sumner S. C., Selvaraj L., Nauhaus S. K., Fennell T. R, Urinary metabolites from F344 rats and B6C3F1 mice coadministered acrylamide and acrylonitrile for 1 or 5 days. *Chem. Res.Toxicol.* 1997, *10 (10)*, 1152-60.

Sumner S. C., Williams C. C., Snyder R. W., Krol W. L., Asgharian B., Fennell T. R. , Acrylamide: a comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure. *Toxicol. Sci.* 2003, *75 (2)*, 260-70.

Sundberg K., Dreij K., Seidel A., Jernstrom B., Glutathione conjugation and DNA adduct formation of dibenzo[a,l]pyrene and benzo[a]pyrene diol epoxides in V79 cells stably expressing different human glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 2002, *15 (2)*, 170-9.

Suzuki N., Ohashi E., Kolbanovskiy A., Geacintov N. E., Grollman A. P., Ohmori H., Shibutani S., Translesion synthesis by human DNA polymerase kappa on a DNA template containing a single stereoisomer of dG-(+)- or dG-(-)-anti-N(2)-BPDE (7,8-dihydroxy-anti-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene). *Biochemistry* 2002, *41 (19)*, 6100-6.

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 O6-alkylguanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1990, *87 (2)*, 686-90.

Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S., Tornqvist, M., Acrylamide: a cooking carcinogen? *Chem. Res. Toxicol.* 2000, *13 (6)*, 517-22.

Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S., Tornqvist M., Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 2002, *50 (17)*, 4998-5006.

Tice R. R., Andrews P. W., Hirai O., Singh N. P., The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1991, *283*, 157-64.

Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. C., Sasaki Y. F., Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000, *35*, 206-221.

Tong G. C., Cornwell W. K., Means G. E., Reactions of acrylamide with glutathione and serum albumin. *Toxicol. Lett.* 2004, *147 (2)*, 127-31.

Tornqvist M., Bergmark E., Ehrenberg L., Granath F., Risk Assessment of Acrylamide; Report 7/98. Swedish Inspectorate; Solna, Schweden, 1998.

Tornqvist M., Fred C., Haglund J., Helleberg H., Paulsson B., Rydberg P., Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications. *J. Chromatogr. B* 2002, *778*, 279–308.

Tsuda H., Shimizu C. S., Taketomi M. K., Hasegawa M. M., Hamada A., Kawata K. M., Inui N., Acrylamide; induction of DNA damage, chromosomal aberrations and cell transformation without gene mutations. *Mutagenesis* 1993, *8 (1)*, 23-9.

Tsuzuki T., Sakumi K., et al., Targeted disruption of the DNA repair methyltransferase gene renders mice hypersensitive to alkylating agent. *Carcinogenesis* 1996, *17 (6)*, 1215-20.

Tudek, B., Imidazole ring-opened DNA purines and their biological significance. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2003, *36*, 12-9.

Uchida K., Kanematsu M., Morimitsu Y., Osawa T., Noguchi N., Niki E., Acrolein is a product of lipid peroxidation reaction. Formation of free acrolein and its conjugate with lysine residues in oxidized low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 1998, *273 (26)*, 16058-66.

Vesper H. W., Ospina M., Meyers T., Ingham L., Smith A., Gray J. G., Myers G. L., Automated method for measuring globin adducts of acrylamide and glycidamide at optimized Edman reaction conditions. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, *20 (6)*, 959-64.

Wagner D. A., Shuker D. E., Bilmazes C., Obiedzinski M., Young V. R., Tannenbaum S. R., Modulation of endogenous synthesis of N-nitrosamino acids in humans. *IARC Sci. Publ.* 1984, *57*, 223-9.

Wei S. J., Chang R. L., Wong C. Q., Bhachech N., Cui X. X., Hennig E., Yagi H., Sayer J. M., Jerina D. M., Preston B. D., Dose-dependent differences in the profile of mutations induced by an ultimate carcinogen from benzo[a]pyrene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, *88 (24)*, 11227-30.

Wei S. J., Chang R. L., Bhachech N., Cui X. X., Merkler K. A., Wong C. Q., Hennig E., Yagi H., Jerina D. M., Conney A. H., Dose-dependent differences in the profile of mutations induced by (+)-7R,8S-dihydroxy-9S,10R-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene in the coding region of the hypoxanthine (guanine) phosphoribosyltransferase gene in Chinese hamster V-79 cells. *Cancer Res.* 1993, *53 (14)*, 3294-301.

Wei S. J., Chang R. L., Hennig E., Cui X. X., Merkler K. A., Wong C. Q., Yagi H., Jerina D. M., Conney A. H., Mutagenic selectivity at the HPRT locus in V-79 cells: comparison of mutations caused by bay-region benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,-10-epoxide enantiomers with high and low carcinogenic activity. *Carcinogenesis* 1994, *15 (8)*, 1729-35.

Wei S. J., Maher V. M., McCormick J. J., Site-specific rates of excision repair of benzo[a]pyrene diol epoxide adducts in the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene of human fibroblasts: correlation with mutation spectra. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995, *92*, 2204-8.

Wheeler G. P., Bowdon B. J., Comparison of the effects of cysteine upon the decomposition of nitrosoureas and of 1-methyl-3-oitro-1-nitrosoguanidine. *Biochem. Pharmacol.* 1972, *21*, 265-7.

WHO, Health implications of acrylamide in food: Report of a Joint FAO/WHO Consultation, WHO Headquarters, Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002.

Wibley J. E., Pegg A. E., Moody P. C., Crystal structure of the human O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 2000, *28 (2)*, 393-401.

Wilson D. M., 3rd, Barsky D., The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat. Res.* 2001, *485 (4)*, 283-307.

Wood A. W., Chang R. L., Levin W., Yagi H., Thakker D. R., Jerina D. M., Conney A. H., Differences in mutagenicity of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977, *77 (4)*, 1389-96.

Wurdeman R. L., Church K. M., Gold B., DNA methylation by N-methyl-N-nitroso-urea, N-methyl-N-nitroso-N-guanidine, N-nitroso(1-acetoxyethyl)methylamine, and diazomethane: mechanisms of the formation of N7-methylguanine in sequence-characterized 5'-^{32}P-end-labeled DNA. *J. Amer. Chem. Soc.* 1989, *111*, 6408-12.

Yaylayan V. A., Wnorowski A., Perez Locas C., Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* 2003, *51 (6)*, 1753-7.

Yang L. L., Maher V. M., McCormick J. J., Relationship between excision repair and the cytotoxic and mutagenic effect of the anti-7,8-diol-9,10-epoxide of benzo[a]pyrene in human cells. *Mutat. Res.* 1982, *94*, 435-47.

Yarosh D. B., The role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in cell survival, mutagenesis and carcinogenesis. *Mut. Res.* 1985, *145*, 1-16.

Zurlo J., Curphey T. J., Hiley R., Longnecker D., Identification of 7-carboxymethyl-guanine in DNA from pancreatic actinar cells exposed to azaserine. *Cancer Res.* 1982, *42*, 1286-8.

Zyzak D. V., Sanders R. A., Stojanovic M., Tallmadge D. H., Eberhart B. L., Ewald D. K., Gruber D. C., Morsch T. R., Strothers M. A., Rizzi G. P., Villagran, M. D., Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.* 2003, *51 (16)*, 4782-7.

Lebenslauf

Silke Thielen geb. Fritzen
geb. am 30.01.1978 in Bernkastel-Kues
verheiratet

Schulausbildung

08/1984-07/1988	Grundschule Osann-Monzel
08/1988-06/1997	Peter Wust-Gymnasium Wittlich
23.06.1997	Abitur

Studium

10/1997-08/2003	Studium der Diplom-Chemie an der Technischen Universität Kaiserslautern
10/1997-03/2000	Grundstudium
04/2000-08/2003	Hauptstudium
12/2002-08/2003	Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, AK Prof. Dr. G. Eisenbrand: „Prüfung von Apfelinhaltsstoffen auf antioxidative Wirkungen in HT 29 Darmzellen in-vitro“
12.08.2003	Abschluss des Studiengangs Diplom-Chemie
seit 08/2003	Pomotion als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie unter Betreuung durch Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand

Veröffentlichungen und Posterbeiträge

2003

1st International Conference on Polyphenols and Health, Vichy, 18.-21.11.:
S. Schäfer, **S. Fritzen**, M. Baum, G. Eisenbrand, C. Janzowski:
The antioxidative potential of apple juice compounds and apple juice extract on human colon cells.

2004

Regionaltagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Würzburg, 08.-09.03.:

1) S. Schäfer, **S. Fritzen**, M. Baum, H.G. Kamp, H. Dietrich, F. Will, F.W. Albert, T. Nesbigall, G. Eisenbrand, C. Janzowski:
   Das antioxidative Potenzial von Apfelsaftinhaltsstoffen und Apfelsaftextrakt in humanen Kolonzellen.
   Lebensmittelchemie 2004, 58, 123.
2) P. Mertes, **S. Fritzen**, M. Baum, G. Eisenbrand:
   Genotoxisches Potential in humanen Lymphozyten und Erzeugung von Mutationen am *hPRT*-Locus in V79-Säugerzellen
   Lebensmittelchemie 2004, 58, 85.

95. Jahrestagung der American Association for Cancer Research, Orlando, USA; 27.-31.03.

1) C. Janzowski, S. Schäfer, **S. Fritzen**, M. Baum, H. Dietrich, G. Eisenbrand: Preventive antioxidative effectiveness of polyphenolic apple juice compounds in human colon cells.
   Proc. Am. Ass. Cancer Res. 2004, 45.
2) M. Baum, E. Fauth, **S. Fritzen**, A. Herrmann, P. Mertes, M. Rudolphi, H. Zankl, G. Eisenbrand:
   Genotoxic and mutagenic properties of acrylamide and glycidamide in human lymphocytes and V79-cells.
   Proc. Am. Ass. Cancer Res. 2004, 45.

2005

M. Baum, E. Fauth, **S. Fritzen**, A. Hermann, P. Mertes, M. Rudolphi, H. Zankl, G. Eisenbrand:
Acrylamide and glycidamide: genotoxic effects in V79-cells and human blood.
Mut. Res. 2005, 580, 61-9.

M. Baum, D. Bertow, E. Fauth, **S. Fritzen**, A. Hermann, P. Mertes, M. Rudolphi, T. Spormann, H. Zankl, G. Eisenbrand:
Acrylamide and glycidamide: Approach towards risk assessment based on biomarker guided dosimetry of genotoxic/mutagenic effects in human blood.
Advances in Experimental Medicine and Biology 2005, 561 (Chemical Safety of Acrylamide in Food), 77-88.

96. Jahrestagung der American Association for Cancer Research, Anaheim, CA, USA; 16.-20.04.
M. Baum, **S. Fritzen**, G. Eisenbrand:
Human blood as model system to investigate genotoxic activity of acrylamide, glycidamide and (±)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide
Proc. Am. Ass. Cancer Res. 2005, 46.

Deutscher Lebensmittelchemikertag 2005 und Euro Food Chem VIII, Hamburg, 19.-23.09.:
S. Fritzen, M. Hoffmann, M. Baum, G. Eisenbrand:
Human blood as a model system to investigate genotoxic activity of acrylamide, glycidamide, (±)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and α-acetoxy-N-nitroso-diethanolamine

Jubiläumssymposium zum 25-jährigen Bestehen des Lehrstuhls Lebensmittelchemie der Universität Würzburg, 14.10.
S. Thielen, M. Baum, M. Hoffmann, R. N. Loeppky, G. Eisenbrand:
Genotoxicity of glycidamide, (±)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and α-acetoxy-N-nitroso-diethanolamine in human blood and V79-cells.

2006

S. Thielen, M. Baum, M. Hoffmann, R. N. Loeppky, G. Eisenbrand:
Genotoxicity of glycidamide in comparison to (±)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and -acetoxy-N-nitroso-diethanolamine in human blood and in mammalian V79-cells.
Mol. Nutr. Food Res. 2006, 50, 430-6.

97. Jahrestagung der American Association for Cancer Research, Washington, D.C., USA; 01.-05.04.
M. Baum, M. Hoffman, **S. Thielen**, R. N. Loeppky, G. Eisenbrand:
Genotoxicity of α-acetoxy-N-nitrosodiethanolamine, 3-nitrosooxazolidinones and methyl-3-nitrosooxazolidinones in human blood and V79-cells.
Proc. Am. Ass. Cancer Res. 2006, 47.

ECNIS-sponsored Workshop on Biomarker of Exposure and Cancer Risk: DNA Damage and DNA Adduct Detection & 6thGUM-32P-Postlabelling Workshop, DKFZ Heidelberg, 29.-30.09.
S. Thielen, M. Baum, M. Hoffmann, R. N. Loeppky, S. Michael, G. Eisenbrand:
Kinetic of induction and disappearance of DNA-strandbreaks and mutations of different alkylating agents: 3-nitrosooxazolidine-2-one (NOZ-2), 3-nitrosooxazolidin-5-one (NOZ-5) and glycidamide using comet-assay and *hPRT*-gene-mutation-assay in V79-cells.

AACR: Frontiers in Cancer Prevention Research, Boston M.A., 12.-15.11.
M. Baum, **S. Thielen**, M. Hoffmann, R. N. Loeppky, S. Michael, G. Eisenbrand:
Kinetic of induction and disappearance of DNA-strandbreaks and mutations of different alkylating agents: 3-nitrosooxazolidine-2-one (NOZ-2), 3-nitrosooxazolidin-5-one (NOZ-5) and glycidamide using comet-assay and *hPRT*-gene-mutation-assay in V79-cells.

2007

Thermal Processing of Food, Potential Health Benefits and Risks;
Senate Commission on Food Safety SKLM (Hrsg.); 1. Auflage, Februar 2007
M. Baum, D. Bertow, E. Fauth, **S. Thielen**, G. Eisenbrand:
An ex-vivo approach to assess low dose effects of acrylamide

Chemistry in Cancer Research: A Vital Partnership, San Diego, Kalifornien, USA, 04.-07.02.
M. Baum, R. N. Loeppky, **S. Thielen**, G. Eisenbrand:
Genotoxicity and *hPRT*-mutagenicity of 3-nitroso-oxazolidinones in comparison to N-(2-hydroxyethyl)-N-nitrosourea and glycidamide in V79 cells

48. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz, 13.-15.03.
S. Thielen, M. Baum, R. N. Loeppky, G. Eisenbrand:
Induction of DNA-strandbreaks and *hPRT*-mutations by 3-N-nitroso-oxazolidinones, N-(2-hydroxyethyl)-N-nitrosourea and the weak mutagen glycidamide in V79 cells

Danke, Danke, Danke….

Noch bevor das erste Wort dieser Arbeit geschrieben war, dachte ich, dass wohl kaum etwas so einfach zu schreiben wäre, wie die nun folgenden Seiten. Inzwischen ist dies allerdings die x-te Version, denn letztendlich ist es zwar nicht schwer zu entscheiden, wem man alles „Danke“ sagen möchte, sondern eben die richtigen Worte dafür zu finden. Denn ehrlich gesagt, haben mir manche so viel Unterstützung und Hilfe entgegengebracht, dass es dafür eigentlich niemals die richtigen und erst recht nicht genügend Worte gibt.

Zu allererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Eisenbrand danken, von dem ich sehr viel lernen durfte und der mit ein strenger, aber auch stets gerechter Doktorvater gewesen ist.

Ebenfalls zu dieser Arbeit beigetragen hat mein Betreuer Dr. M. Baum. Lieber Matthias, auch wenn wir in manchen Dingen nicht immer einer Meinung waren, haben wir letztendlich doch immer einen gemeinsamen Weg gefunden. Danke für Deine Unterstützung, auch in Situationen, die nicht gerade ein Spaziergang gewesen sind.

An dieser Stelle ist nun auch ein Dankeschön an meine Kollegen angebracht, die mich nicht nur unterstützt haben, sondern auch viel zu oft einfach nur ertragen mussten:
…Heike und Ingrid, bei die ich mit allen Sorgen und Problemen immer kommen konnte; die nie müde wurden, mir mit hilfreichen Tipps, Telefonnummern und sonstigen Auskünften weiterzuhelfen und vor allem, die mir manche Planlosigkeit und Unorganisiertheit verziehen und somit auch manche Krise abgewendet haben
…Sylvia, die mir nicht nur als Kollegin besonders wichtig gewesen ist, sondern mit der es auch einfach nett war, über Alltägliches, das immer viel zu kalte Wetter oder die Ungerechtigkeit der Welt zu diskutieren
…Moni vom AK Schrenk, die mir mit viel Geduld die Geheimnisse und Kniffe der Leberperfusion gezeigt hat und die es geschafft hat, eine nicht gerade angenehme Arbeit in einem positiven Licht erscheinen zu lassen
…Vera Fritzinger und Prof. Dr. Zankl, die es mir auch in den für sie ungünstigsten Gelegenheiten nicht verwehrt haben, Blutproben zu bekommen
…allen Blutspendern, die an dieser Stelle leider namentlich unerwähnt bleiben müssen ein ganz herzliches Dankeschön für die Bereitschaft, mir den ein oder anderen Milliliter Blut zu spenden
…Daniel, Jochen, Thomas, Yu, Sandra, Karl-Heinz, Rainer, Eva, Ari, den Kollegen von Bau 56, der SKLM, den Mitarbeitern der Arbeitskreise Marko und Schrenk und allen, die sich hiermit angesprochen fühlen, für Hilfe jedweder Art und manchmal auch einfach nur für einen Kaffee zur richtigen Zeit

Danke, Danke, Danke….

…an die Mitfahrer zu den Tox-Kursen, für viel Spaß und eine willkommene Ablenkung vom Promotionsalltag

Nicht vergessen sein sollen aber auch vor allem die, die durch unermüdliches Engagement und viel Begeisterung auch im praktischen Sinne zu dieser Arbeit beigetragen haben, meine Forschungspraktikanten und Diplomanden: Carsten Bernard, Christine Czauderna, Michelle Hoffmann, Jessica Gopee-Görlitz, Valerie Kappler, Jan Kreutzer, Yvonne Kohl, Michelle Memmer, Sabrina Michael und Julia Scheffler. Es hat mir unglaublichen Spaß gemacht, mit Euch zusammenarbeiten zu können.

Na ja, damit wäre wohl der leichtere Teil des Dankeschöns geschrieben. Alle diejenigen, die jetzt folgen, haben es eigentlich auf eine viel größere Weise verdient, Ihnen Danke zu sagen, als nur auf den letzten Seiten dieser Arbeit zu stehen. Ich hoffe Ihr wisst, wie wichtig Ihr mir alle - nicht nur in den vergangenen Jahren - gewesen seid (und auch noch sein werdet). Deshalb gilt Euch allen, jedem aus ganz unterschiedlichen Gründen, ein ganz besonderer Dank.

Zuerst einmal möchte ich mich bei den wunderbarsten Freunden überhaupt bedanken:
…Silke und Thomas, deren Kraft ich bewundere und die mir selbst soviel Mut gemacht hat. Danke auch für tolle Tage im Schnee, für halsbrecherische Abfahrten und eine immer volle Volvic-Flasche (…)
…Dirk und Tina; den drei besten „Hippen“ der Welt Susi, Pümpfi und Anke; Tom; Schendi; Alex und Wolle; Christoph und Nathalie mit Philip; Sandra und Michael; Ursel und Ralf; Kerstin und Ralf…. Danke, dass Ihr mir immer wieder bewiesen habt, dass es ein Leben außerhalb der Chemie gibt und ich immer ich selbst sein konnte. Einfach Danke, dass Ihr schon seit vielen Jahren so tolle Freunde seid.
…Anita, Christa und Nadine, die schon während meines Studiums immer für mich da gewesen sind und die mir durch leider viel zu seltene E-Mails, Telefonate etc. gezeigt haben, dass man im Leben nicht alles zu ernst nehmen sollte
…Jessi und Hemant, für die gemeinsame Vorfreude auf unseren „schönsten Tag“, für eine schöne, aber viel zu kurze Zeit vereint in der Bewältigung mancher Krise und die netten Mails aus dem fernen England

Ein besonders großes Dankeschön geht allerdings an meine ganze Familie, die mich in den letzten Jahren immer bedingungslos unterstützt hat, stolz auf mich gewesen ist und mir nicht nur dadurch das Gefühl gegeben haben, zu Hause zu sein.

Danke, Danke, Danke….

Jeder von Euch hat auf seine ganz besondere Weise dazu beigetragen, dass nun diese Zeilen hier geschrieben wurden. Um jedem einzelnen für das alles zu danken, was ihr an kleinen und großen Dingen für mich getan habt, müsste ich wahrscheinlich nochmals mehrere Seiten füllen. Bitte verzeiht an dieser Stelle, dass ich dies aufgrund der fortgeschrittenen Seitenzahl nun nicht ausführlich tun werde. Daher sollt ihr einfach nur wissen, dass ich das alles niemals vergessen werde und glücklich bin, ein Teil dieser wunderbaren Familie zu sein.

Allerdings gibt es drei unter Euch, die es ganz besonders verdient haben, hier genannt zu werden:

Ein ganz besonders großes Dankeschön geht an meine Eltern und Sascha, die während der ganzen Zeit immer zu mir gestanden haben und nicht nur in den vergangenen Jahren viel zu oft meine Launen und Sorgen ertragen mussten. Auch wenn es wahrscheinlich nicht immer einfach für Euch gewesen ist, habt Ihr es trotzdem geschafft, auch schwere Stunden erträglich scheinen zu lassen und mir nicht nur dadurch die Kraft gegeben, alles durchzustehen.

Und an Sascha noch ein spezieller Dank: Danke, dass es Dich gibt und Du mich so liebst, wie ich bin. Danke aber auch für das schönste Geschenk überhaupt: Dein „Ja“ zu mir und einem gemeinsamen, wunderschönen Leben.