

Effekte von Inhaltsstoffen traditioneller chinesischer
Lebensmittel, Kaffeeinhaltsstoffen und -kontaminanten auf
die DNA-Integrität und auf die Nrf2/ARE(EpRE)-vermittelte
oxidative Stressantwort

vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern zur
Verleihung des akademischen Grades "Doktor der
Naturwissenschaften" genehmigte

Dissertation

D386

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin

Carmen Melina Haben

Betreuerin der Arbeit: Prof. Dr. Melanie Esselen

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 02. September 2016

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 02. September 2016

Promotionskommission:

Vorsitzender: **Prof. Dr. Werner Thiel**

1. Berichterstatterin: **Prof. Dr. Melanie Esselen**

2. Berichterstatterin: **Prof. Dr. Elke Richling**

Erklärung

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von August 2012 bis Dezember 2014 im Arbeitskreis von Frau Juniorprof. Dr. Melanie Esselen an der Technischen Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie, sowie von Januar 2015 bis Juli 2015 im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Melanie Esselen an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Institut für Lebensmittelchemie.

Frau Prof. Dr. Melanie Esselen danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, sowie für Ihre stetige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung, die das Gelingen meiner Arbeit sehr gefördert hat.

Des Weiteren danke ich Frau Prof. Dr. Elke Richling für die Übernahme des Koreferates sowie für die Unterstützung sowie Herrn Prof. Dr. Werner Thiel für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Für Sebastian und meine Familie

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
KURZFASSUNG	XI
ABSTRACT	XII
1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....	1
2 THEORIE.....	4
2.1 Traditionelle chinesische Lebensmittel	4
2.1.1 Herstellung Jinhua Schinken.....	4
2.1.2 Herstellung Peking Ente	5
2.1.3 Inhaltsstoffe und Aromabildung in Jinhua Schinken und Peking Ente	5
2.1.3.1 Aromabildung (Phasen der Maillard-Reaktion)	5
2.1.3.2 Extraktgewinnung aus den traditionellen chinesischen Lebensmitteln	9
2.1.3.3 Aroma-aktive Verbindungen im Jinhua Schinken	9
2.1.3.4 Aroma-aktive Verbindungen der Peking Ente	11
2.2 Acrylamid.....	12
2.2.1 Vorkommen und Bildung	12
2.2.2 Metabolismus von Acrylamid.....	15
2.2.3 Toxikologie	19
2.2.3.1 Neurotoxizität.....	19
2.2.3.2 Entwicklungs- und Reproduktionstoxizität	19
2.2.3.3 Gentoxizität	20
2.2.3.4 Kanzerogenität	21
2.2.4 Minimierungskonzepte	22

2.2.5	Exposition und Risikobewertung.....	23
2.3	Acrylamid-Niacin-Addukt.....	25
2.4	Trigonellin, <i>N</i>-Methylpyridinium und Niacin	29
2.5	Oxidativer Stress.....	32
2.5.1	Bildung und Abwehr von ROS	32
2.5.2	Der Nrf2 Transkriptionsfaktor	35
2.5.2.1	Regulierung des Nrf2-Signalwegs	36
2.5.2.2	Regulierte Gene und Aktivatoren des Nrf2-Signalwegs	38
2.6	Die DNA	42
2.6.1	Aufbau und Organisation der DNA.....	42
2.6.2	DNA-Schäden.....	44
2.6.3	DNA-Reparaturmechanismen	45
2.6.4	Mutationen	46
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	48
3.1	Zelluläre Wirkungen traditioneller chinesischer Lebensmittel	48
3.1.1	Zytotoxische Eigenschaften.....	48
3.1.1.1	Zellvitalität (Resazurin-Reduktionstest).....	48
3.1.1.2	Wachstumshemmung (Sulforhodamin B Test).....	50
3.1.2	Antioxidative Wirkung gegenüber Menadion-induzierter ROS (modifizierter DCF Test).....	51
3.1.3	Modulation des intrazellulären ROS-Status (DCF Test)	53
3.1.4	Gentoxische Eigenschaften (Comet Assay)	55
3.1.5	Mutagene Wirkungen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)-Test.....	57
3.1.6	Einfluss auf die Genexpression von Nrf2 und Phase II Enzyme (QT-PCR)	58
3.1.7	Diskussion der zellulären Effekte von Extrakten traditioneller chinesischer Lebensmittel	64
3.2	Entstehung und zelluläre Wirkungen eines Acrylamid-Niacin-Addukts	70
3.2.1	Synthesen	70
3.2.1.1	Acrylamid-Niacin-Addukt (ANA)	70
3.2.1.2	Deuteriertes Acrylamid-Niacin-Addukt (ANA-d ₃)	71
3.2.1.3	<i>N</i> -Propanamidpyridinium (PAP)	71
3.2.2	Methodenentwicklung und -etablierung zur Bestimmung von ANA in Kaffeebohnen.....	72
3.2.2.1	Methodenentwicklung	72
3.2.2.2	Optimierung der gerätespezifischen Parameter	75
3.2.2.3	Entstehung von ANA während der Kaffeeröstung.....	76

3.2.3	Zytotoxische Eigenschaften.....	79
3.2.3.1	Zellvitalität (Resazurin-Reduktionstest).....	79
3.2.3.2	Wachstumshemmung.....	82
3.2.4	Modulation des intrazellulären ROS-Levels (prooxidativer DCF Test).....	84
3.2.5	Genotoxische Wirkungen (Comet Assay)	86
3.2.6	Einfluss auf die Genexpression von Nrf2 und Phase II Enzyme (QT-PCR)	91
3.2.7	Einfluss auf die Nrf2 Translokation in den Zellkern.....	95
3.2.8	Diskussion.....	97
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	114
5	MATERIAL UND METHODEN.....	117
5.1	Synthesen	117
5.2	LC/MS-Analyse.....	117
5.3	Zellkultivierung	117
5.3.1	HT29 Zelllinie.....	117
5.3.2	Mediumwechsel	117
5.3.3	Subkultivierung (Passagieren)	118
5.3.4	Einfrieren der Zellen.....	118
5.3.5	Auftauen der Zellen.....	118
5.3.6	Bestimmung der Zellzahl und Viabilität mittels Trypanblau-Ausschlusstest.....	118
5.4	Verwendete <i>in vitro</i> Testsysteme.....	120
5.4.1	Aussaat von Zellen.....	120
5.4.2	Inkubationslösungen von Inhaltsstoffen und Lebensmittelmodellverbindungen	122
5.4.3	Inkubationslösungen der Extrakte aus Peking Ente und Jinhua Schinken	122
5.4.4	Untersuchungen zur Zytotoxizität mittels Resazurin-Reduktionstest.....	123
5.4.5	Untersuchungen zur Zytotoxizität mittels SRB Test	124
5.4.6	ROS-Induktion mittels Dichlorfluorescein (DCF) Test.....	125
5.4.7	Untersuchungen zur DNA-Schädigung mittels Comet Assay	128
5.4.8	Untersuchungen zur Mutagenität mittels HPRT Test.....	131
5.4.9	Western Blot-Analyse.....	134
5.4.9.1	Proteingewinnung	134
5.4.9.2	Proteinbestimmung nach Bradford	135
5.4.9.3	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	135
5.4.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	139
5.4.10.1	Zellaussaat und Inkubation.....	139

5.4.10.2	RNA Isolation	139
5.4.10.3	cDNA Synthese	140
5.4.10.4	QT-PCR.....	141
5.5	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien & Geräte	142
LITERATURVERZEICHNIS		XIII
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG		XXIII
CURRICULUM VITAE.....		XXIV

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Entstehung von Amadori- bzw. Heyns-Verbindungen nach Mottram (2007).....	6
Abbildung 2 Bildung der Desoxyosone durch Enolisierung am Beispiel der Amadori-Verbindung nach Mottram (2007).....	7
Abbildung 3 Entstehung von Strecker-Aldehyden, Aminoketonen und Pyrazinen nach Mottram (2007).....	8
Abbildung 4 Strukturformel Acrylamid	12
Abbildung 5 Bildungsmechanismus von Acrylamid nach Zyzak <i>et al.</i> , (2003).....	13
Abbildung 6 Übersicht zum Metabolismus von Acrylamid (grün: Entgiftung; rot: Giftung) in Anlehnung an Boettcher und Angerer (2005) und Watzek (2012).....	18
Abbildung 7 Reduktion der Acrylamid-Bildung in zwei unterschiedlichen Modellsystemen durch die Positivkontrolle Cystein (Cys) und Vitamine	26
Abbildung 8 Reduktion der Acrylamid-Bildung in frittierten Kartoffelstreifen durch die Positivkontrolle Cystein und Vitamine.....	27
Abbildung 9 Acrylamid-Niacin-Addukt (ANA), <i>N</i> -Propanamid-3-carboxypyridinium.....	28
Abbildung 10 Thermischer Abbau von Trigonellin während der Kaffeeröstung.....	30
Abbildung 11 Unterschiedliche Möglichkeiten zur Entstehung verschiedener ROS, Schädigungen (rot) und Abwehrmechanismen (grün).....	33
Abbildung 12 Biosynthese des Tripeptids Glutathion.....	34
Abbildung 13 Aufbau des Transkriptionsfaktors Nrf2 mit seinen 6 Neh Domänen	35
Abbildung 14 Regulation der Nrf2-vermittelten Genexpression antioxidativer bzw. entgiftender Enzyme als Antwort auf oxidativen Stress.....	37
Abbildung 15 Die DNA-Basen Adenin, Guanin, Cytosin	42
Abbildung 16 Der chemische Aufbau eines kleinen Abschnitts aus einem DNA-Einzelstrang (links) und die DNA-Doppelhelix in schematischer Darstellung mit kleiner und großer Furche (rechts) [Karp, 2005]	43
Abbildung 17 Untersuchungen zur Zellvitalität in HT29 Zellen nach 1 bzw. 24 h Inkubation mit Extrakt JS, F1, F2 und F3 (A) bzw. mit Extrakt PE, F4, F5 und F6 (B)	49
Abbildung 18 Untersuchungen zur Wachstumshemmung in HT29 Zellen nach 24 bzw. 72 h Inkubation mit dem Gesamtextrakt JS (braun) bzw. mit dem Gesamtextrakt PE (gelb).....	51
Abbildung 19 Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung des Gesamtextrakts JS sowie F1, F2 und F3 (A) und des Gesamtextrakts PE und der F5 (B)	53
Abbildung 20 Untersuchungen zur ROS-Entstehung des Gesamtextrakts JS (A) bzw. PE (B).....	55
Abbildung 21 DNA-schädigende Wirkung des Gesamtextrakts JS (A) und PE (B).	57
Abbildung 22 Bestimmung der mutagenen Eigenschaften des Extrakts JS (A) bzw. PE (B)	58
Abbildung 23 Modulation der relativen Transkription nach der 3 h Inkubation mit dem Extrakt JS (A) bzw. PE (B) sowie nach der 24 h Inkubation mit Extrakt JS (C) bzw. PE (D)	61
Abbildung 24 Modulation der relativen Transkription nach 3 bzw. 24 h Inkubation mit Pyrazin (A bzw. B), 2-Methylpyrazin (C bzw. D) und 2,6-Dimethylpyrazin (E bzw. F)	63
Abbildung 25 Synthese ANA in Anlehnung an Zeng <i>et al.</i> (2010)	70
Abbildung 26 Synthese ANA-D ₃	71
Abbildung 27 Synthese <i>N</i> -Propanamidpyridinium (PAP)	71
Abbildung 28 Repräsentatives HPLC-MS-Chromatogramm einer Messung von ANA.....	74

Abbildung 29 Kalibriergerade zur Quantifizierung von ANA	76
Abbildung 30 ANA-Gehalt [ng/ml] der vordotierten Arabica Gerüstbohnen im Trockenschrank.	77
Abbildung 31 ANA-Gehalt [ng/ml] in Kleinproben der Sorte Washed Yirgacheffe-2.	78
Abbildung 32 Untersuchungen zur Zellvitalität in HT29 Zellen nach 1 bzw. 24 h Inkubation mit NMP bzw. Trigonellin (A), Niacin bzw. AA (B) und ANA bzw. PAP (C).....	81
Abbildung 33 Untersuchungen zur Zellvitalität in V79 Zellen nach 1 bzw. 24 h Inkubation mit ANA im Konzentrationsbereich von 1 μ M bis 1000 μ M sowie AA (6 mM) \pm BSO (500 μ M)).	82
Abbildung 34 Untersuchungen zur Wachstumshemmung in HT29 Zellen nach 24 bzw. 72 h Inkubation mit ANA bzw. PAP.....	84
Abbildung 35 Untersuchungen zur ROS-Entstehung nach Inkubation mit NMP bzw. Trigonellin (A), Niacin bzw. AA (B) und ANA bzw. PAP (C).	85
Abbildung 36 DNA-schädigende Wirkung nach 1 h Inkubation mit NMP bzw. Trigonellin (A), Niacin bzw. AA (B) und ANA bzw. PAP (C).	88
Abbildung 37 DNA-schädigende Wirkung nach 24 h Inkubation mit NMP bzw. Trigonellin (A), Niacin bzw. AA (B) sowie ANA bzw. PAP (C).....	89
Abbildung 38 DNA-schädigende Wirkung nach 1 bzw. 24 h Inkubation mit ANA.....	91
Abbildung 39 Modulation der relativen Transkription nach Inkubation mit ANA nach 3 h (A) bzw. 24 h Inkubationszeit (B) sowie mit PAP nach 3 h (C) bzw. 24 h Inkubationszeit (D).	93
Abbildung 40 Modulation der relativen Transkription nach Inkubation mit ANA (A), PAP (B), AA (C) bzw. NMP (D)	94
Abbildung 41 Modulation des nukleären Nrf2-Proteinlevels nach 3 h Inkubation mit ANA, PAP, AA bzw. NMP..	96
Abbildung 42 Aufbau (links) und Zählweise (rechts) der Neubauer-Zählkammer]	119
Abbildung 43 Reduktion von Resazurin zu Resorufin	123
Abbildung 44 Strukturformel Sulforhodamin B	124
Abbildung 45 Schema DCF	126
Abbildung 46 Beispiel einer ungeschädigten Zelle (links) und einer stark geschädigten Zelle (rechts).	128
Abbildung 47 Prinzip des HPRT Assays.....	132
Abbildung 48 Aufbau einer Gel-Membran-Kassette	137
Abbildung 49 Luminol Reaktion	138

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Inhaltsstoffe des Gesamtextrakts aus JS mittels GC/MS-Analyse [Persönliche Mitteilung, Prof. Zhou]	10
Tabelle 2 Inhaltsstoffe des Gesamtextrakts aus PE mittels GC/MS-Analyse [Zhou <i>et al.</i> , 2015; *Persönliche Mitteilung, Prof. Zhou]	11
Tabelle 3 Mittlere Acrylamid-Gehalte in ausgewählten Lebensmittelgruppen [BfR, 2011]	14
Tabelle 4 Berechnung des MOE von Acrylamid [BfR, 2011]	25
Tabelle 5 Einteilung der ARE-Induktoren nach ihrer Herkunft [Ma und He, 2012]	41
Tabelle 6 Arten von Substanz-induzierten DNA-Schäden mit Beispielen [Vohr, 2010]	44
Tabelle 7 Zusammenfassung der Ergebnisse der Extrakte JS bzw. PE in HT29 Zellen	69
Tabelle 8 Verwendete Testsäulen	72
Tabelle 9 Übersicht der HPLC-Bedingungen zur Bestimmung von ANA	73
Tabelle 10 Pumpengradient	73
Tabelle 11 Parameter Massenspektrometer	75
Tabelle 12 Konzentration, Peakflächen und Quotienten der Peakflächen der Kalibrierreihe	76
Tabelle 13 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Zytotoxizität, Genotoxizität und Induktion von ROS durch ANA, PAP, AA, Niacin, NMP bzw. Trigonellin (Trig) in HT29 Zellen	108
Tabelle 14 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Erhöhung der Genexpression durch ANA, PAP, AA und NMP in HT29 Zellen	111
Tabelle 15 Schema Zellzahlen und Zellkulturgefäße der unterschiedlichen Tests	121
Tabelle 16 Rezept für Sammel- bzw. Trenngel	136

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
A	Ampere
A.D.	anno domini
AA	Acrylamid
AAMA	N-acetyl-S-(2-carbamoylethyl)cystein
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ALARA	as low as reasonably achievable
ANA	Acrylamid-Niacin-Addukt
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	Antioxidatives Response Element
ATP	Adenosintriphosphat
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bidest.	bidestilliert
BMDL	Benchmark Dose Lower Confidence Limit
BSA	Bovines Serumalbumin
BSO	Buthioninsulfoximin
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
CNC	Cap`n`Collar
Da	Dalton
DCF	Dichlorfluorescein
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxynukleinsäure
DPP	Dipeptidylpeptidasen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N',N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FI	Fluoreszenzintensität
FKS	Fetales Kälberserum

FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
g	Gramm
GA	Glycidamid
GAMA	<i>N</i> -(<i>R/S</i>)-Acetyl- <i>S</i> -(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)- <i>L</i> -Cystein
GC	Gaschromatographie
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GST	Glutathion- <i>S</i> -Transferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HO-1	Hämoxygenase 1
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Meerrettichperoxidase
i.p.	intraperitoneal
IARC	International Agency for Research on Cancer
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
JS	Jinhua Schinken
Kap.	Kapitel
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
L	Liter
LC	Flüssigkeitschromatographie
LMA	low melting agarose
m	Milli
M	Molar
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MNNG	<i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin
MOE	Margin of Exposure
MRP	Maillard-Reaktions-Produkte
MS	Massenspektrometer
MW	Mittelwert
n	Nano
NADP	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NEH	<i>Nrf2-ECH homology</i>
NMA	normal melting agarose

N-Medium	Normalmedium
NMP	N-Methylpyridinium
NOAEL	No observed adverse effect level
NOEL	No observed effect level
NQO1	NADP(H)-Chinonoxidoreduktase 1
Nrf2	Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2
NTP	National Toxicology Program
NVS	Nationale Verzehrsstudie
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
OT	Objekträger
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAP	N-Propanamidpyridinium
PBS	Phosphat buffered saline
PE	Peking Ente
pH	Negativer, dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität
QT-PCR	Quatitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion
rel.	Relativ
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRB	Sulforhodamin B
T/C	Test over control
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidative Capacity
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	6-Thioguanin
TI	Tail Intensity
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
u. a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
V	Volt
WHO	World Health Organization
z. B.	Zum Beispiel
γ-GCL	γ-Glutamyl-Cysteinilgase

Kurzfassung

Während der Maillard-Reaktion entsteht eine Vielzahl an Verbindungen, die neben antioxidativen oder antikanzerogenen Effekten auch adverse Eigenschaften aufweisen können. Das Ziel dieser Arbeit war daher zum einen die Charakterisierung der zellulären Effekte von Lebensmittelextrakten aus den traditionellen chinesischen Lebensmitteln Peking Ente (PE) und Jinhua Schinken (JS). In den Extrakten JS und PE konnten u. a. die Lebensmittelkontaminante Acrylamid (AA) identifiziert werden. Das B-Vitamin Niacin führte in Lebensmittelsystemen bereits zu einer Reduktion des AA-Gehalts unter Entstehung eines Acrylamid-Niacin-Addukts (ANA). Da die Reaktionspartner AA und Niacin natürlicherweise während der Kaffeeröstung entstehen, wurde die Hypothese formuliert, dass auch ANA während der Kaffeeröstung gebildet werden könnte. Dies konnte mittels LC/MS-Analyse bestätigt werden. Somit liegt eine Aufnahme von ANA über Kaffee im Rahmen des Möglichen und eine Niacin-Supplementierung könnte sich als effektive Möglichkeit erweisen, um den AA-Gehalt bei der Zubereitung von Lebensmitteln zu senken. Bevor jedoch diese Methode in Betracht gezogen werden kann, ist ein Nachweis der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von ANA insbesondere im Vergleich zu AA notwendig. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu *N*-Methylpyridinium (NMP), einem möglichen Nrf2-Aktivator, wurde angenommen, dass ANA ebenfalls den Nrf2/ARE-Signalweg aktivieren könnte. Der Schwerpunkt der Untersuchungen in HT29 Zellen wurde dabei auf Zytotoxizität, pro- und antioxidative Eigenschaften, Genotoxizität und Beeinflussung des Nrf2-Signalwegs gelegt. JS zeigte in den verwendeten Testsystemen kaum zelluläre Wirkungen, mit Ausnahme der schwachen DNA-schädigenden Wirkung und des stärkeren Effekts auf die UGT1A1-Transkription, die jedoch keine Schutzwirkung gegenüber eines Menadion-induzierten oxidativen Stresses gezeigt hatte. PE induzierte (oxidative) DNA-Schäden und ROS, in dessen Folge vermutlich die Erhöhung des redoxsensitiven Gens UGT1A1 sowie die Hemmung der Zellproliferation zu erklären ist. Eine Beeinflussung des Nrf2-Signalwegs sowie eine antioxidative Wirkung konnte nach Inkubation mit ANA nicht beobachtet werden. Jedoch führte die Bindung von AA an das B-Vitamin Niacin zu einem Addukt mit verminderten DNA-schädigenden und zytotoxischen Eigenschaften im Vergleich zu AA.

Abstract

Due to the Maillard reaction many compounds are generated, that may possess antioxidative or anticarcinogenic activities as well as toxicity. The aim of this study was the characterization of cellular activities of food extracts from traditional Chinese foods such as Peking duck (PE) and Jinhua ham (JS). In these food extracts the food contaminant acrylamide (AA) has been identified. However, the B-vitamin niacin represents a possibility to reduce AA levels in food by vitamin-binding forming an acrylamide-niacin-adduct (ANA). Niacin as well as AA were generated during roasting of coffee, so the formation of ANA in coffee beans during the heating process could be suggest. The generation of ANA during coffee roasting has been approved by LC/MS-analysis. Therefore, intake of ANA is possible and a supplementation with niacin could prove an effective possibility to reduce the AA-content in food during preparation. Before considering this possibility, studies are necessary to demonstrate the safety of ANA especially in comparison to AA. Due to the structural similarity to *N*-methylpyridinium (NMP), a well known Nrf2 activator, ANA was expected to activate the Nrf2-signaling pathway, too. Investigations were performed in HT29 cells with a special emphasis on cytotoxicity, anti- and prooxidative effects, genotoxicity and the impact on Nrf2/ARE signaling pathway. In the used test systems, JS hardly showed cellular effects, with the exception of a slight DNA-damaging potential and a stronger effect on the UGT1A1-gene expression, which did not lead to a protection against a menadione-induced oxidative stress. PE increased the level of intracellular ROS as well as the number of (oxidative) DNA-strand breaks. Subsequently a significant increase of the transcription level of UGT1A1 and a strong inhibition of the cell proliferation were observed. Nor a modulation of the Nrf2/ARE signaling pathway neither an antioxidative effect could be determined after a treatment with ANA. However, the binding of AA to the B-vitamin niacin led to an adduct devoid of cytotoxic and DNA-damaging properties, suggesting a potential way to decrease the *in vitro* genotoxicity of AA.

1 Einleitung und Problemstellung

Seit der Entdeckung des Feuers gilt die thermische Zubereitung als die häufigste Zubereitungsart von Nahrungsmitteln. Das Erhitzen der Nahrung hat nicht nur einen positiven Einfluss auf Geruch und Geschmack, sondern verbessert auch die Qualität sowie die Verdaulichkeit der Lebensmittel und verlängert deren Haltbarkeit im Vergleich zum Rohmaterial. Die sogenannte Maillard-Reaktion ist für die Bildung des Aromas und die Bräunungsreaktion während des Bratens, Backens, Röstens oder Frittierens im Lebensmittel verantwortlich und wurde nach ihrem Entdecker, dem französischen Mediziner und Chemiker Louis Camille Maillard benannt. Sie ist ein komplexes Netzwerk aus vielen Reaktionen [Tuohy *et al.*, 2006], die hauptsächlich bei der thermischen Zubereitung ab 140 °C verschiedener Lebensmittel abläuft [Somoza, 2005] und in drei Phasen eingeteilt werden kann. Bestimmte Verbindungen wie z. B. die im Endstadium der Maillard-Reaktion entstehenden Melanoidine haben dabei nicht nur einen charakteristischen Einfluss auf das Aroma sondern können auch antioxidative sowie antikanzerogene Effekte besitzen, wie sie bereits in der Literatur für Melanoidine aus Lebensmittelmodellen, Malz oder Kaffee beschrieben wurden [del Castillo *et al.*, 2002; Faist *et al.*, 2004; Marko *et al.*, 2002; Marko *et al.*, 2003]. Einer der antioxidativen Mechanismen der Zelle, der bei der Abwehr von oxidativem Stress eine Rolle spielt, ist der Nrf2-Signalweg. Der *Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2* (Nrf2) ist ein Transkriptionsfaktor, der nach Aktivierung in den Zellkern transloziert und als Heterodimer an das antioxidativ responsive Element (ARE) von redoxsensitiven Phase II Genen bindet, wie z. B. von γ -Glutamyl-Cysteinylgase (γ -GCL), UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) oder Glutathion-S-Transferasen (GST) [Itoh *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003; Ma und He, 2012]. Von oxidativem Stress spricht man, wenn sich das Gleichgewicht zwischen der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und den Abwehrmechanismen zugunsten der ROS-Entstehung verschiebt. Da der Mensch nicht nur durch exogene Faktoren (z. B. Umwelteinflüsse, UV-Licht) sondern auch durch endogene Faktoren (Cytochrom P450 Familie) permanent diesen Faktoren ausgesetzt ist, wird die Nachfrage nach Antioxidantien und deren Wirkungsweise immer größer. Untersuchungen von Boettler *et al.* (2010) und Somoza *et al.* (2003) lieferten bereits Hinweise auf eine Aktivierung des Nrf2-Signalweges und somit auf eine antioxidative Schutzwirkung durch bestimmte Kaffeeinhaltsstoffe, insbesondere auch durch *N*-Methylpyridinium (NMP). Neben den gesundheitsfördernden Stoffen entstehen im Zuge der Maillard-Reaktion auch Verbindungen, wie beispielsweise AA oder heterozyklische aromatische Amine, die adverse

Effekte zur Folge haben. So wurde AA aufgrund seiner neurotoxischen, entwicklungs- und reproduktionstoxischen sowie gentoxischen und kanzerogenen Wirkungen im Tierversuch durch die „*International Agency for Research on Cancer*“ (IARC) bereits als mögliches Humankanzerogen in Gruppe 2A eingestuft [Ghanayem *et al.*, 2005; IARC, 1994]. Die Gehalte von AA in Lebensmitteln konnten zwar in der Vergangenheit durch Minimierungsmaßnahmen reduziert werden, allerdings besteht nach wie vor insbesondere aufgrund der gentoxischen Wirkungen Handlungsbedarf.

Im ersten Teilprojekt dieser Arbeit ging es daher im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Zhou (School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology) um traditionelle, chinesische Lebensmittelextrakte JS und PE, die vor allem auf mögliche antioxidative aber auch adverse Eigenschaften hin untersucht werden sollten. Aufgrund der Komplexität der Maillard-Reaktion entsteht eine Vielzahl an Verbindungen, über die insbesondere im Fall der traditionellen chinesischen Lebensmittel JS und PE die Datenlage sehr begrenzt ist. Ebenfalls fehlen Kenntnisse über physiologische bzw. zelluläre Eigenschaften dieser thermischen Reaktionsprodukte. Die potentiell antioxidativ-wirkenden Fraktionen sollten daher ermittelt werden, um weitere Kenntnisse über die verantwortlichen Inhaltsstoffe zu erhalten. Ebenso sollten die Extrakte auf potentielle Lebensmittelkontaminanten, wie z. B. AA und 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) untersucht werden. Die vom chinesischen Kooperationspartner hergestellten Extrakte und deren Unterfraktionen wurden daher im Rahmen dieser Arbeit in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 auf ihr zytotoxisches, antioxidatives bzw. oxidatives Potential, auf ihren Einfluss auf den Nrf2/ARE-Signalweg sowie auf ihre gentoxischen und mutagenen Eigenschaften untersucht, um anschließend die gewonnenen Erkenntnisse in eine Nutzen-Risikoabschätzung der traditionellen Lebensmittel einzubeziehen.

Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit stand AA im Mittelpunkt. Als gentoxisches Kanzerogen unterliegt AA jedoch dem *as low as reasonably achievable (ALARA)* - Prinzip, das besagt, dass der Gehalt in Lebensmitteln so gering wie technologisch möglich gehalten werden soll [BfR, 2005]. Es gibt bereits notwendige Minimierungsmaßnahmen, wie z. B. die sogenannte „*Acrylamide Toolbox*“, die vom europäischen Ernährungsverband FoodDrinkEurope im Jahr 2011 entwickelt wurde und Maßnahmen und Ansatzpunkte zur AA-Reduktion zur Verfügung stellt [FoodDrinkEurope, 2011]. Ein weiteres Konzept zur Senkung der AA-Gehalte ist das Signalwertkonzept, das im Jahr 2002 zwischen dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit und den Ländern, der Wirtschaft und dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz abgestimmt wurde, um eine stufenweise aber stetige Absenkung des AA-Gehalts im Lebensmittel zu

bewirken. Viele dieser Konzepte sind entweder mit hohem technologischem Aufwand oder mit hohen Kosten verbunden. Daher ist es nötig, weitere geeignete Maßnahmen zur AA-Reduktion zu entwickeln. Im Rahmen einer Untersuchung von Zeng *et al.* (2009) konnte das B-Vitamin Niacin identifiziert werden, welches in Modell- und Lebensmittelsystemen den AA-Gehalt unter Entstehung eines Acrylamid-Niacin-Addukts (ANA) verringern konnte. Eine Niacin-Supplementierung könnte sich demnach als effektive Möglichkeit erweisen, um den AA-Gehalt bei der Herstellung und Zubereitung von Lebensmitteln zu senken. Bevor jedoch diese Methode in Betracht gezogen werden kann, ist ein Nachweis der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von ANA notwendig. Da die Reaktionspartner bzw. die Edukte AA und Niacin natürlicherweise während der Kaffeeröstung entstehen [Adrian und Frangne, 1991; Bagdonaite *et al.*, 2008], wurde die Hypothese formuliert, dass ANA während der Kaffeeröstung gebildet werden könnte. Im zweiten Teilprojekt sollte daher die Entstehung von ANA während der Kaffeeröstung mittels LC/MS-Analyse untersucht werden. In Kaffee kommen weitere zu ANA (*N*-Propanamid-3-carboxypyridinium) strukturell ähnliche Pyridinium-Verbindungen vor, wie beispielsweise NMP und Trigonellin (*N*-Methyl-3-carboxypyridinium). Untersuchungen von Somoza *et al.* (2003) und Boettler *et al.* (2011) lieferten Hinweise, dass NMP ein möglicher Aktivator des Nrf2-Signalwegs sein könnte. Aus diesem Grund wurden ANA sowie die decarboxylierte Form *N*-Propanamidpyridinium (PAP) synthetisiert. Es wurde die Hypothese formuliert, dass auch ANA und PAP strukturell bedingt in der Lage sein könnten, den Nrf2-Signalweg zu aktivieren. Die synthetisierten Stoffe ANA und PAP sowie die bereits bekannten Kaffeeinhaltsstoffe AA, Niacin, NMP und Trigonellin wurden analog den Extrakten JS und PE untersucht. Zusätzlich wurden die Untersuchungen in HT29 Zellen mit verringerter antioxidativer Abwehr, in Folge einer GSH-Depletion untersucht, um Anhaltspunkte zu den Wirkungen der Stoffe im gestressten Zustand der Zelle erhalten zu können.

2 Theorie

2.1 Traditionelle chinesische Lebensmittel

Die vorliegende Doktorarbeit wurde vom Deutsch-Chinesischen Zentrum für Wissenschaftsförderung im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Arbeitsgruppe von Prof. Zhou (School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology) finanziert. Das erste Teilprojekt dieser Arbeit bestand aus den Untersuchungen von Lebensmittelextrakten, die vom Kooperationspartner aus den beiden traditionellen chinesischen Lebensmitteln JS und PE zur Verfügung gestellt wurden.

2.1.1 Herstellung Jinhua Schinken

Jinhua Schinken ist ein luftgetrocknetes, traditionelles chinesisches Lebensmittel aus der Stadt Jinhua, die in der Provinz Zhejiang im Osten Chinas liegt. Die ersten schriftlichen Hinweise auf die traditionelle Herstellung des Schinkens sind rund 1100 Jahre alt und stammen aus der Tang Dynastie (A.D. 618 - 907). Die Zubereitung des Schinkens dauert nach dem traditionellen Herstellungsprozess bis zur vollständigen Reifung acht bis zehn Monate und es werden dafür die Hinterkeulen des *Liangtouwu*-Schweins benötigt. Die traditionelle Art der Herstellung beruht auf den verschiedenen Temperaturphasen während dieser Monate. Diese speziellen Bedingungen sind durch die geographische Lage und das Klima in der Provinz Zhejiang gegeben. Die Zubereitung beginnt im Winter, wenn die Temperaturen noch unter 10 °C liegen. Der Prozess gliedert sich anschließend in sechs Phasen: Vorbereiten, Salzen, Waschen, Trocknen, Reifen und Nachreifen. Zu Beginn werden die Hinterkeulen zugeschnitten und von Fett, Häuten und Sehnen befreit. Danach werden die Keulen gesalzen, wobei Temperatur und Luftfeuchtigkeit eine große Rolle spielen. Die Temperatur sollte zwischen 5 und 10 °C liegen und die Luftfeuchtigkeit sollte zwischen 75 und 85 % betragen. Dieser Prozess dauert bis zu 30 Tage, wobei der Schinken während dieser Zeit fünf bis sieben Mal mit Salz eingerieben wird. Danach wird er für vier bis sechs Stunden in Wasser eingeweicht, um überschüssiges Salz sowie Schmutz zu entfernen. In frischem Wasser wird das Fleisch erneut für 16 bis 18 h eingeweicht. Im Anschluss wird der Schinken hängend in der Sonne getrocknet bis es zur Abscheidung von flüssigem Fett kommt. Dies geschieht in der Regel nach etwa sieben Sonnentagen. Im Anschluss folgt die lange Reifephase von sechs bis acht Monaten, in welcher der einzigartige Geschmack und das Aroma durch den Abbau und die Umwandlung von Fett und Muskelfleisch in Peptide,

freie Aminosäuren und freie Fettsäuren entstehen. Für diesen Prozess ist eine stete Erhöhung der Temperatur von 15 auf 37 °C und eine Luftfeuchtigkeit von 55 bis 75 % wichtig. Im letzten Schritt erfolgt die Nachreifung, in der der Schinken durch Bürsten gereinigt und dann mit einer dünnen Schicht Pflanzenöl eingerieben wird. Dies soll vorbeugend gegen eine erhöhte Fettoxidation wirken und das Muskelfleisch weicher machen. Die Nachreifung, in welcher das Aroma stabilisiert und intensiviert werden soll, dauert in der Regel zwei Monate. Der traditionell hergestellte Jinhua Schinken ist somit ein sehr zeit- und arbeitsintensives Produkt, das jedoch jahrelang gelagert werden kann und in China eine sehr beliebte Schinkenspezialität ist [Huan *et al.*, 2005].

2.1.2 Herstellung Peking Ente

Die Peking Ente ist eine der bekanntesten chinesischen Spezialitäten, die ebenso wie der Jinhua Schinken über eine lange Tradition verfügt. Seit rund 140 Jahren gibt es für die aufwändige Zubereitung der Peking Ente ein Standardverfahren. Die Ente wird gerupft und über einen kleinen Schnitt am Hals mit Luft aufgeblasen, damit sich die Haut vom Fleisch trennen kann. Anschließend werden die Innereien über einen kleinen Schnitt unterhalb des Flügels entnommen und die Füße abgeschnitten. Die Ente wird am Hals aufgehängt und mit heißem Wasser überbrüht, dann gewürzt und mit in heißem Wasser gelösten Honig und Malzzucker bestrichen und für mehrere Stunden getrocknet. Die so vorbereitete Peking Ente wird in speziellen Öfen für rund 60 min bei 230 °C hängend gegart. Währenddessen wird die Haut sehr knusprig und nimmt die rot glänzende Farbe sowie den typischen Geschmack an [Chen *et al.*, 2009].

2.1.3 Inhaltsstoffe und Aromabildung in Jinhua Schinken und Peking Ente

2.1.3.1 Aromabildung (Phasen der Maillard-Reaktion)

Die Maillard-Reaktion ist ein komplexes Netzwerk aus vielen Reaktionen [Tuohy *et al.*, 2006], die hauptsächlich bei der thermischen Zubereitung ab 140 °C verschiedener Lebensmittel abläuft und verantwortlich für die Bildung der charakteristischen Aromen und Farben in Lebensmitteln ist [Somoza, 2005]. Die Maillard-Reaktion kann in drei Phasen eingeteilt werden. Da die Reaktionen sehr komplex sind, sind die Übergänge zwischen den Phasen jedoch fließend [Hodge, 1953].

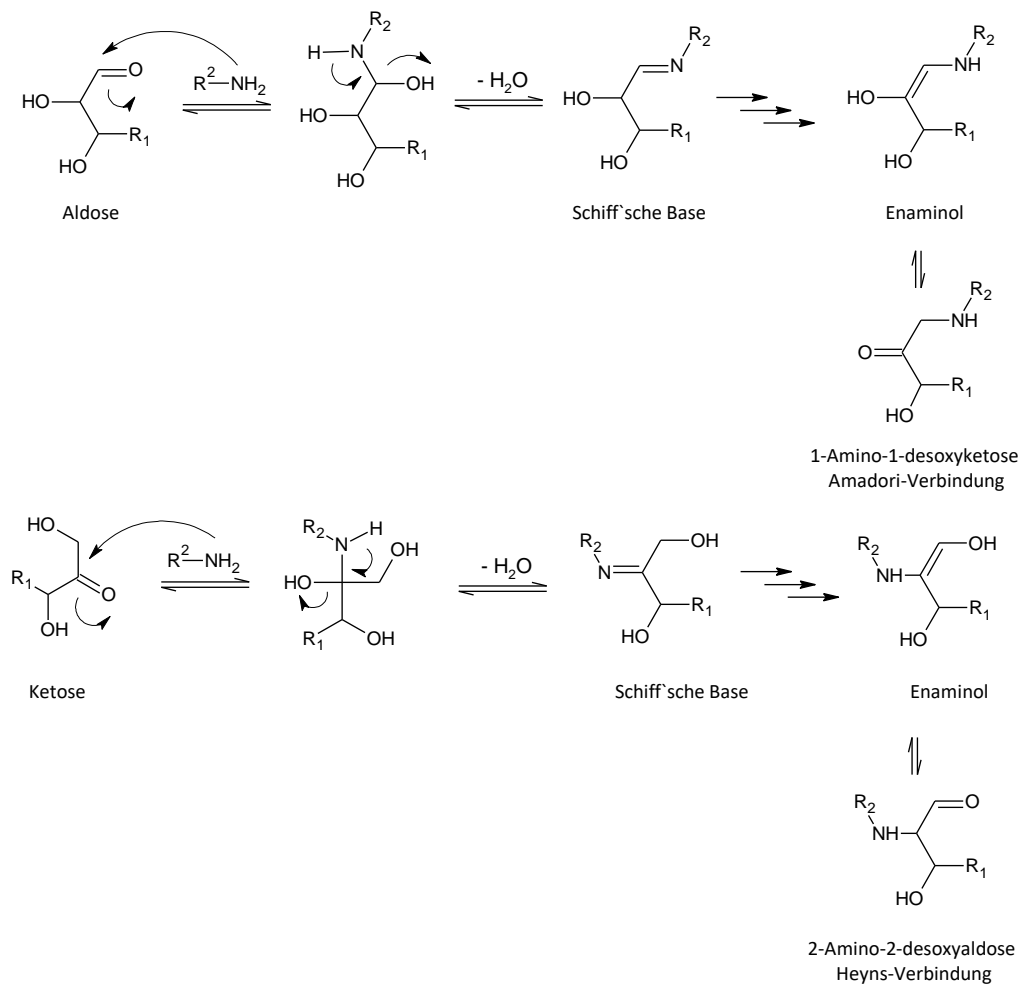


Abbildung 1 Entstehung von Amadori- bzw. Heyns-Verbindungen nach Mottram (2007)

Die Anfangsphase der Maillard-Reaktion beginnt mit der Kondensationsreaktion zwischen einer nukleophilen Aminogruppe ($-NH_2$) von Aminosäuren oder Aminen und einer reduzierenden Carbonylgruppe ($-CHO$) eines Zuckers (Aldose bzw. Ketose). Unter Wasserabspaltung entsteht während dieser Kondensationsreaktion ein Imin, welches auch als Schiff'sche Base bezeichnet wird. Imine werden als instabiles Zwischenprodukt beschrieben, da sie unter Anlagerung von Wasser wieder in die Ausgangsprodukte zerfallen. Ausgehend von einer Aldose, wie z. B. Glucose, erhält man über die Umlagerung zum 1,2-Enaminol die 1-Amino-1-desoxy-ketose, die auch als Amadori-Verbindung bezeichnet wird. Analog hierzu führt die Reaktion einer Ketose, wie beispielsweise Fructose, mit einer Aminogruppe zur 2-Amino-2-desoxy-aldose, auch als Heyns-Verbindung bekannt (Abbildung 1).

In der Intermediärphase reagieren die entstandenen Amadori- bzw. Heyns-Produkte weiter. Durch 1,2- bzw. 2,3-Enolisierung und anschließender Eliminierung der Aminofunktion entstehen hochreaktive α -Dicarbonylverbindungen (Desoxyosone). Aus dem 1,2-Enaminol

entsteht durch Eliminierung der Aminosäure das 3-Desoxyoson, aus dem 2,3-Enaminol das 1-Desoxyoson (Abbildung 2).

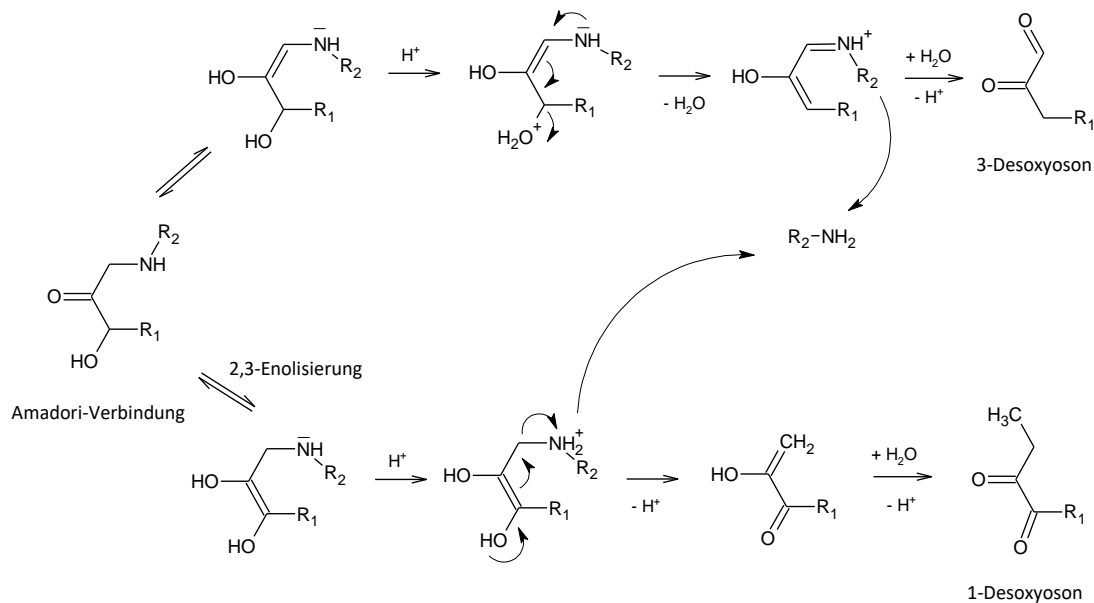


Abbildung 2 Bildung der Desoxyosone durch Enolisierung am Beispiel der Amadori-Verbindung nach Mottram (2007)

Im Zuge des Strecker-Abbaus entstehen aus den α -Dicarbonylverbindungen und Aminosäuren durch Transaminierung Aminoketone, CO_2 und Aldehyde, die sogenannten Strecker-Aldehyde, die im Vergleich zur Ausgangs-Aminosäure ein um ein C-Atom verkürztes Grundgerüst aufweisen (Abbildung 3) [Mottram, 2007].

In der finalen Phase der Maillard-Reaktion entstehen durch Kondensations- und Polymerisationsreaktionen aus den verschiedenen reaktiven Intermediaten, welche miteinander reagieren, weitere Verbindungen bzw. auch niedermolekulare und hochmolekulare Melanoidine. Die während des Strecker-Abbaus entstandenen Aminoketone reagieren z. B. weiter zu den äußerst geruchs- und geschmacksintensiven Pyrazinen (Abbildung 3).

Für die Bildung der hochmolekularen Melanoidinen werden mehrere Möglichkeiten diskutiert. Einerseits können Melanoidine durch Polymerisation niedermolekularer MRPs entstehen. Andererseits besteht auch die Möglichkeit der Quervernetzung niedermolekularer MRPs mit reaktiven Seitenketten von Aminosäuren. Vor allem bei höheren Temperaturen und langen Erhitzungszeiten bilden sich hochmolekulare Melanoidine, die sich durch ihre intensiv braune Farbe auszeichnen [Wang *et al.*, 2011].

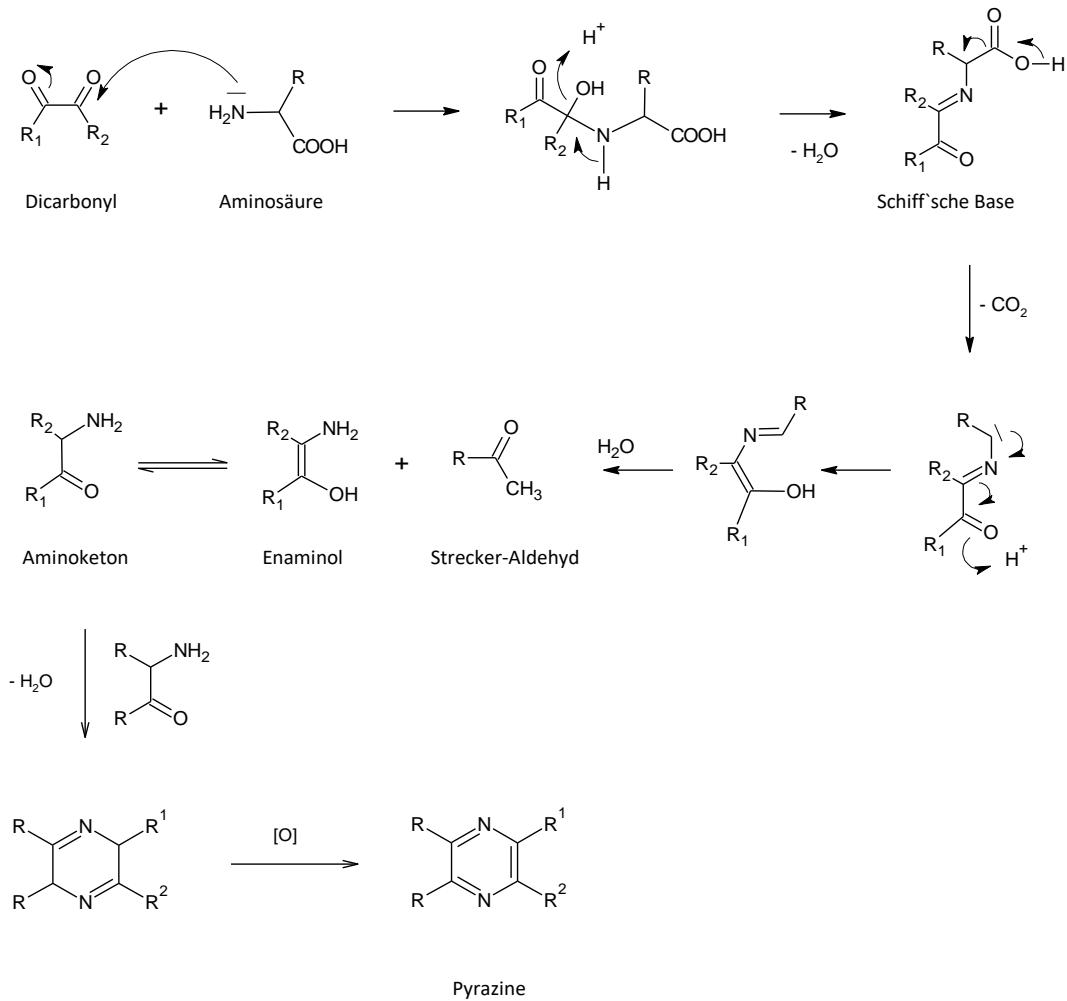


Abbildung 3 Entstehung von Strecker-Aldehyden, Aminoketonen und Pyrazinen nach Mottram (2007)

Die flüchtigen Verbindungen, die im Zuge der Maillard-Reaktion entstehen, können in drei Gruppen unterteilt werden [Mottram, 2007]:

- "Einfache" Dehydrierungs- und Fragmentierungsprodukte aus Zuckern: Furane, Pyrone, Cyclopentene, Carbonylverbindungen und Säuren
- "Einfache" Degradierungsprodukte aus Aminosäuren: Aldehyde, Schwefelverbindungen (z. B. Methanthiol), Stickstoffverbindungen (z. B. Ammoniak, Amine)
- Flüchtige Verbindungen, die durch weitere Interaktionen entstehen: wie beispielsweise Pyrrole, Pyridine, Pyrazine, Imidazole, Oxazole, Thiazole, Thiophene, Dithiolane, Trithiolane und Furanthiole

2.1.3.2 Extraktgewinnung aus den traditionellen chinesischen Lebensmitteln

Im Rahmen des Kooperationsprojekts wurden die Gesamtextrakte vom chinesischen Kooperationspartner isoliert. Die Lebensmittelproben von JS bzw. PE wurden zunächst mit Ether und im Anschluss mit heißem Wasser extrahiert. Die wässrigen Extrakte von PE bzw. JS wurden anschließend mittels Ultrafiltration (Ausschlussgrenze < 5000 Da) aufgereinigt und anschließend flüssigkeitschromatographisch fraktioniert. Der wässrige Gesamtextrakt JS und die Fraktionen F1, F2 und F3 sowie der wässrige Gesamtextrakt PE und die Fraktionen F4, F5 und F6 wurden zur weiteren Untersuchung der zellulären Wirkungen gefriergetrocknet zur Verfügung gestellt [Persönliche Mitteilung, Prof. Zhou].

2.1.3.3 Aroma-aktive Verbindungen im Jinhua Schinken

Während des langen Reifeprozesses finden zahlreiche enzymatische und nicht-enzymatische Reaktionen im Schinken statt, darunter fallen Proteinabbau, Lipidabbau und -oxidation. Obwohl der Schinken zu keinem Zeitpunkt während der Reifung hohen Temperaturen ausgesetzt wird, finden die Maillard-Reaktion und der Strecker-Abbau aufgrund des monatelangen Herstellungsprozesses statt. Diese unterschiedlichen Reaktionsmöglichkeiten führen zur Bildung einer Vielzahl an chemischen Verbindungsklassen, wie Aldehyde, Ketone, Carbonsäuren, Alkohole, Ester, Schwefelhaltige bzw. Stickstoffhaltige Verbindungen, Alkane, Alkene, zyklische und aromatische Kohlenwasserstoffe, die alle einen Beitrag zur typischen Aromabildung des Jinhua Schinkens leisten [Huan *et al.*, 2005].

Während der Proteolyse im Zuge des Reifungsprozesses werden Muskelproteine stetig hydrolysiert, dabei entstehen Peptide und freie Aminosäuren. Toldrá *et al.* (1997) zeigten in einer Untersuchung, dass freie Aminosäuren in Rohschinken aus Muskelproteinen und Muskelpeptiden stammen, die von Aminopeptidasen abgebaut wurden. Aminopeptidasen sind Exopeptidasen, die die Abspaltung einzelner Aminosäuren vom *N*-terminalen Ende eines Proteins katalysieren. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Alanyl-, Arginyl- und Leucylpeptidasen auch noch nach der letzten Nachreifung von JS eine Aktivität aufwiesen. Ähnliche Ergebnisse konnten *in vitro* bei Untersuchungen zur Aktivität der Dipeptidylpeptidase I und IV festgestellt werden. Die Aktivitäten beider Enzyme werden durch Temperatur, pH-Wert und Salzgehalt beeinflusst. Die Aktivität der Dipeptidylpeptidasen (DPP) I sank zwar während des sechs-stufigen Herstellungsprozesses von JS, stieg jedoch zum Ende des Nachreifungsprozesses wieder auf ihren ursprünglichen Wert an. DPP IV hingegen zeigte nach der Nachreifung eine deutlich geringere Aktivität als

zu Beginn des Reifungsprozesses vor dem Salzen. DPP sind Enzyme, welche am N-Terminus eines Peptids Dipeptide abspalten [Toldrá, Flores und Sanz, 1997].

Tabelle 1 Inhaltsstoffe des Gesamtextrakts aus JS mittels GC/MS-Analyse [Persönliche Mitteilung, Prof. Zhou]

Stoff	Rel. Gehalt [%]	Stoff	Rel. Gehalt [%]
Nonan	0,08	Heptanal	0,73
Decan	0,1	Octanal	0,54
Undecan	0,31	Nonanal	3,48
Tridecan	0,51	Benzaldehyd	1,52
Tetradecan	0,14	Phenylacetaldehyd	1,02
Cyclohexan	0,33	Aceton	0,06
Styrol	0,27	Octanon	0,07
Limonen	1,08	Heptanon	0,4
Myrcen	0,31	Heptenon	0,45
Cyclohepten	0,23	Furanon	0,22
Ethanol	8,34	Essigsäure	3,11
Butanol	0,2	Propionsäure	0,54
Hexanol	0,83	Buttersäure	0,58
Octanol	0,25	Valeriansäure	0,11
Cyclohexanol	0,26	Myristinsäure	1,42
Octenol	1,81	Buttersäureethylester	0,27
Aldohexosen	33,71	Pyrazin	0,33
Acetaldehyd	0,66	Pentylfuran	0,11
Propanal	0,35	Methanthiol	1,46
Pentanal	0,22		

Im Verlauf des Kooperationsprojektes konnte die Arbeitsgruppe um Prof. Zhou mittels GC/MS-Analyse eine Vielzahl von chemischen Verbindungen im wässrigen Extrakt aus JS detektieren (Tabelle 1). Die am häufigsten vorkommenden Stoffklassen waren Alkohole, Aldehyde, Ketone und Carbonsäuren sowie Aldohexosen. Neben weiteren Inhaltsstoffen konnte beispielsweise die Bildung von Nonanal (4,34 %), Methanthiol (0,78 %) sowie

Benzaldehyd (2,57 %) mittels GC/MS-Analyse von Huan *et al.*, (2005) ebenfalls im Jinhua Schinken nachgewiesen werden.

2.1.3.4 Aroma-aktive Verbindungen der Peking Ente

Durch die hohe Temperatur (> 230 °C) während der Zubereitung der PE entstehen Aromastoffe, die im Verlauf der Lipidoxidation oder Maillard-Reaktion gebildet werden bzw. auch aus Intermediaten beider Reaktionswege. Ausgangsverbindungen dieser Reaktionen sind Lipide, Aminosäuren, Kohlenhydrate, Thiamine und Ribonukleotide im Entenfleisch, aus denen eine Vielzahl an Aromastoffen wie organische Säuren, Aldehyde, Ketone oder Alkohole, sowie auch Schwefel- bzw. Stickstoff-haltige Verbindungen entstehen können.

In dem wässrigen Extrakt PE wurden von der chinesischen Kooperationsgruppe mittels GC/MS-Analyse insbesondere Aldehyde, Ketone und heterozyklische Verbindungen sowie Aromaten nachgewiesen (Tabelle 2) [Zhou *et al.*, 2015].

Tabelle 2 Inhaltsstoffe des Gesamtextrakts aus PE mittels GC/MS-Analyse [Zhou *et al.*, 2015; *Persönliche Mitteilung, Prof. Zhou]

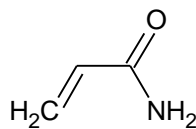
Stoff	Rel. Gehalt [µg/g]	Stoff	Rel. Gehalt [µg/g]
Propanol	0,341	Benzaldehyd	0,068
2-Methylpropanol	0,164	Aceton	0,386
3-Methylbutanal	0,220	2-Butanon	0,110
Pentanal	1,264	2,3-Pentandion	0,117
Hexanal	6,050	2-Pentylfuran	0,019
Heptanal	0,154	Dihydrofuran	0,015
Octanal	0,032	Methylpyrazin	0,036
Nonanal	0,069	2,6-Dimethylpyrazin	0,056
2-Hexenal	0,020	2,5-Dimethylpyrazin	0,020
2-Octanal	0,049	2-Hexenal	0,11*

Die mittels GC/MS-Analyse ermittelten Gehalte der oben genannten Inhaltsstoffe korrelieren mit weiteren Untersuchungen, in denen ebenso Hexanal (5,39 µg/g), 3-Methylbutanal (0,18 µg/g) und 2,6-Dimethylpyrazin (0,03 µg/g) in ähnlichen Gehalten detektieren wurden [Chen *et al.*, 2009].

Die Lebensmittelkontaminanten 5-Hydroxymethylfurfural (0,071 µg/g) und AA (0,211 µg/g) konnten im Extrakt PE flüssigkeitschromatographisch zusätzlich identifiziert werden [Zhou *et al.*, 2015].

2.2 Acrylamid

AA ($\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$, CAS Nummer: 79-06-01) ist ein kleines, polares, organisches Molekül, das sich sehr gut in Wasser sowie gut in Methanol, Ethanol und Aceton löst. Die Strukturformel von AA ist in Abbildung 4 dargestellt. In seiner Reinform ist AA ein weißes, kristallines, geruchloses Pulver mit einem Molekulargewicht von 71,08 g/mol. Als α,β -ungesättigtes Carbonsäureamid fungiert AA aufgrund seines elektrophilen Charakters als Michael-Akzeptor und geht mit nukleophilen Michael-Donatoren die sogenannte Michael-Addition ein.



AA
Acrylamid

Abbildung 4 Strukturformel Acrylamid

2.2.1 Vorkommen und Bildung

Die industrielle Produktion von AA begann im Jahr 1954 [WHO, 1999]. Seither wird AA in der EU zur Herstellung von Polyacrylamiden mit einem AA-Restgehalt unter 0,1 % (w/w) verwendet [EU, 2000]. Polyacrylamide werden in erster Linie als Flockungsmittel zur Klärung von Trinkwasser und zur Behandlung von Industrieabwässern genutzt. AA und Polyacrylamide finden jedoch auch in der Herstellung von Papier und Farbstoffen sowie in Verpackungen von Kosmetika und Lebensmitteln Verwendung. Im Laborbereich werden wässrige AA-Lösungen zur Herstellung von Polyacrylamidgelen eingesetzt [EFSA, 2015].

Eine schwedische Arbeitsgruppe konnte im Jahr 2002 jedoch erstmals die Entstehung von AA im Lebensmittel nachweisen [Tareke *et al.*, 2002]. Der Hauptbildungsmechanismus von AA im Lebensmittel beruht auf der Reaktion zwischen der Aminosäure Asparagin und reduzierenden Zuckern im Verlauf der Maillard-Reaktion [Mottram *et al.*, 2002; Stadler *et al.*, 2002]. Hierbei kondensieren im ersten Schritt ein reduzierender Zucker und Asparagin

durch nukleophilen Angriff der α -Aminogruppe des Asparagins zu einer Schiff'schen Base. Bei hohen Temperaturen wird die Schiff'sche Base zu einem Zwischenprodukt decarboxyliert, welches sich entweder direkt in AA und ein Imin spaltet oder zu 3-Aminopropionamid hydrolysiert wird, welches unter Freisetzung von Ammoniak zu AA umgewandelt wird (Abbildung 5). Neben Asparagin können auch andere Aminosäuren wie Glutamin, Methionin und Cystein an der Entstehung von AA beteiligt sein, spielen jedoch im Vergleich zu Asparagin eine deutlich untergeordnete Rolle. Als reduzierende Zucker kommen vor allem Glucose und Fructose in Frage, wobei Fructose zu vergleichsweise höheren AA-Gehalten als Glucose führt [Taeymans *et al.*, 2005; Zyzak *et al.*, 2003].

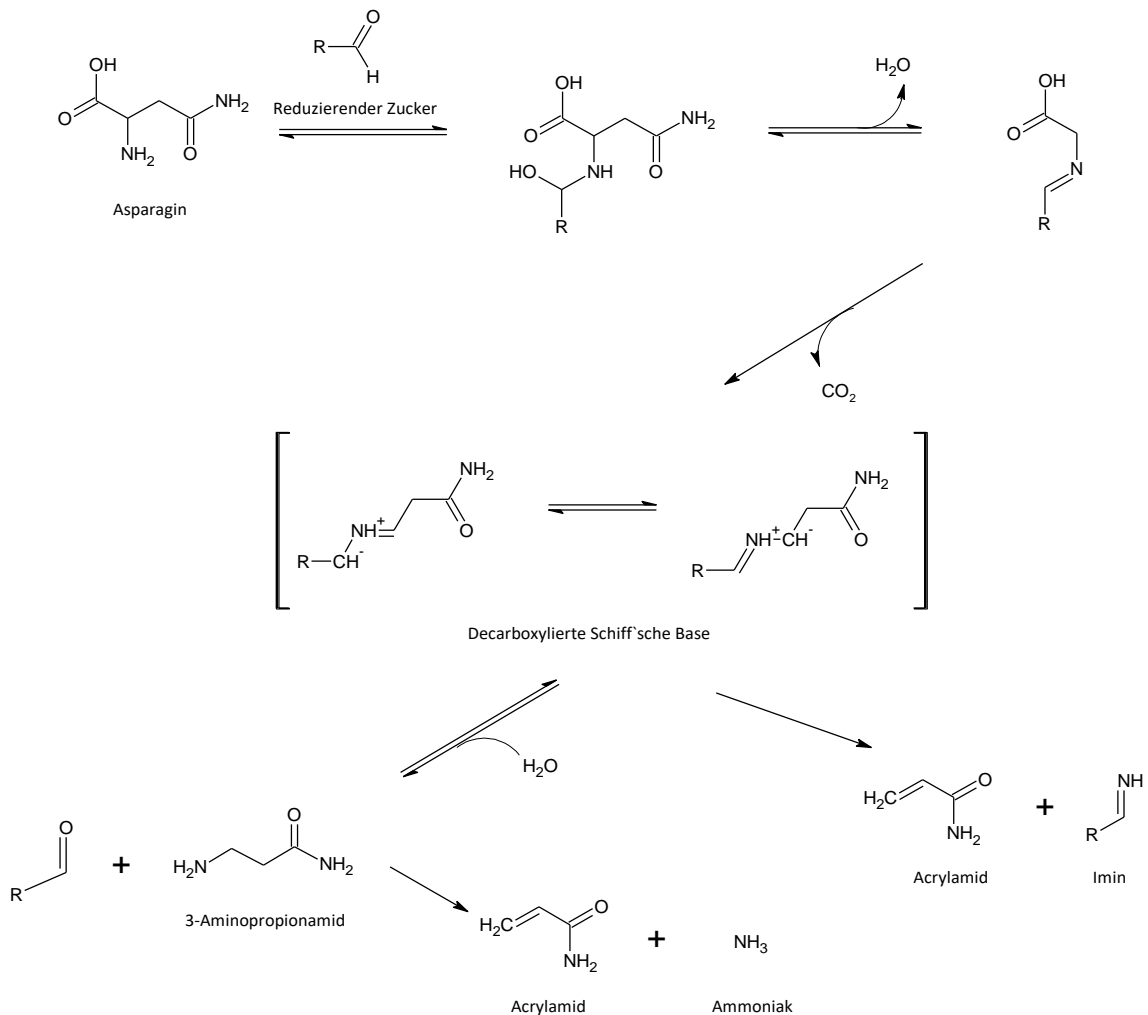


Abbildung 5 Bildungsmechanismus von Acrylamid nach Zyzak *et al.*, (2003)

Ein Nebenweg, der in Abwesenheit von Asparagin stattfindet, stellt in fetthaltigen Lebensmitteln die Entstehung von AA aus Acrolein dar, welches zur Acrylsäure oxidiert und anschließend mit Ammoniak zu AA umgesetzt wird [Becalski *et al.*, 2003].

Sowohl die Zusammensetzung als auch die Art der Herstellung und Zubereitung des Lebensmittels haben einen Einfluss auf den AA-Gehalt im Lebensmittel [Tareke *et al.*, 2002]. Gertz *et al.* (2002) konnten durch eine Absenkung der Temperatur von 185 auf 175 °C eine AA-Reduktion um bis zu 35 % in frittierten Kartoffelprodukten feststellen. Insbesondere stark erhitzte Lebensmittel wie z. B. Knäckebrot, Kartoffelpuffer und Kaffee weisen jedoch hohe AA-Gehalte auf. Einen Überblick über diese Lebensmittel und deren mittleren AA-Gehalte gibt Tabelle 3.

Tabelle 3 Mittlere Acrylamid-Gehalte in ausgewählten Lebensmittelgruppen [BfR, 2011]

Lebensmittelgruppe	AA-Gehalt in µg/kg (MW) im Rahmen der Signalwert-Berechnung	
	2005	2010
Jahr		
Getreideprodukte:		
Knäckebrot	300	260
Frühstückscerealien	84	118
Spekulatius	365	163
Kartoffelprodukte:		
Kartoffelchips	652	385
Pommes frites	268	256
Kartoffelpuffer	1065	692
Kaffeeprodukte:		
Kaffee, geröstet	310	213
Kaffee, löslich	808	686
Kaffeersatz	1001	739

Anzumerken ist, dass ein Rückgang der AA-Gehalte im Jahr 2010 im Vergleich zum Jahr 2005 zu beobachten ist. Dies liegt an den Minimierungsmaßnahmen, auf die in Kapitel 2.2.3 noch genauer eingegangen wird. Im Hinblick auf die Gehalte gehören jedoch die Kaffeeprodukte immer noch zu den am stärksten belasteten Produkten.

AA kann im Organismus über die Cytochrom P450 Monooxygenase (CYP450) 2E1 zum reaktiveren Epoxid Glycidamid (GA) umgewandelt werden (Kapitel 2.2.2). Auch der Metabolit GA konnte im verarbeiteten Lebensmittel detektiert werden. Je nach Herstellungsbedingungen konnten GA-Gehalte zwischen 0,3 und 1,5 µg/kg in Kartoffelproben beobachtet werden. Die Ursache für das Vorkommen von GA konnte durch Untersuchungen von Granvogl *et al.*, (2008) bestätigt werden, die zeigten, dass in Anwesenheit von Linolsäure die Doppelbindung von AA epoxidiert werden kann. In Pommes frites, die in linolsäurereichem Sonnenblumenöl frittiert wurden, konnten wesentlich höhere Mengen an GA detektiert werden als in Kokosfett zubereiteten Pommes frites [EFSA, 2015].

Neben der geringeren Belastung durch Lebensmittel sind noch die berufliche Exposition und eine ebenfalls nicht zu vernachlässigende Belastung durch Zigarettenrauch zu nennen. So konnten Smith *et al.* (2000) im Hauptstrom des Zigarettenrauches AA-Gehalte von 1000 bis zu 2340 ng pro Zigarette feststellen, Moldoveanu *et al.* (2011) sogar bis zu 4168,8 ng pro Zigarette, so dass Raucher einer deutlich stärkeren AA-Belastung ausgesetzt sind als Nichtraucher.

2.2.2 Metabolismus von Acrylamid

AA wird hauptsächlich bei berufsexponierten Personen dermal oder inhalativ sowie oral über Lebensmittel von der Allgemeinbevölkerung aufgenommen und nach Resorption schnell in alle Gewebe verteilt. AA kann anschließend durch CYP2E1 zu GA metabolisiert werden [Ghanayem *et al.*, 2005], welches als ultimativer genotoxischer Metabolit gilt und somit zur kanzerogenen Wirkung von AA beiträgt. Es ergeben sich verschiedene Metabolisierungswege für AA und GA, die in Abbildung 6 dargestellt sind und auf die im weiteren Verlauf näher eingegangen wird:

Hämoglobin-Addukte:

Sowohl AA als auch GA können an freie Aminosäuren, insbesondere an Valin (Val) von Hämoglobin (Hb) binden. Die dabei entstehenden Hämoglobin-Addukte *N*-(2-carbamoyl-ethyl)-Valin (AAVal-Hb-Addukt) bzw. *N*-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-Valin (GAVal-Hb-Addukt) stellen wichtige Biomarker zur Expositionsabschätzung dar [Fennell *et al.*, 2005]. Inwiefern bestimmte Lebensmittelmatrixen die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus von AA beeinflussen, wurde an männlichen Sprague Dawley Ratten durch Verabreichung von Pommes frites (100 µg/kg KG/Tag), Lebkuchen (100 µg/kg KG/Tag) bzw. Brotkruste (50 µg/kg KG/Tag) über 1, 3, 5, 7 bzw. 9 Tagen untersucht. Verglichen wurden die Ergebnisse mit der Aufnahme von AA über das Trinkwasser durch Schlundsondierung. Bei

allen Behandlungsgruppen waren deutliche, nahezu lineare Anstiege der AAVal-Hb-Addukt-Gehalte in Abhängigkeit von der Behandlungszeit und damit der kumulativen AA-Dosis zu erkennen. Im Gegensatz dazu blieb die GAVal-Hb-Adduktbildung bei allen Behandlungsgruppen im Bereich der unbehandelten Kontrolle (28 ± 9 pmol/g Hb) [Berger *et al.*, 2011]. Im Rahmen einer Pilotstudie führte lediglich die höchste Dosis (10 mg/kg KG/Tag) in Sprague Dawley Ratten zu einem signifikanten Anstieg des GAVal-Hb-Addukt-Levels (251 ± 42 pmol/g Hb). Als Fazit konnten die Autoren eine vergleichbare Bioverfügbarkeit von AA zwischen den untersuchten Lebensmitteln Lebkuchen bzw. Pommes frites und Trinkwasser feststellen. Lediglich die mit Brotkruste gefütterte Gruppe zeigte im Vergleich zur Trinkwasser-behandelten Gruppe eine leicht niedrigere AAVal-Hb-Adduktbildung (17 %) [Berger *et al.*, 2011].

Bindung an Glutathion (GSH):

Die Abfangreaktion an GSH und anschließende Ausscheidung als Mercaptursäure stellt den wichtigsten Detoxifizierungsweg dar. Fuhr *et al.* (2006) verabreichten sechs jungen Probanden jeweils etwa 0,94 mg AA über die Nahrung und konnten nach 72 h mehr als 60 % der ursprünglichen Dosis im Urin wiederfinden, wovon 50 % die AA-Mercaptursäure *N*-Acetyl-*S*-(2-Carbamoyl-ethyl)-L-Cystein (AAMA), 6 % die GA-Mercaptursäure *N*-(*R/S*)-Acetyl-*S*-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-L-Cystein (GAMA) und 4 % unverändertes AA waren. Eine weitere Human-Studie kam zu ähnlichen Ergebnissen, 24 h nach oraler Gabe von 3 mg ¹³C-markiertem AA/kg Körpergewicht (KG) wurden bei sechs Probanden etwa 40 % wieder ausgeschieden, wovon 86 % als Mercaptursäuren, insbesondere AAMA und sein S-Oxid, detektiert werden konnten. In dieser Studie wurden jedoch zusätzlich noch kleine Mengen an GA selbst, sowie den unschädlichen Stoffwechselprodukten Glyceramid und GAMA im Urin nachgewiesen [Fennell *et al.*, 2005].

In der bereits oben erwähnten Untersuchung von Berger *et al.* (2011) in männlichen Sprague Dawley Ratten wurde neben den Hämoglobin-Addukten auch die Kurzzeit-Expositionsmarker AA- und GA-Mercaptursäuren (AAMA und GAMA) als Abbauprodukte der Glutathion-Addukte über einen Zeitraum von 24 h bestimmt. Nach allen untersuchten Zeitpunkten konnte im Urin ein signifikanter Anstieg von AAMA (50 µg/kg KG/Tag: 76 ± 25 nmol; 100 µg/kg KG/Tag: 139 ± 48 nmol) und von GAMA (50 µg/kg KG/Tag: 34 ± 5 nmol; 100 µg/kg KG/Tag: 72 ± 17 nmol) in den AA-behandelten Tieren im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (AAMA: 4-8 nmol; GAMA: nicht detektierbar) identifiziert werden. Allerdings führte jedes Behandlungsintervall zu ähnlich hohen AAMA- bzw. GAMA-Spiegeln und war unabhängig von der Anzahl der bereits durchgeführten Behandlungen, weshalb ein kumulativer Effekt, wie er bei den AAVal-Hb-Addukten

aufgetreten ist, laut den Autoren ausgeschlossen werden konnte. Nach Aufnahme von AA über Pommes frites wurde kein signifikanter Unterschied in der Gesamtausscheidung an Mercaptursäuren im Vergleich zur mit Trinkwasser behandelten Gruppe festgestellt, was auf eine vergleichbare Bioverfügbarkeit von AA hindeutet, wie sie bereits bei der Untersuchung der Hämoglobin-Addukte beobachtet werden konnte. Bei den mit Brotkruste gefütterten Tieren wurde eine im Vergleich zur Trinkwasser behandelten Gruppe geringfügig niedrigere Ausscheidung an AAMA beobachtet, auch dieses Ergebnisse spiegelte sich bei der Untersuchung der Hämoglobin-Addukte wider. Die mit Lebkuchen gefütterte Gruppe wies jedoch nach allen Expositionsperioden Unterschiede in der Mercaptursäure-Ausscheidung im Vergleich zur Trinkwasser-behandelten Gruppe auf [Berger *et al.*, 2011].

DNA-Addukte:

Wird AA im Organismus in GA umgewandelt, ist GA aufgrund seiner reaktiven Epoxid-Struktur in der Lage, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* DNA-Addukte zu bilden. Mit isolierter DNA konnten folgende DNA-Addukte nach Inkubation mit GA beobachtet werden: N^7 -(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-Guanin (N^7 -GA-Gua), N^1 -(2-Carboxy-2-Hydroxyethyl)-2'-Deoxyadenosin (N^1 -GA-dA) und N^3 -(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-Adenin (N^3 -GA-Ade). Bei Untersuchungen an Mäusen und Ratten wurden sowohl nach intraperitonealer (i.p.) als auch nach oraler AA-Gabe in zahlreichen Organen DNA-Addukte festgestellt, wobei N^7 -GA-Gua das mengenmäßig am häufigsten vorkommende DNA-Addukt zu sein schien [Gamboa da Costa *et al.*, 2003; Ghanayem *et al.*, 2005; Manière *et al.*, 2005]. Nähere Erläuterungen zur Adduktbildung und zu gentoxischen Wirkungen von AA werden in Kapitel 2.2.3.3 beschrieben.

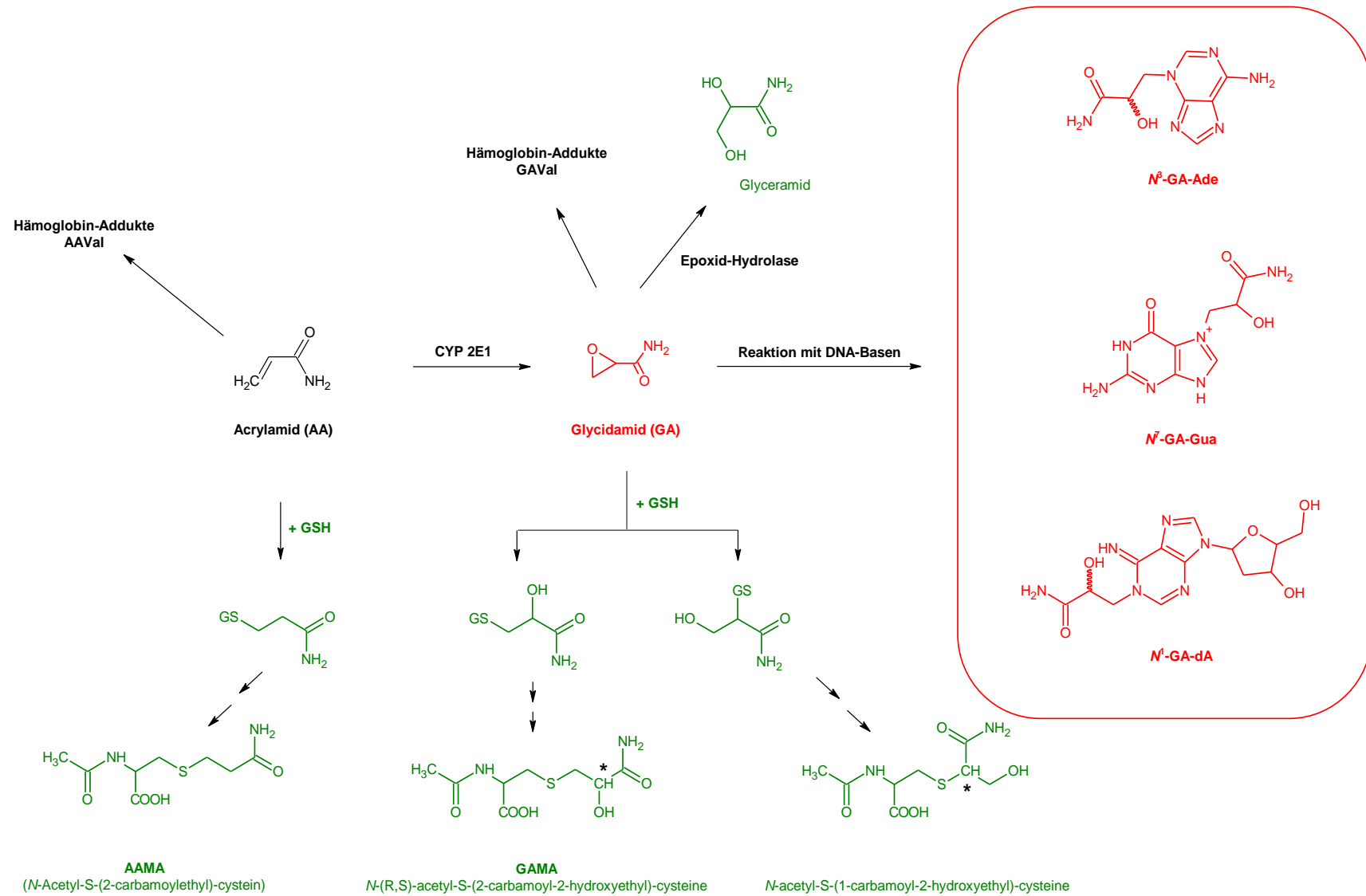


Abbildung 6 Übersicht zum Metabolismus von Acrylamid (grün: Entgiftung; rot: Giftung) in Anlehnung an Boettcher und Angerer (2005) und Watzek (2012)

2.2.3 Toxikologie

Nach oraler Gabe liegt der LD₅₀-Wert für AA bei Ratten zwischen 107 und 203 mg/kg KG. Der LD₅₀-Wert gibt die letale Dosis an, bei der 50 % der Population aufgrund der akut-toxischen Wirkung der Testsubstanz versterben. Neben dem letalen Effekt sind insbesondere neurotoxische, entwicklungs- und reproduktionstoxische sowie gentoxische Wirkungen bekannt [Ghanayem *et al.*, 2005; Tyl und Friedman, 2003].

2.2.3.1 Neurotoxizität

Zu den akuten neurotoxischen Wirkungen von AA zählen unter anderem Taubheit der Extremitäten oder Verlust der Fußreflexe. Nach chronischer Exposition treten schwerwiegendere Effekte, wie Läsionen an Nervenenden auf, die eine Verminderung der kognitiven Fähigkeiten sowie die Zerstörung von Cortex, Thalamus und Hippocampus nach sich ziehen. Neben den vorwiegend peripheren Neuropathien können auch andere Teile des Nervensystems betroffen sein [Friedman, 2003]. Die „*World Health Organization*“ (WHO) legte für die neurotoxischen Wirkungen von AA einen „*no observed adverse effect level*“ (NOAEL) von 0,5 mg/kg KG/Tag fest [WHO, 2002].

2.2.3.2 Entwicklungs- und Reproduktionstoxizität

Zu den in Tierversuchen ermittelten entwicklungs- und reproduktionstoxischen Wirkungen von AA zählen eine reduzierte Spermienzahl, eine Verminderung des Spermientransports in den Uterus sowie die Verringerung der Anzahl der Nachkommen und deren Geburtsgewicht. Männliche Tiere sind, was ihre Fortpflanzungsfähigkeit anbelangt, deutlich stärker betroffen als weibliche Tiere. Tyl und Friedman (2003) diskutierten einen alkylierenden Effekt auf Protamine und Motorproteine der Spermien. Der NOAEL für die Reproduktionstoxizität von AA wurde von der WHO mit 2 mg/kg KG/Tag angegeben [WHO, 2002].

Die gentoxischen und kanzerogenen Wirkungen von AA beruhen auf der zuvor beschriebenen Addukt-Bildung, die auf den reaktiven Phase I-Metaboliten GA zurückzuführen ist [Gamboa da Costa *et al.*, 2003]. Da die Metabolisierung zum reaktiven GA führt, welches mit der DNA Addukte bildet, stellt dies den ersten Schritt einer möglichen gentoxischen bzw. kanzerogenen Wirkung dar. Findet im Anschluss keine effektive Reparatur der modifizierten DNA-Basen statt oder kommt es zum Erliegen des programmierten Zelltodes (Apoptose), persistiert die Mutation während der DNA-Replikation, die im weiteren Verlauf durch weitere Faktoren zu einer Krebsentstehung

führen kann (siehe Kapitel 2.6). Von der IARC wurde AA als mögliches Humankarzinogen in die Gruppe 2A eingestuft [IARC, 1994].

2.2.3.3 Genotoxizität

Baum *et al.* (2005) untersuchten das mutagene Potential von AA und GA in V79 Zellen mittels des Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)-Mutagenitätstest. Im Gegensatz zu AA, von dem bis zu einer Konzentration von 10 mM keine mutagene Wirkung ausging, zeigte GA eine konzentrationsabhängige Induktion von HPRT-Mutationen in GA-Konzentrationen $\geq 800 \mu\text{M}$. In weiteren Untersuchungen an Humanblut bzw. Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung (1, 2 bzw. 4 h) mit AA bis zu einer Konzentration von 6 mM keine DNA-schädigende Wirkung im Comet Assay zur Folge hatte, hingegen die Inkubation mit GA (300-3000 μM) zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der DNA-Strangbruchrate führte. Humanblut, welches mit AA bis zu einer Konzentration von 5 mM bzw. mit GA bis zu einer Konzentration von 1000 μM inkubiert wurde, zeigte zwar eine leichte, jedoch nicht signifikante Erhöhung von Mikrokernen [Baum *et al.*, 2005]. In weiteren Untersuchungen wurde die zeitabhängige Induktion von DNA-Läsionen durch GA in V79 mittels Comet Assay untersucht. In Anwesenheit des Reparaturenzyms Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) zeigte sich nach 4 h Inkubation mit GA in deutlich geringeren Konzentrationen (10 μM) eine DNA-schädigende Wirkung im Vergleich zur nicht mit FPG-behandelten Gruppe (100 μM). FPG dient als Nachweis für oxidative DNA-Schäden, da oxidierte DNA-Basen (z. B. 8-Oxoguanin) von FPG erkannt und aus dem DNA-Strang entfernt werden, wodurch zusätzliche Einzelstrangbrüche entstehen. Allerdings konnte auch eine deutliche Abnahme der durch GA verursachten DNA-Schäden in V79-Zellen durch 8 h Nachkultivierung der Zellen beobachtet werden, so dass die Autoren von einer fast vollständigen Reparatur der GA-induzierten DNA-Schäden ausgehen [Baum *et al.*, 2008].

Manière *et al.* (2005) untersuchten das DNA-schädigende Potential sowie die DNA-Adduktbildung von AA *in vivo*. Hierzu wurden Sprague Dawley Ratten mit einer oralen Einmaldosis in Höhe von 18, 36 bzw. 54 mg/kg KG/Tag behandelt und anschließend Leukozyten, Gehirn, Knochenmark, Leber, Hoden und Nebennieren untersucht. Die Ergebnisse deuteten auf eine relativ gleichmäßige Verteilung von N^7 -GA-Guanin in Gehirn, Leber und Hoden sowie eine schwache DNA-schädigende Wirkung in Leber, Knochenmark und Nebennieren hin. Laut den Autoren kann daher zumindest nach einmaliger oraler AA-Exposition die organspezifische kanzerogene Wirkung nicht nur durch die GA-induzierten DNA-Addukte erklärt werden.

In einer aktuelleren Untersuchung wurden männliche Sprague Dawley Ratten einmalig mit 900 µg AA/kg KG im Trinkwasser behandelt. In den untersuchten Geweben Leber, Niere, Lunge und Hoden konnte die Entstehung von N^7 -GA-Guanin belegt werden. Wurden die Tiere jedoch an neun aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 100 µg AA/kg KG behandelt, was mengenmäßig der Einmaldosis von 900 µg AA/kg KG entsprach, konnte in den gleichen Geweben Leber, Niere, Lunge und Hoden keine N^7 -GA-Guanin-Bildung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass im untersuchten AA-Konzentrationsbereich DNA-Addukte effektiv repariert wurden und eine neuntägige Exposition mit AA in geringen Dosen nicht zu einer vergleichbaren Akkumulation von DNA-Addukten führte, wie sie bei einmaliger Gabe beobachtet werden konnten [Feld, 2010].

Watzek *et al.* (2012) untersuchte die DNA-Adduktbildung in Form des N^7 -GA-Gua-Addukts in unterschiedlichen Geweben (Lunge, Niere, Leber) von männlichen Sprague Dawley Ratten. Bei einer Dosis von 1 µg AA/kg KG war die Bildung von N^7 -GA-Gua-Addukten in der Niere und in der Lunge im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant erhöht. Bei dieser Dosis waren in der Leber jedoch noch keine Addukte nachweisbar. Auffallend war auch, dass bei den beiden Dosierungen 1 bzw. 10 µg/kg KG keine signifikante dosisabhängige Zunahme der Adduktbildung in der Niere und Lunge zu beobachten war. Erst bei einer Behandlung von 100 µg AA/kg KG war die Zunahme der Adduktbildungen in Leber, Lunge und Niere sowohl signifikant zur Negativkontrolle als auch zur niedrigen Behandlung (10 µg AA/kg KG). Bei allen Dosierungsgruppen waren die Werte für die N^7 -GA-Gua-Adduktgehalte in Niere und Lunge vergleichbar, wohingegen die Werte in der Leber ausnahmslos geringer waren [Watzek *et al.*, 2012].

2.2.3.4 Kanzerogenität

In drei Langzeitstudien an F344-Ratten konnte die kanzerogene Wirkung von AA nachgewiesen werden. In diesen Studien wurde AA über das Trinkwasser über einen Zeitraum von 2 Jahren verabreicht.

Johnson *et al.* (2008) exponierte die Ratten in AA-Konzentrationen von 0,01-2 mg/kg KG/Tag und beobachtete bei weiblichen Tieren in der höchsten Konzentration eine erhöhte Inzidenz von Tumoren in der Brustdrüse, im zentralen Nervensystem, in der Schilddrüse sowie in der Gebärmutter. Männliche Tiere zeigten ebenfalls eine erhöhte Inzidenz von Tumoren der Schilddrüse (2 mg/kg KG/Tag) und von Mesotheliomen des Skrotums (0,5 bzw. 2 mg/kg KG/Tag). Eine degenerative Veränderung des *Nervus tibialis* konnte histopathologisch in der höchsten Dosisgruppe festgestellt werden. Der NOAEL (*no*

observed adverse effect level) wurde auf 0,5 mg/kg KG/Tag festgelegt [EFSA, 2015; BfR, 2011].

Friedman *et al.* (1995) verabreichte männlichen F344 Ratten über das Trinkwasser AA-Konzentrationen von 0,1-2 mg/kg KG/Tag und den weiblichen Tieren AA-Konzentrationen von 1-3 mg/kg KG/Tag. Aus den histopathologischen Untersuchungen ging in den höchsten Dosisgruppen beider Geschlechter eine degenerative Veränderung des *Nervus ischiadicus* hervor. Die männlichen Tiere wiesen weiterhin in der höchsten Dosisgruppe eine signifikante Inzidenz an Mesotheliomen des Skrotums sowie an follikulären Schilddrüsenadenomen und -adenokarzinomen auf, letztere konnten auch bei den weiblichen Ratten sowohl in der niedrigen als auch in der hohen Dosisgruppe festgestellt werden. Zusätzlich wurde auch bei den Weibchen in beiden Dosisgruppen eine signifikante Zunahme an Adenokarzinomen und Fibroadenomen in den Brustdrüsen beobachtet. Der NOEL (*no observe effect level*) für die Mesotheliomen des Skrotums lag bei 0,5 mg/kg KG/Tag [Friedman *et al.*, 1995].

In der Studie des National Toxicology Programm (NTP) wurden männliche F344/N Ratten mit umgerechnet 0,33-2,71 mg/kg KG/Tag und weibliche F344/N Ratten mit 0,44-4,02 mg/kg KG/Tag AA im Trinkwasser exponiert. Die Inzidenz maligner Mesotheliome von Epididymis und Testis, maligner Tumore der Schwann-Zellen im Herzen, Adenome der pankreatischen Inseln und Schilddrüsentumore waren bei männlichen Ratten in der höchsten Dosisgruppe erhöht. Bei weiblichen Ratten konnte in allen drei Dosisgruppen eine signifikant erhöhte Anzahl an Karzinomen der Klitoris und an Fibroadenomen in der Brustdrüse beobachtet werden. Die höchste Dosis hatte bei den weiblichen Ratten auch eine erhöhte Inzidenz an oralen Tumoren (Zunge/Mukosa) sowie der Haut und Schilddrüse zur Folge [NTP, 2012].

2.2.4 Minimierungskonzepte

Die Entstehung von AA während der Lebensmittelherstellung ist technologisch derzeit nicht vermeidbar. Aufgrund der Vielfalt der betroffenen Lebensmittel bietet auch eine Verzehrsempfehlung keinen wirksamen Schutz. Für genotoxische und kanzerogene Verbindungen wurde daher das ALARA (*as low as reasonably achievable*) - Prinzip entwickelt, welches besagt, den Gehalt der Substanz im Lebensmittel so weit zu minimieren, wie dies (technologisch) "vernünftigerweise" möglich ist. Bedeutet, dass ein Lebensmittelhersteller angemessene Maßnahmen ergreifen soll, um den Gehalt der jeweiligen Kontaminante so weit wie möglich zu reduzieren [FoodDrinkEurope, 2011]. FoodDrinkEurope stellt auf seiner Homepage für Kekse, Cracker und Knäckebrot, Brot und

Broterzeugnisse, Frühstückscerealien, Kartoffelprodukte und -chips, Pommes frites sowie für Säuglings- und Kleinkindernahrung Broschüren zur Verfügung, die dem Hersteller Methoden zur AA-Reduktion in den verschiedenen Lebensmittelgruppen erläutern. Die Hersteller finden dort Leitsätze zur Rohstoffauswahl sowie zur Gestaltung der Rezeptur und des Herstellungsprozesses und werden über Besonderheiten des fertigen Produktes informiert.

Die im Jahr 2011 von der EU-Kommission eingeführten AA-Richtwerte, die früher als nationale Signalwerte bezeichnet wurden, dienen den Lebensmittelherstellern in der EU als Orientierung zur Beurteilung des AA-Belastungsgrades und erlauben im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung eine Einschätzung, ob und wie weit die von FoodDrinkEurope zur Verfügung gestellten Leitsätze Berücksichtigung finden [BVL, 2016]. Da das ALARA-Prinzip die Substanzen jedoch dimensionslos ohne Priorität einstuft, wurde das *Margin Of Exposure* (MOE)-Konzept entwickelt. Der MOE 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. Als geeigneten Bezugspunkt auf der Dosis-Wirkungskurve empfiehlt die EFSA die Dosis, die eine Tumorzinzidenz von 10 % bewirkt. Diese wird als *Benchmark Dose lower limit 10* (BMDL₁₀) bezeichnet. Das Ausmaß eines Risikos verhält sich umgekehrt proportional zum *Margin of Exposure*: Liegt der MOE als Verhältnis zwischen oraler Aufnahme und BMDL₁₀ bei 10.000 oder höher, schätzt die EFSA das vorliegende kanzerogene Risiko eher niedrig ein und schlägt vor, diese Substanzen mit geringer Priorität zu behandeln. Je weiter der MOE dagegen unter 10.000 liegt, desto größer scheint das Risiko und desto dringlicher werden Minimierungsmaßnahmen [EFSA, 2005].

2.2.5 Exposition und Risikobewertung

Basierend auf AA-Gehalten aus den Jahren 2002 und 2004 schätzte das "*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*" (JECFA) die durchschnittliche AA-Belastung in den westlichen Industriestaaten auf 1 µg/kg KG/Tag, sowie die von hochexponierten Personen auf 4 µg/kg KG/Tag [JECFA, 2010].

Eine geringere Belastung durch AA konnte in neuesten Untersuchungen der europäischen Behörde zur Lebensmittelsicherheit ermittelt werden. Für Jugendliche, Erwachsene und Senioren wird eine durchschnittliche AA-Belastung von 0,4 bis 0,9 µg/kg KG/Tag, sowie für das 95. Perzentil eine AA-Belastung zwischen 0,6 und 2,0 µg/kg KG/Tag geschätzt. Säuglinge, Kleinkinder und ältere Kinder sind jedoch die am stärksten mit AA belastete Altersgruppe. Es wurde eine durchschnittliche AA-Belastung in Höhe von 0,5 bis 1,9 µg/kg

KG/Tag geschätzt, beim 95. Perzentil in dieser Altersgruppe wurde sogar eine Belastung von 1,4 bis 3,4 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$ ermittelt [EFSA, 2015].

Den größten Beitrag zur AA-Belastung von Säuglingen leistete die Kategorie "Babynahrung, mit Ausnahme der Getreide-basierten Herstellung", gefolgt von den Kategorien "Andere auf Kartoffeln-basierte Produkte" sowie "Getreide-basierte Babynahrung". In der Altersgruppe Kleinkinder, ältere Kinder und Jugendliche machte die Kategorie "Frittierte Kartoffelprodukte (außer Chips und Snacks)" rund die Hälfte der AA-Belastung aus, gefolgt von "Feine Backwaren", "Frühstückszerealien, "Biskuit, Kekse, Knäckebrötchen" und "Andere auf Getreide-basierte Produkte". Diese Lebensmittelgruppen sind ebenso für die AA-Belastung von Erwachsenen und Senioren inklusive der Kategorie "Kaffee" verantwortlich [EFSA, 2015].

In einer Stellungnahme des Bundesamtes für Risikobewertung (BfR) von 2011 wurde zur Expositionsabschätzung von AA in Deutschland die Gehaltsdaten der 8. Signalwertberechnung von 2010 des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) und die Verzehrdaten der Nationalen Verzehrsstudie II (NVS) verwendet. Für die Abschätzung der AA-Aufnahme wurden aus den Daten der NVS II mit der sogenannten *Dietary History*-Methode die Personen ausgewählt, die mindestens ein Lebensmittel aus den 13 Lebensmitteln bzw. Lebensmittelgruppen der 8. Signalwertberechnung konsumiert haben. Die 13 Lebensmittel werden unterteilt in Getreideprodukte, dazu zählen Knäckebrötchen, Frühstückscerealien, Feine Backwaren aus Mürbeteig, Dauerbackwaren für Diabetiker, Zwieback bzw. Kekse für Säuglinge und Kleinkinder, Lebkuchen und lebkuchenhaltige Gebäcke sowie Spekulatius. Weiterhin gehörten Kartoffelprodukte (Kartoffelchips, Pommes frites und Kartoffelpuffer) sowie Kaffeeprodukte (Kaffee geröstet, Kaffee löslich und Kaffeeersatz) zu den untersuchten Lebensmittelgruppen. Anschließend wurden die individuellen, auf das Körpergewicht bezogenen Verzehrsmengen mit den mittleren Gehalten multipliziert und für die 13 Lebensmittelgruppen summiert. Somit ergab sich für die deutsche Bevölkerung eine durchschnittliche AA-Belastung von 0,14 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$ sowie für das 95. Perzentil eine Belastung von 0,39 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$. Ermittelte man hingegen die AA-Exposition über die Messung von Hämoglobin-Addukten, steigt die Belastung auf einen deutlich höheren Wert von 0,43 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$ an [BfR, 2011].

Der NOAEL für neurotoxische bzw. reproduktionstoxische Effekte wurde auf 0,5 bzw. 2,0 $\text{mg}/\text{kg KG}/\text{Tag}$ festgelegt, somit zeigen die ermittelten Expositionsdaten, dass diese Effekte durch die AA-Belastung im Lebensmittel nicht ausgelöst werden können [WHO, 2002].

Die Berechnung des MOE für AA kann sehr unterschiedlich ausfallen, je nachdem welcher Referenzwert für die Wirkdosis und welche Expositionsgrundlage verwendet werden. Als Wirkdosis verwendete das BfR in der Stellungnahme von 2011 zum einen den BMDL₁₀ von 0,30 mg/kg KG/Tag (Tumore der Brustdrüse bei F344-Ratten) sowie den BMDL₁₀ von 0,16 mg/kg KG/Tag (Tumore der Harderschen Drüse bei B6C3F1-Mäusen). Für den Menschen scheint jedoch laut Expertenmeinung die Wirkdosis zur Tumorentstehung in Brustdrüsen der Ratte der bessere Endpunkt zu sein, da die Harderschen Drüsen oder ein vergleichbares Gewebe im Menschen nicht vorkommen. Als Daten zur Expositionsabschätzung wurden aufgrund eines breit gefächerten Produktspektrums von Lebensmitteln die Schätzungen der EFSA von 2011 verwendet. Aus diesen Werten ergeben sich nun die in Tabelle 4 dargestellten MOE-Berechnungen [BfR, 2011; EFSA, 2011]. Allen Werten ist jedoch gemeinsam, dass sie den Faktor 10.000 weit unterschreiten, somit erscheint das kanzerogene Risiko hoch und Minimierungsmaßnahmen werden dringlich.

Tabelle 4 Berechnung des MOE von Acrylamid [BfR, 2011]

Expositionsabschätzung	Referenzwert Wirkdosis	
	Tumore der Brustdrüse bei F344-Ratten (BMDL ₁₀ = 0,30 mg/kg KG/Tag)	Tumore der Harderschen Drüse bei B6C3F1-Mäusen (BMDL ₁₀ = 0,16 mg/kg KG/Tag)
Mittlerer Durchschnitt 0,34 µg/kg KG/Tag	882	471
95. Perzentil 0,83 µg/kg KG/Tag	361	193

2.3 Acrylamid-Niacin-Addukt

2009 veröffentlichte Zeng *et al.* bereits Studien zur Hemmung der AA-Bildung durch Vitamine in Modellsystemen und während der Zubereitung von Lebensmitteln am Beispiel Pommes frites. Der Einfluss der wasserlöslichen Vitamine Vitamin B₁ (Thiamin), Vitamin B₂ (Riboflavin), Vitamin B₃ (Niacin), Vitamin B₅ (Pantothensäure), Vitamin B₆ (Pyridoxin, Pyridoxal, Pyridoxamin), Vitamin B₇ (Biotin), Vitamin B₉ (Folsäure) und Vitamin B₁₂ sowie Ascorbinsäure (Vitamin C) auf die Entstehung von AA wurde sowohl in einem chemischen Modell (Asparagin-Glucose-Modell) als auch in einem Lebensmittel-Modell (gebratener Snack) getestet. Die fettlöslichen Vitamine Vitamin A (Retinol), Vitamin D (Calciferol), Vitamin E (Tocopherol) und Vitamin K1 (Phyllochinon) bzw. Vitamin K2 (Menachinon)

wurden hingegen nur im frittierten Snack-Modell auf einen möglichen AA hemmenden Effekt hin untersucht. Im chemischen Modellsystem wurden Asparagin (1000 μM) und Glucose (1000 μM) sowie das zu untersuchende Vitamin (30 mg) in 2 ml bidestilliertem Wasser gelöst und 30 min bei 170 °C erhitzt. Pyridoxin und Niacin zeigten in diesem Modell die größte Hemmwirkung auf die AA-Bildung mit einer Inhibitionsrate von über 70 %. Das Lebensmittel-Modell (gebratener Snack) beinhaltete Mehl (64,5 %), Glucose (1 %), Asparagin (0,5 %) und das zu untersuchende Vitamin (0,5 %), die alle zunächst 5 min vorgemixt wurden und anschließend für weitere 20 min mit Wasser (34 %) gemischt wurden. Dieser Snack wurde in Form gebracht und zunächst 4 h bei 70 °C getrocknet, bevor er im Anschluss bei 170 ± 3 °C für 5 min auf jeder Seite gebraten wurde. Auch in diesem Modell gehörten Pyridoxin und Niacin zu den Vitaminen mit der höchsten Inhibitionsrate und hatten eine 40 % Reduktion des AA-Gehalts im Vergleich zum Kontrollsnack ohne Vitaminzusatz zur Folge. Die Ergebnisse beider Modellsysteme sind in Abbildung 7 dargestellt.

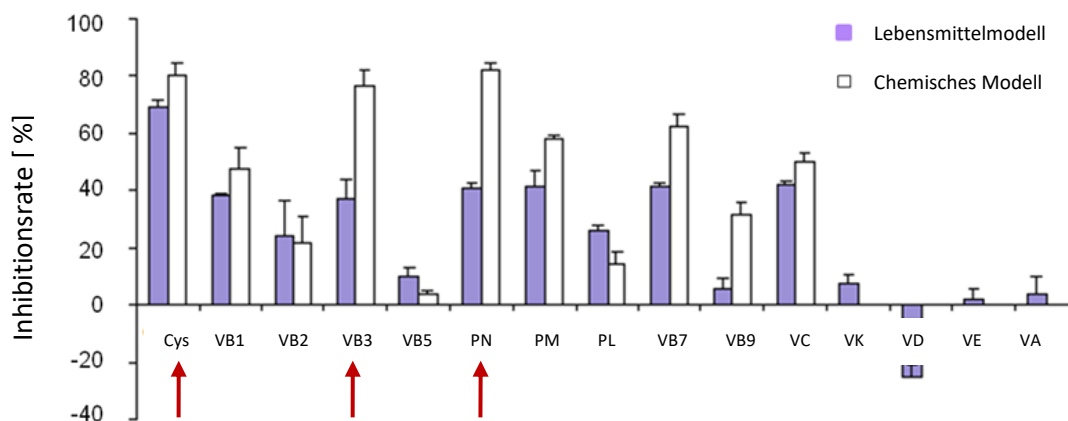


Abbildung 7 Reduktion der Acrylamid-Bildung in zwei unterschiedlichen Modellsystemen durch die Positivkontrolle Cystein (Cys) und die Vitamine VB1 (Thiamin), VB2 (Riboflavin), VB3 (Niacin), VB5 (Pantothensäure), PN (Pyridoxin), PM (Pyridoxamin), PL (Pyridoxal), VB7 (Biotin), VB9 (Folsäure), VC (Ascorbinsäure), VK (Vitamin K), VD (Vitamin D), VE (Vitamin E) und VA (Vitamin A) Zeng *et al.* (2009).

Aufgrund dieser Ergebnisse sollten die potentesten Vitamine auf ihre AA-hemmende Wirkung im echten Lebensmittel untersucht werden. Hierzu wurden Kartoffelstreifen mit 1 % wässriger Vitamin-Lösung für 1 h getränkt und anschließend bei 170 °C für 10 min frittiert. Untersucht wurden die Vitamine Pyridoxin, Niacin, Vitamin C und die Aminosäure Cystein als Positivkontrolle. Cystein besaß mit rund 60 % die größte Hemmwirkung auf AA, gefolgt von Niacin mit einem reduzierenden Potential auf die AA-Bildung von etwa 50 %. Die beiden anderen untersuchten Vitamine Pyridoxin (30 %) und Ascorbinsäure (10 %)

zeigten einen deutlich schwächeren Einfluss auf die AA-Entstehung, der somit im Vergleich zur Positivkontrolle Cystein signifikant war (Abbildung 8).

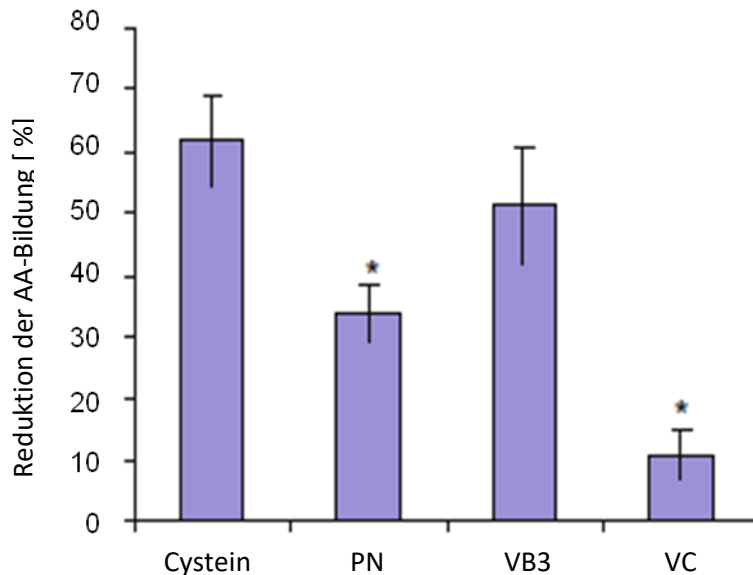


Abbildung 8 Reduktion der Acrylamid-Bildung in frittierten Kartoffelstreifen durch die Positivkontrolle Cystein und die Vitamine PN (Pyridoxin), VB3 (Niacin) und VC (Ascorbinsäure). * signifikanter Unterschied zur Positivkontrolle [Zeng *et al.* (2009)].

In der darauffolgenden Untersuchung von Zeng *et al.* (2010) wurde aufgrund der vorliegenden Ergebnisse der Reaktionsmechanismus zur Abfangreaktion von AA mit Niacin aufgeklärt. Zunächst diente ein einfacher Modellversuch zur Aufklärung, indem Asparagin und Glucose in An- und Abwesenheit von Niacin in Wasser gelöst und für 120 min bei 135 °C erhitzt wurden. Mittels LC/MS-Analyse wurden in der mit Niacin angereicherten Probe zwei zusätzliche Verbindungen identifiziert, die auf die Kondensation von Asparagin und Niacin, sowie auf eine Reaktion zwischen Niacin und AA zurückgeführt werden. Indem AA und Niacin in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen bei 135 °C für 120 min erhitzt wurden, konnte mittels HPLC-Analyse nach schrittweiser Erhöhung des Niacin-Gehalts (5 bis 30 mg) ein dosisabhängiger Anstieg von ANA und gleichzeitig ein Anstieg der AA-Inhibitionsrate, folglich eine Abnahme der AA-Bildung, beobachtet werden.

Zur Untersuchung der Stabilität des gebildeten Addukts wurde der Modellversuch über einen Zeitraum von 420 min bei 135 °C durchgeführt und danach die Produktbildung und -akkumulation analysiert. Des Weiteren konnte die Kondensationsreaktion zwischen Asparagin und Niacin aufgrund keiner signifikanten Veränderung der Asparagin-Konzentration als Ursache für die deutliche AA-Abnahme ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Reduktion des AA-Gehalts durch das direkte Abfangen von AA durch Niacin zurückzuführen ist [Zeng *et al.*, 2010].

Der postulierte Mechanismus sollte im Anschluss auch in einer komplexen Lebensmittelmatrix untersucht werden, indem Kartoffelstreifen in einer 1 % Niacin-Lösung getränkt und danach 10 min bei 170 °C frittiert wurden. Nach wässriger Extraktion und anschließender LC-MS/MS-Analyse konnte das gleiche Massenspektrum wie im chemischen System aufgezeichnet werden. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass sowohl im Modellversuch als auch im Lebensmittel der gleiche Reaktionsmechanismus zu Grunde liegt [Zeng *et al.*, 2010].

ANA wurde mittels ^1H und ^{13}C -NMR-Spektroskopie als *N*-Propanamid-3-carboxypyridinium identifiziert (Abbildung 9) [Zeng *et al.*, 2010].

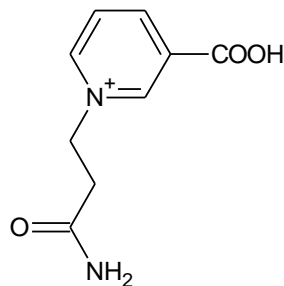


Abbildung 9 Acrylamid-Niacin-Addukt (ANA), *N*-Propanamid-3-carboxypyridinium

Zusammengefasst konnte Niacin als potentestes Vitamin in den Untersuchungen identifiziert werden, welches den AA-Gehalt unter Entstehung von ANA auch im echten Lebensmittel deutlich reduzieren konnte. Der Niacin-Gehalt der vorbehandelten Kartoffelstreifen (1 % Niacin-Lösung) lag bei 10-14 mg/100 g Kartoffelstreifen und somit deutlich höher als in der Kontrollgruppe (2 mg/100 g Kartoffelstreifen).

Die Autoren schließen eine negative Wirkung von Seiten des Niacins aus, da die empfohlene Aufnahmemenge ohnehin bei 20 mg/Tag liegt und Niacin erst in hohen Dosen ab 500 mg/Tag toxisch wirkt [Zeng *et al.*, 2010].

Nach den Referenzwerten der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) liegt die empfohlene Zufuhr für Niacin bei Frauen zwischen 11 und 13 mg/Tag sowie für Männer zwischen 14 und 16 mg/Tag. Das Bundesinstitut für Risikobewertung veröffentlichte 2012 eine Stellungnahme zur Einnahme von Nikotinsäure in überhöhter Dosierung und kam zu dem Schluss, dass eine erhöhte Einnahme von Niacin durchaus gesundheitliche Schäden hervorrufen kann. Niacin kann in Dosen über 30 mg eine gefäßerweiternde Wirkung besitzen, die in einer "Flush"-Symptomatik (Hautrötung im Gesicht, an Nacken und Armen,

Pruritus, Hitzegefühl, Urticaria) resultieren kann. Tagesdosen von 300 bis 2000 mg Niacin führen zu gastrointestinalen unerwünschten Nebenwirkungen, wie Übelkeit, Durchfall, Erbrechen, Sodbrennen, Verdauungsproblemen sowie Magenschmerzen. Fälle von Gelbsucht, Anstieg von Bilirubin und Anstieg bestimmter Leber-typischer Enzyme im Serum (Aspartat-Aminotransferase und Alanin-Aminotransferase, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase) wurden nach Tagesdosen von 3000 mg berichtet. Diese Symptome werden als Zeichen toxischer Effekte auf die Leber bzw. als Zeichen des Untergangs von Leberzellen angesehen [BfR, 2012].

2.4 Trigonellin, N-Methylpyridinium und Niacin

Trigonellin ist nach Koffein das am zweithäufigsten vorkommende Alkaloid in grünen Kaffeebohnen. In Arabica-Kaffee, auch Bergkaffee oder Javakaffee genannt, kommen leicht höhere Gehalte von Trigonellin vor als in Robusta-Kaffee, der auch als Tiefland-Kaffee bezeichnet wird. Der Trigonellin-Gehalt variiert in der Sorte Arabica (*Coffea arabica* L.) zwischen 7,9 und 10,6 g/kg und in der Sorte Robusta (*Coffea canephora* PIERRE EX A. FROEHNER) zwischen 6,6 und 6,8 g/kg [Stennert *et al.*, 1994].

Ein weiterer wichtiger Punkt im Vergleich zu Koffein ist der thermische Abbau von Trigonellin während der Röstung, die bei einer Temperatur zwischen 180 und 250 °C durchgeführt wird. Zum einen kann Trigonellin an Position 3 des Pyridinium-Grundgerüsts decarboxyliert werden, dabei entsteht N-Methylpyridinium, welches durch Umlagerung von Methylgruppen zu flüchtigen Pyridinen oder Alkylpyridinen reagieren kann. Zum anderen kann Trigonellin am Stickstoff des Aromaten unter Entstehung des B-Vitamins Niacin demethyliert werden (Abbildung 10). Rund 50 bis 75 % des ursprünglichen Trigonellin-Gehaltes werden in Niacin umgewandelt, so dass dessen Gehalt auf das 20-Fache ansteigen kann. In weiteren Untersuchungen stieg der Trigonellin-Abbau in der Sorte Arabica bei einer Temperatur von 200 °C stark an und reduzierte sich auf einen Trigonellin-Gehalt von 5 %, wohingegen in der Sorte Robusta der Abbau bei einer Temperatur von 240 °C stark anstieg und sich auf einen Trigonellin-Gehalt von 15 % verringerte [Casal *et al.*, 2000].

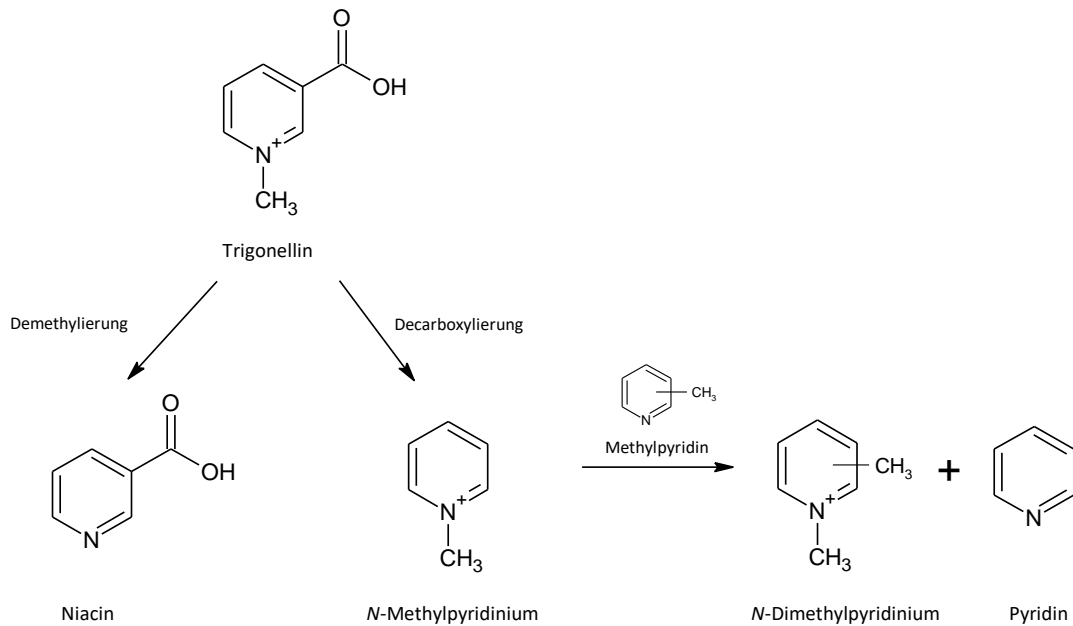


Abbildung 10 Thermischer Abbau von Trigonellin während der Kaffeeröstung

Im Durchschnitt werden 13,8 bis 45,7 μmol Trigonellin über Kaffee täglich durch den Menschen aufgenommen. NMP kommt in Kaffee mit einem durchschnittlichen Gehalt von 0,06 bis 0,25 % vor, abhängig vom Ausgangsgehalt an Trigonellin und dem Röstgrad, wobei die höchsten NMP-Gehalte in Untersuchungen von Stadler *et al.* (2002) in den am stärksten gerösteten Kaffeeproben detektiert werden konnten. Auch Lang *et al.* (2013) konnten eine Abhängigkeit vom Röstgrad feststellen, der leicht geröstete Kaffee enthielt 5,36 μmol NMP/g Kaffeeprobe, der stark geröstete Kaffee 21,49 μmol NMP/g. Bei einem Konsum von bis zu 5 Tassen Kaffee pro Tag ist daher eine durchschnittliche Aufnahme von 30-125 mg bzw. 0,3-1,3 mmol NMP pro Person und pro Tag als realistisch anzusehen, da aufgrund der stark polaren Eigenschaft von NMP eine gute Löslichkeit in H_2O anzunehmen ist.

Ausgehend von rund 1 mg Niacin pro Tasse Kaffee und der empfohlenen täglichen Tagesdosis (14-18 mg Niacin) liefern auch bereits wenige Tassen Kaffee am Tag einen guten Beitrag zum täglichen Niacin-Bedarf eines Erwachsenen. Niacin selbst kommt in der grünen Bohne nur in einer sehr geringen Konzentration vor (8-17 mg/kg bzw. 65-138 μmol), die jedoch in leicht geröstetem Kaffee auf 100 mg/kg (812 μmol) und in stark geröstetem Kaffee sogar auf 430 mg/kg (3,49 mmol) aufgrund des Trigonellin-Abbaus ansteigt [Teply *et al.*, 1957]. Durch neuere Untersuchungen konnten diese Werte bestätigt werden. Bezogen auf das Trockengewicht enthalten Kaffeebohnen je nach Sorte zwischen 0,3 und 1,3 % Trigonellin, in leicht gerösteten Kaffee (*American coffee*) sind somit in etwa 10 mg Niacin

pro 100 g enthalten, wohingegen in stark geröstetem Kaffee, dem sogenannten *Italian coffee*, der Niacin-Gehalt auf bis zu 40 mg/100 g ansteigt [Adrian und Frangne, 1991].

Zahlreiche Untersuchungen belegen eine antioxidative und chemopräventive Wirkung von Kaffee, auf die im Folgenden näher eingegangen wird. In einer Humanstudie nahmen Probanden nach einer vierwöchigen *wash out* Phase (750 ml Wasser, phenolarme Diät) für vier Wochen lang 750 ml eines stark gerösteten *Arabica* Kaffees (NMP-Gehalt: $1,10 \pm 0,05$ mg/g; CGA-Gehalt: $10,18 \pm 0,33$ mg/g) zu sich und wurden anschließend mit einer Kontrollgruppe (750 ml Wasser, 4 Wochen) verglichen. Blutproben wurden sowohl nach der *wash out* Phase als auch nach der Kaffee- bzw. Wasserphase entnommen. Ein Vergleich beider Gruppen ergab eine signifikante Erniedrigung von 27 % der spontanen DNA-Strangbruchrate in den Leukozyten der Probanden nach der Kaffeeaufnahme, die möglicherweise laut Autoren mit chemopräventiven Inhaltsstoffen, bzw. den bereits bekannten Antioxidantien aus Kaffee, wie NMP oder CGA, zusammenhängen könnte [Bakuradze *et al.*, 2015]. So konnten Lang *et al.*, (2010) mittels Untersuchungen von Plasma- und Urinspiegeln zeigen, dass es nach dem Verzehr von Kaffee (NMP-Gehalt: $171,85$ μ mol) im Plasma männlicher bzw. weiblicher Probanden zu einem steilen Anstieg der maximalen NMP-Konzentration bereits nach 1,67 bzw. 1,05 h kommt. Ebenso wurden 23 % (Frauen) bzw. 29 % (Männer) des ursprünglich aufgenommenen NMP innerhalb der ersten 2 h nach dem Kaffeeverzehr wieder über den Urin ausgeschieden. Nach einer Zeitspanne von 8 h erhöhte sich die Menge an ausgeschiedenem NMP im Urin weiter auf 62 % (Frauen) bzw. 69 % (Männer), was auf eine gute Bioverfügbarkeit und renale Ausscheidung von NMP hindeutet [Lang *et al.*, 2010].

In einer weiteren Kurzzeit-Humanstudie von Bakuradze *et al.* (2016) wurde den Probanden nach einer *wash out* Phase alle 2 h jeweils 200 ml eines *Arabica* Kaffees (NMP-Gehalt: $1,1 \pm 0,2$ mg/g; CGA-Gehalt: $10,4 \pm 0,9$ mg/g) bis zu einem Endvolumen von 800 ml (nach 8 h) verabreicht und die Blutproben jeweils unmittelbar vor der Kaffeeaufnahme ebenfalls alle 2 h entnommen. Wie in der vorherigen Humanstudie bereits gezeigt [Bakuradze *et al.*, 2015], konnte auch in der Kurzzeit-Humanstudie bereits nach einmaliger Exposition gegenüber Kaffee nach 2 h in den Leukozyten eine Reduktion von spontan auftretenden DNA-Schäden im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Weitere Aufnahme von Kaffee alle 2 h bis zu einem Endvolumen von 800 ml führte zu einer schrittweisen, signifikanten Abnahme der DNA-Schäden im Vergleich zur Kontrollgruppe [Bakuradze *et al.*, 2016].

Weitere Erläuterungen zu NMP und die Modulation des Nrf2-Signalwegs bzw. ARE-abhängiger Gene werden in Kapitel 2.5.2.2 behandelt.

2.5 Oxidativer Stress

Im Normalzustand der Zelle werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) kontrolliert gebildet und entfalten einen nützlichen Effekt, indem sie als wichtige Signalmoleküle agieren, um physiologische Prozesse wie Zellteilung, Immunfunktion, Autophagie und die Stressantwort zu regulieren. Es besteht ein Gleichgewicht zwischen der Entstehung und der Abwehr von ROS, zu denen zum einen freie Radikale wie z. B. Hydroxyl-Radikale ($\bullet\text{OH}$), Superoxid-Radikalanionen ($\bullet\text{O}_2^-$) bzw. Alkoxy-Radikale ($\text{RO}\bullet$), zum anderen aber auch Nicht-Radikale wie z. B. Peroxid-Anionen (O_2^{2-}), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bzw. Ozon (O_3) gehören [Halliwell, 2006]. Von oxidativem Stress spricht man letztendlich, wenn das Gleichgewicht auf Seiten der ROS-Bildung liegt, die zu einer Schädigung von Makromolekülen führt.

In Zellen oder Geweben, welche oxidativem Stress ausgesetzt werden, kommt es zu einem Anstieg von Carbonylproteinen, die als Folge einer Oxidation von Aminosäuren-Resten in Proteinen entstehen. Diese geschädigten Proteine können große, quervernetzte Proteinaggregate bilden, die aufgrund ihrer Hydrophobizität die Zellviabilität beeinträchtigen können. Zusätzlich können sie nicht repariert werden, sondern werden gezielt durch einen komplexen Prozess, in den Proteasen involviert sind, abgebaut und müssen in der Zelle neu synthetisiert werden [Shringarpure *et al.*, 2001].

Ungesättigte Fettsäuren werden in erster Linie durch Hydroxyl-Radikale sowie Superoxid-Radikalanionen geschädigt, indem sie die autokatalytische Lipidperoxidation mit nachfolgender Bildung von reaktiven Lipidradikalen und Lipidperoxyl-Radikalen initiieren. Diese Reaktionsprodukte führen in der Zelle zu starken Schädigungen an der Membran. Beendet werden kann die Lipidperoxidation durch Reaktion zweier Radikale unter Bildung eines stabilen Produkts oder durch Abfangreaktionen von Antioxidantien [Temple *et al.*, 2005], die im folgenden Kapitel erläutert werden.

DNA-Schäden durch ROS, vor allem durch das besonders reaktive Hydroxyl-Radikal, spielen bei der Entstehung von DNA-Schäden und Mutationen eine wichtige Rolle [Dizdaroglu *et al.*, 2002] und werden in Kapitel 2.6 beschrieben.

2.5.1 Bildung und Abwehr von ROS

Die Bildung von ROS erfolgt aus endogenen sowie exogenen Quellen. Endogen entstehen ROS im Zuge des intrazellulären Metabolismus permanent im Organismus. Fast alle Enzyme, die molekularen Sauerstoff als Substrat nutzen, produzieren ROS als Haupt- oder Nebenprodukt. Als Beispiel sind die Plasmamembran gebundene NADPH-Oxidase, die mikrosomale Cytochrom P450 Familie und die zytoplasmatische Xanthinoxidase zu nennen [Halliwell, 2006]. Als exogene Faktoren sind z. B. UV-Strahlung oder Ozon zu nennen.

Die Abwehr von ROS erfolgt durch Reparatur- und Entgiftungsmöglichkeiten innerhalb der Zelle. Zu diesem antioxidativen Schutzsystem gehören enzymatische (z. B. Glutathion-S-Transferasen, Katalase) und nicht-enzymatische Radikalfänger (z. B. Glutathion) sowie Antioxidantien (z. B. Vitamin E, Vitamin C). Zum sekundären Schutz zählen auch die Reparaturmechanismen der DNA, die in in Kapitel 2.6.3 zusammengefasst sind.

In Abbildung 11 sind die unterschiedlichen Entstehungsmöglichkeiten verschiedener ROS, deren Schädigungen und potentielle Abwehrmechanismen zusammenfassend graphisch dargestellt.

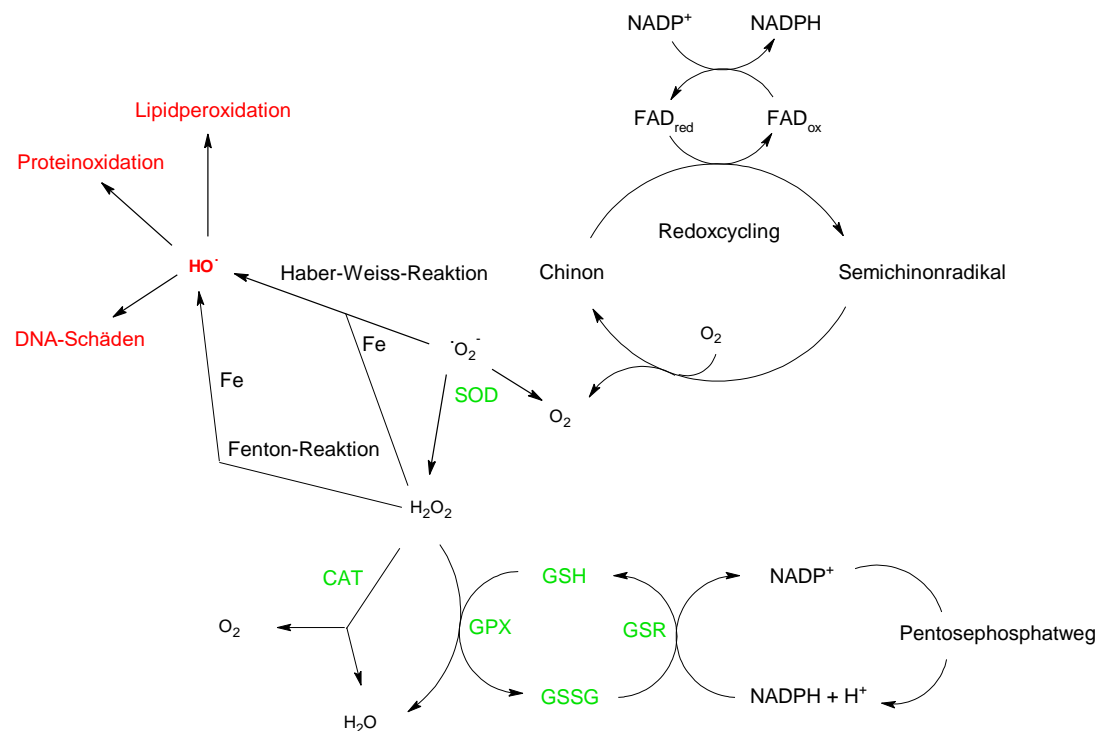


Abbildung 11 Unterschiedliche Möglichkeiten zur Entstehung verschiedener ROS, Schädigungen (rot) und Abwehrmechanismen (grün) modifiziert nach [Kelly *et al.*, 1998; Bakuradze, 2010]. CAT: Katalase; FAD: Flavin-Adenin-Dinukleotid; Fe: Eisen; GSH: reduziertes Glutathion; GSSG: oxidiertes Glutathion; GPX: Glutathion-Peroxidase; GSR: Glutathion-Reduktase; SOD: Superoxid-Dismutase.

Die in Abbildung 11 bereits teilweise dargestellten enzymatischen und nicht-enzymatischen Radikalfänger werden im Folgenden näher beschrieben:

Superoxiddismutase:

In Eukaryonten sind zwei verschiedene Isoformen der Superoxiddismutasen (SOD) bekannt: Kupfer/Zink-abhängige SOD sind im Zytoplasma, Mangan-haltige SOD sind in Mitochondrien und Peroxisomen lokalisiert [Kelly *et al.*, 1998]. Diese Enzyme katalysieren die

Entgiftungsreaktion von Superoxid-Radikalanion ($\bullet\text{O}_2^-$) in Anwesenheit von Protonen (H^+) unter Entstehung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff (O_2) [Halliwell, 2006].

Katalase:

Katalasen kommen beim Menschen überwiegend in Peroxisomen in Leber und Niere, sowie in den Erythrozyten vor. Die Katalase ist in der Lage, Wasserstoffperoxid unter Entstehung von Sauerstoff und Wasser (H_2O) zu eliminieren [Halliwell, 2006].

Glutathion-Peroxidasen:

Glutathion-Peroxidasen (GPX) katalysieren die Reduktion von organischen Peroxiden (ROOH) bzw. Wasserstoffperoxid. Während dieser Reaktion wird Glutathion (GSH) verbraucht und es entsteht seine oxidierte Form Glutathiondisulfid (GSSG), welches als Dimer vorliegt. Die Reduktion von GSSG zu GSH wird durch das Enzym Glutathion-Reduktase (GSR) katalysiert. Während dieser Reaktion wird ein Reduktionsäquivalent NAPDH/H^+ benötigt, welches aus dem Pentosephosphatweg stammt [Kelly *et al.*, 1998].

Glutathion, auch γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycine ist ein Tripeptid, welches intrazellulär in Konzentrationen zwischen 0,5 und 10 mM vorkommt [Lushchak *et al.*, 2012]. Der erste Schritt der GSH-Biosynthese wird von dem Enzym γ -Glutamylcysteinyligase (γ -GCL) katalysiert, welches für die Reaktion zwischen Glutaminsäure und Cystein zu γ -Glutamylcystein unter ATP-Verbrauch verantwortlich ist. Im zweiten Schritt wird mit Hilfe des Enzyms Glutathionsynthase die Peptidbindung zwischen der Aminogruppe des γ -Glutamylcysteins und der Carboxygruppe eines Glycins unter Bildung von Glutathion katalysiert (Abbildung 12).

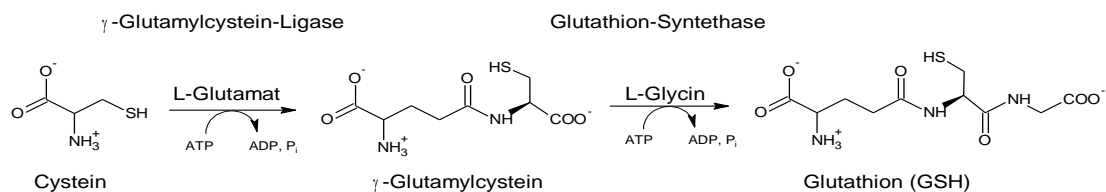


Abbildung 12 Biosynthese des Tripeptids Glutathion

In Zellen kann der Gesamt-GSH-Gehalt durch L-Buthioninsulfoximin (BSO) minimiert werden, da BSO als Hemmstoff der γ -Glutamylcystein-Synthetase fungiert und somit die GSH *de novo*-Synthese zum Erliegen kommt. In der vorliegenden Arbeit wurden daher HT29 Zellen mit BSO vorbehandelt, um im Anschluss einen potentiellen Einfluss von GSH auf die Wirkung der untersuchten Testsubstanzen feststellen zu können. Eine 24 h Inkubation von

HT29 Zellen mit 500 μM BSO sowie anschließender Koinkubation mit der Testsubstanz, reduziert den Gehalt an GSH unter 3 % ohne zytotoxisch zu wirken [Perry *et al.*, 1992].

Nrf2-Signalweg

Der Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)-Signalweg ist einer der bedeutendsten Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress und ROS [Itoh *et al.*, 1999]. Nrf2 ist ein Transkriptionsfaktor und gilt als einer der Hauptaktivatoren der Transkription von Phase-II- sowie redoxsensitiven Genen in der Zelle, indem er zusammen mit kleinen Maf-Proteinen an das *antioxidative response element* (ARE) in der regulatorischen Region von ARE-abhängigen Zielgenen bindet [Kobayashi *et al.*, 2006]. Der NRF2-Signalweg wird im Folgenden näher beschrieben.

2.5.2 Der Nrf2 Transkriptionsfaktor

Nrf2 gehört zur *Cap`n`Collar* (CNC) Familie mit basischer Leucinzipper-Domäne und besteht aus 605 Aminosäuren. Nrf2 wird in 6 homologe Domänen unterteilt, die als Neh1 (*Nrf2 - ECH homology*) bis Neh6 bezeichnet werden (Abbildung 13).

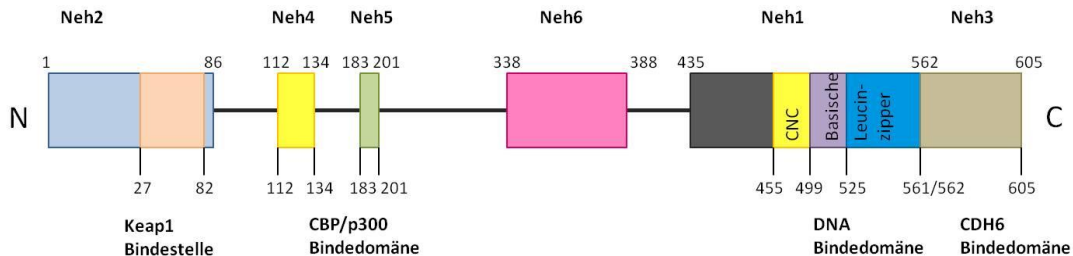


Abbildung 13 Aufbau des Transkriptionsfaktors Nrf2 mit seinen 6 Neh Domänen in Anlehnung an [Boutten *et al.*, 2011]. CBP (*CREB-binding protein*); CHD6 (*chromodomain helicase DNA-binding protein 6*); CNC (*Cap`n`Collar*); Neh (*Nrf2 - ECH homology*)

Die Neh1 Domäne verfügt über die basische Leucinzipper-Domäne, welche für die Heterodimerisierung mit kleinen Maf-Proteinen und für die Bindung an die DNA verantwortlich ist. Die am N-Terminus befindliche Neh2 ist eine redox-sensitive Domäne, die die Bindungsstelle für Keap1 enthält. Die C-terminale Neh3 regelt die Bindung mit CHD6 (*chromodomain helicase DNA-binding protein 6*), welches bei der Regulierung der Transkription durch Interaktion mit Nrf2 eine essentielle Rolle spielt. Neh4 und Neh5 sind Transaktivierungsdomänen, die mit CBP (*CREB-binding protein*) und p300 Co-Aktivatorproteinen interagieren. Die zentral lokalisierte Serin-reiche Neh6 ist eine redox-unabhängige regulatorische Domäne [Boutten *et al.*, 2011].

Nrf2 wird in hohem Maße besonders in Geweben wie Bronchialepithel oder Darmepithel exprimiert, wo Entgiftungsreaktionen permanent ablaufen [Sykiotis *et al.*, 2010].

2.5.2.1 Regulierung des Nrf2-Signalwegs

Unter physiologischen Bedingungen in der Zelle wird der Gehalt an Nrf2 im Zytoplasma auf einem niedrigen Basalniveau gehalten. Dies geschieht durch ständigen proteosomalen Abbau. Die spezifische Bindung zwischen der N-terminalen Neh2 Domäne von Nrf2 und seinem zytosolischen Inhibitorprotein Keap1 gewährleistet das Verbleiben von Nrf2 im Zytoplasma und die Ubiquitinierung durch den Cullin-3 E3 Ubiquitin Ligasekomplex (CUL3), der schließlich zum proteosomalen Abbau von Nrf2 führt (Abbildung 14). Das menschliche Keap1 verfügt über 27 Cystein-Reste und fungiert als Sensor für elektrophile Verbindungen und Oxidantien [Boutten *et al.*, 2011]. Zudem ist Keap1 der Hauptregulator der Nrf2-Stabilität und der Nrf2-gesteuerten transkriptionellen Aktivität als Antwort auf endogene, umwelt- und pharmakologisch bedingte Elektrophile. Im Gegensatz hierzu steht das Protein DJ-1, welches Nrf2 stabilisiert, indem es die Bindung zu Keap1 verhindert [Clements *et al.*, 2007].

Unter Exposition von oxidativem Stress oder Induktoren, löst sich die Bindung zwischen Nrf2 und Keap1, dadurch ist Nrf2 in der Lage in den Zellkern zu translozieren. Im Zellkern bildet Nrf2 mit anderen Transkriptionsfaktoren mit basischer Leucinzipper-Domäne, wie kleinen Maf-Proteinen, c-Jun, c-Fos und Fra-1 ein Heterodimer und bindet an das ARE in der Promotorregion von Zielgenen, um ihre Expression hochzuregulieren [Sykiotis *et al.*, 2010; Niture *et al.*, 2010]. Coaktivierende Proteine wie CREB-bindende Proteine/p300 (CBP/p300) und das ARE-Bindeprotein 1 binden den Nrf2-Heterodimer-Komplex, um die ARE-abhängige Genexpression zu regulieren [Kensler *et al.*, 2005]. Die Gene Glutathion-S-Transferasen (GSTs), NADP(H)-Chinonoxidoreduktase 1 (NQO1), Hämoxygenase 1 (HO1) und UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs) sind für die antioxidative, entgiftende Phase II Antwort verantwortlich.

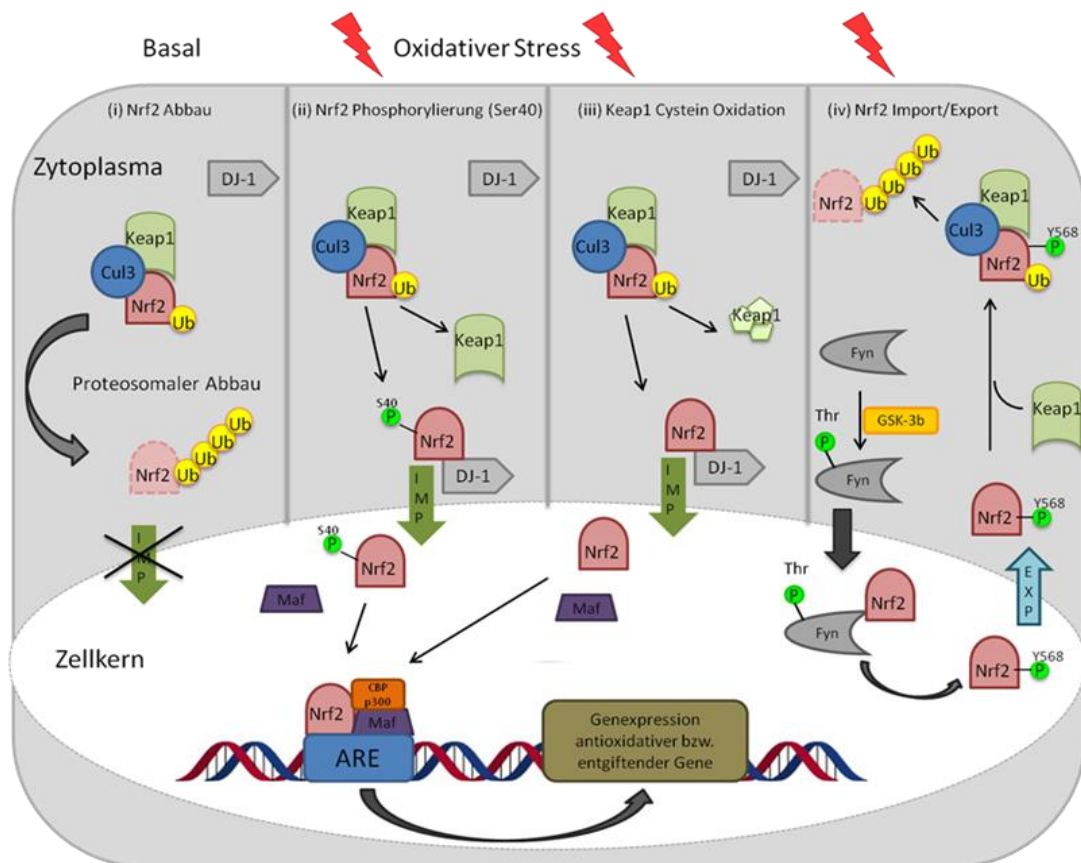


Abbildung 14 Regulation der Nrf2-vermittelten Genexpression antioxidativer bzw. entgiftender Enzyme als Antwort auf oxidativen Stress. (i) Unter Basalbedingungen bindet Keap1, ein Adaptor für die CUL3, direkt an Nrf2, dadurch wird Nrf2 dem proteosomalen Abbau zugeführt. DJ-1 stabilisiert Nrf2 durch Verhinderung der Bindung an Keap1. Kleine Mengen an Nrf2 translozieren in den Zellkern über einen Transporterkomplex (IMP). Als Reaktion auf oxidativen Stress wird die Bindung zwischen Keap1 und Nrf2 unterbrochen und Nrf2 transloziert in den Zellkern, wo es mit anderen basischen Leucinezipper Transkriptionsfaktoren, wie z. B. kleine Maf-Proteine oder CBP/p300 Koaktivatoren, heterodimerisiert und die Genexpression ARE-abhängiger Zielgene erhöht, die dem oxidativen Stress entgegenwirken. Mehrere Mechanismen zur Nrf2-Keap1-Spaltung und zur Nrf2 Signalregulation wurden vorgeschlagen: (ii) Phosphorylierung von Serin 40 und Threonin Resten in Nrf2 durch Kinasen, wie MAPKs, Proteinkinase C; (iii) Modifizierung der Cysteinreste in Keap1; und (iv) Regulierung des nukleären Imports/Exports von Nrf2. GSK-3b phosphoryliert die Tyrosinkinase Fyn an bisher unbekanntem Threonin Resten, was zu einer Fyn-Translokation in den Zellkern führt. Fyn phosphoryliert Tyrosin 568 von Nrf2, resultierend in einem Nrf2 Export ins Zytoplasma, gefolgt von einer Bindung an Keap1 und anschließendem Abbau von Nrf2 über Ubiquitin. CBP (CREB-bindende Proteine); CUL3 (Cullin-3 E3 Ubiquitin Ligasekomplex); GSK-3b (Glykogensynthasekinase 3b); MAPKs (*mitogen activated protein kinases*) Ub (Ubiquitin). In Anlehnung an Boutten *et al.* (2011)

Eine mögliche Konsensussequenz zu ARE wurde in der Promotorregion von kleinen Maf-Genen und im humanen Nrf2-Gen nachgewiesen, was stark auf einen positiven Feedback-Mechanismus des Nrf2/ARE-Signalwegs hindeutet [Sykiotis *et al.*, 2010]. Zudem reguliert Nrf2 die Genexpression von Keap1 und gewährleistet damit die sogenannte autoregulatorische Schleife zwischen Nrf2 und Keap1 [Lee *et al.*, 2007].

In der Literatur wurden verschiedene Wege zur Nrf2-Aktivierung (Abspaltung von Keap1, Stabilisierung und Translokation in den Zellkern) und zur Nrf2-Inhibierung (Ubiquitin-vermittelter Abbau von Nrf2 über Keap1-abhängige oder -unabhängige Mechanismen) beschrieben. Eine Möglichkeit zur Aktivierung hängt mit den Cysteinresten von Keap1

zusammen, deren Modifikation durch oxidativen bzw. elektrophilen Stress eine Konformationsänderung bewirkt und dadurch eine Bindung von Nrf2 unmöglich macht. Als Folge davon wird die Ubiquitinierung und der Abbau von Nrf2 vorangetrieben [Niture *et al.*, 2010]. Drei Cystein-Resten wurde bereits eine zentrale Rolle bei der Veränderung der Konformation von Keap1 nachgewiesen [Kansanen *et al.*, 2012]. Ähnlich dazu kann auch das Nrf2 Protein selbst modifiziert werden, entweder durch Oxidation von Cystein-Resten oder durch Phosphorylierung an Serin40. Die Phosphorylierung erfolgt durch Oxidantien-induzierte Kinasen, die im weiteren Verlauf eine Nrf2-Translokation in den Zellkern auslöst. Als verspätete Antwort auf oxidativen Stress gelten die Abnahme des nukleären Nrf2-Status und das schnelle Ausschalten der Aktivierung von Phase II Enzymen. Die multifunktionelle Serin/Threonin-Kinase Glykogensynthasekinase 3b (GSK-3b) phosphoryliert Fyn, welches im Anschluss in den Zellkern translozieren kann, wo es wiederum Nrf2 an Tyrosin568 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung fördert den Export von Nrf2 ins Zytoplasma und folglich den proteosomalen Abbau [Jain *et al.*, 2005]. Ebenso vermittelt Prothymosin-a die Translokation des Keap1-CUL3-Komplexes in den Zellkern, was zu einer CUL-3-vermittelten Ubiquitinierung und Abbau von Nrf2 im Zellkern führt [Niture *et al.*, 2010].

2.5.2.2 Regulierte Gene und Aktivatoren des Nrf2-Signalwegs

In Tierversuchen an Nrf2 *knock out* (KO)-Mäusen konnte eine Reduktion der Expression von Glutathion-S-Transferasen (GST) und NASPH-Chinon-Oxidoreduktase (NQO1) um 50 bis 80 % im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ermittelt werden. Weiterhin waren die Nrf2-KO-Mäuse anfälliger gegenüber zytotoxischen und gentoxischen Effekten von Xenobiotika [Ramos-Gomez *et al.*, 2001]. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Expression verschiedener Phase-II Enzyme, die ein ARE in der 5'-angrenzenden Region enthalten, über den Nrf2-Signalweg reguliert werden [Higgins *et al.*, 2008].

γ-GCL wird über ARE reguliert und wird ubiquitär, vor allem jedoch in hohen Konzentrationen in der Leber, gebildet. Das heterodimere Enzym besteht aus einer schweren katalytischen und einer leichten regulatorischen Untereinheit. Die Glutathionsynthetase und γ-GCL sind für die Biosynthese von GSH verantwortlich. γ-GCL katalysiert dabei den ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt von GSH, das eine zentrale Rolle beim Schutz der Zelle vor Angriffen durch ROS und Elektrophilen spielt. Anhand von Sequenzanalysen wurde ein ARE als Regulator der transkriptionellen Aktivierung identifiziert [Wild *et al.*, 1999].

UGT sind Enzyme, die den Transfer der Glucuronsäure von UDP-Glucuronsäure auf geeignete Substrate katalysieren. Das Gen wird in vielen Gewebstypen exprimiert,

besonders wird jedoch UGT1A1 in der Leber während des Porphyrin-Abbaus benötigt. Beim Menschen werden die beiden Enzymfamilien UGT1 und UGT2 unterschieden. In dieser Arbeit wird die Isoform UGT1A1 untersucht, welche ARE-abhängig reguliert wird [Lee *et al.*, 2003].

GST sind multifunktionale Enzyme, die nahezu ubiquitär in unserem Körper vorkommen und an der Entgiftung xenobiotischer Substanzen durch Konjugation mit GSH beteiligt sind. Von den GST existieren viele verschiedene GST-Isoenzyme, die in sieben spezies-unabhängige Klassen eingeteilt werden können: Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Zeta und Omega. Im Zuge des Phase II Metabolismus sind GST für die kovalente Verknüpfung von GSH mit elektrophilen Substraten verantwortlich und fungieren somit als wichtige Enzyme bei der Entgiftung und Konjugation von Fremdstoffen. Durch die nukleophile Addition zwischen GSH und dem Substrat entsteht ein weniger reaktives, hydrophiles Glutathion-S-Konjugat, welches beim Menschen in wasserlösliche Konjugate weiter zur Mercaptursäure metabolisiert und ausgeschieden wird [Satoh, 1995]. Insbesondere die Gene GSTA1 und GSTT1 sind in dieser Arbeit von Interesse. Eine eindeutige ARE-Sequenz ist bisher zwar noch nicht nachgewiesen, jedoch finden sich in der Literatur Anhaltspunkte, wie beispielsweise die Beteiligung von Keap1 bei der Regulation der Expression von GSTA1 in Caco-2 Zellen [Kusano *et al.*, 2008].

Als weitere Nrf2/ARE-abhängige Enzyme sind die **NQO1** (NADPH-Chinon-Oxidoreduktase), **HO-1** (Hämoxygenase1), **GPx** (Glutathionperoxidasen) und die **Katalase** zu nennen [Kensler *et al.*, 2007], die jedoch im Rahmen dieser Arbeit weniger von Bedeutung sind.

Von bestimmten Koffeinhaltsstoffen wurde bereits ein aktivierender Effekt auf den Nrf2-Signalweg berichtet. Hierbei wurden u. a. auch NMP als potenter Nrf2-Induktor identifiziert [Boettler *et al.* 2011; Somoza *et al.* 2003]. Somoza *et al.* (2003) konnten anhand einer 15-tägigen Fütterungsstudie an männlichen Wistar Ratten eine antioxidative Wirkung eines Kaffeegetränks bzw. von NMP als Einzelsubstanz selbst nachweisen. In der Leber der Ratten, deren Futter zu 4,5 % Kaffeeextrakt enthielt, konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ein Anstieg der Enzymaktivität von GST um 24 % und von UGT um 40 % festgestellt werden. Um zu überprüfen, ob NMP für die antioxidative Wirkung des Kaffeeextrakts verantwortlich gemacht werden kann, wurde dem Futter männlicher Wistar Ratten NMP in Höhe von 0,0328 % zugesetzt. In der Leber dieser Tiere konnte eine Erhöhung der UGT-Aktivität auf 65 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nachgewiesen werden. In weiteren *in vitro* Untersuchungen an Caco-2 Zellen führte die Behandlung mit NMP (0,025 g NMP in 100 ml Zellkulturmedium) ebenfalls zu einem Anstieg der GST-Enzymaktivität auf rund 22 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Die

Behandlung von HT29 Zellen mit einem NMP-reichen Kaffeeextrakt (NMP-Gehalt: 73,7 mg/l) führte in der höchsten Konzentration von 100 µg/ml nach einer Inkubationszeit von 24 h zu einer signifikanten Induktion der Genexpression von HO-1 sowie von Nrf2 selbst, jedoch wurde die Genexpression von GSTA1 und NQO1 unter diesen Inkubationsbedingungen nicht beeinflusst [Volz *et al.*, 2012].

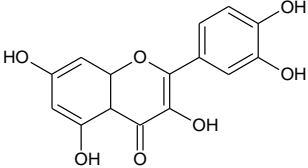
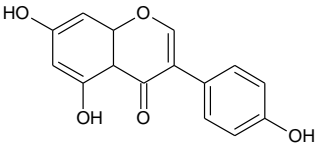
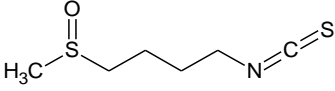
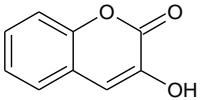
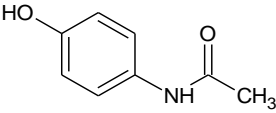
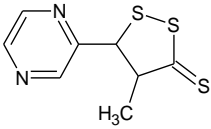
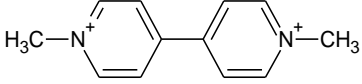
Mittels quantitativer RealTime-PCR konnte eine Erhöhung der Transkription von GSTT1, HO-1, γ-GCL und Nrf2 nach 3 bzw. 24 h Behandlung mit einem NMP-reichen Kaffeeextrakt (NMP-Gehalt: 73,7 mg/l) in HT29 Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin konnte mittels Western Blot-Analyse eine erhöhte Konzentration des nukleären Nrf2-Proteinlevels nach Inkubation mit einem NMP-reichen Kaffeeextrakt detektiert werden [Boettler *et al.*, 2011a]. Die Untersuchung der Einzelsubstanz NMP ließ in HT29 Zellen ebenfalls einen Einfluss auf die Genexpression ARE-abhängiger Gene und Nrf2 sowie auf die Nrf2-Translokation in den Zellkern erkennen. NMP führte nach 3 h Inkubation (0,1, 100, 250 und 500 µM) in einem U-förmigen Kurvenverlauf zu einer erhöhten Translokation von Nrf2 in den Zellkern. Darüber hinaus modulierte NMP nach 3 h Inkubation die Transkription von GSTA1 (10 bzw. 100 µM), GSTT1 (1 bzw. 10 µM), γ-GCL (1 µM) sowie Nrf2 (100 µM). Nach verlängerter Inkubationszeit von 24 h fiel der Einfluss auf die Transkription ARE-abhängiger Zielgene stärker aus, so wurden neben der Genexpression von GSTA1 (10 bzw. 100 µM), GSTT1 (10 µM), γ-GCL (10 µM) und Nrf2 (10 µM) zusätzlich noch die Genexpression von HO-1 (10 µM) und NQO1 (10 µM) beeinflusst [Boettler *et al.*, 2011b]. Allerdings gibt es auch Hinweise durch Untersuchungen, in denen der Einfluss auf Nrf2 bzw. auf die redoxsensitiven Gene durch NMP nicht nachgewiesen werden konnte. Im Rahmen einer Diplomarbeit aus dem eigenen Arbeitskreis konnte nach Behandlung mit NMP (sowohl mit Chlorid als auch mit Iodid als Gegenion) in der nach Boettler *et al.* (2011) potentesten Konzentration von 10 µM nach 24 h kein Anstieg der Genexpression von Nrf2, GSTA1, GSTT1, UGT1A1 sowie γ-GCL in HT29 Zellen beobachtet werden. Ebenso wurde nach Inkubation mit NMP die zuvor beobachtete Erhöhung der Genexpression von NQO1 und γ-GCL im Anschluss mittels Western Blot-Analyse auf Proteinebene in HT29 Zellen nicht bestätigt [Bakuradze, 2010].

ARE-Induktoren setzen sich aus den unterschiedlichsten chemischen Gruppen zusammen: So gehören neben der Gruppe der redoxaktiven Bisphenolen, Chinonen und Phenylendiaminen, auch Michael Akzeptoren wie z. B. Diethylmaleat und das in Broccoli und Kohl enthaltene Isothiocyanat Sulforaphan zu den ARE-Induktoren. Polyphenole wie Resveratrol oder Metalle und deren Derivate wie z. B. Phenylarsinoxid bzw. Phenylquecksilber(II)chlorid zählen ebenfalls zu den Aktivatoren. Weiterhin zu nennen sind

Thiocarbamate, Dimercaptane, Hydroperoxide, Triterpenoide, Polyene, Partikel wie z. B. Dieselabgase und Proteinfaktoren (p62, p21) [Ma und He, 2010].

Die oben genannten Aktivatoren unterscheiden sich zwar in ihrer Struktur, besitzen jedoch alle gemeinsame elektrophile oder redoxaktive Eigenschaften, die eine Modifikation, insbesondere der Cysteinreste in Keap1 oder Nrf2 durch Oxidation, Reduktion, Alkylierung oder Chelatbildung, bewirken können [Dinkova-Kostova *et al.*, 2001]. Werden die ARE Induktoren nach ihrer Herkunft eingeteilt, ergeben sich nach Ma und He (2012) vier Gruppen, die in Tabelle 5 dargestellt sind:

Tabelle 5 Einteilung der ARE-Induktoren nach ihrer Herkunft [Ma und He, 2012]

Substanzklasse	Beispiele für ARE-Induktoren	
Phytochemikalien		
	Quercetin	Genistein
		
	Sulforaphan	3-Hydroxycoumarin
Therapeutika		
	Acetaminophen	Oltipraz
Umweltgifte		$\text{As}^{3+}, \text{Hg}^{2+}, \text{Cd}^{2+}, \text{Cr}^{6+}$
	Paraquat	Metallionen
Endogene Induktoren	H_2O_2	$\bullet\text{N}=\text{O}$
	Wasserstoffperoxid	Stickstoffmonoxid

2.6 Die DNA

2.6.1 Aufbau und Organisation der DNA

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist das informationstragende Molekül in biologischen Systemen, in dem die gesamte genetische Information eines Organismus codiert wird. Sie besteht aus zwei langen Polynukleotidketten, den sogenannten DNA-Strängen, die wiederum aus Nukleotiden aufgebaut werden. Dabei ergeben drei Nukleotide die kleinste Informationseinheit, die auch als Codon bezeichnet werden und die in der DNA zur Codierung der genetischen Information zur Verfügung stehen. Nukleotide sind die Bausteine der hochmolekularen Nukleinsäuren und können vom Körper selbst aufgebaut werden. Ein Nukleotid besteht aus einer 2`-Desoxyribose, an deren 5`-Position über eine Esterbindung ein Phosphorsäurerest gebunden ist, während an der 1`-Position die stickstoffhaltige Base verknüpft ist. Die Basen lassen sich weiterhin in zwei Gruppen einteilen, die Purinbasen, zu denen Adenin und Guanin gehören, sowie die Pyrimidinbasen, zu denen Thymin und Cytosin zählen. Dabei paart immer Adenin mit Thymin sowie Guanin mit Cytosin, deren Bindung zueinander durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden (Abbildung 15) [Karp, 2005].

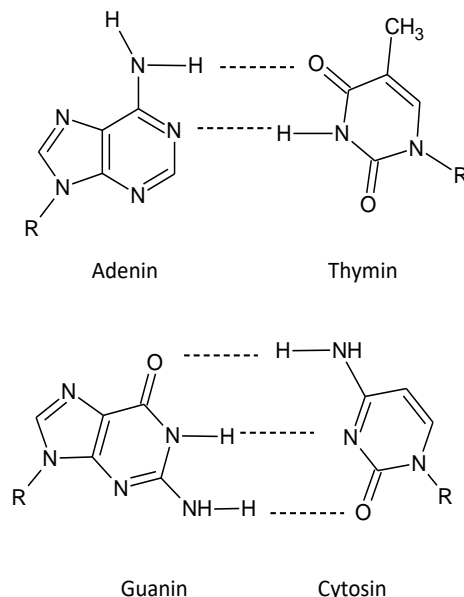


Abbildung 15 Die DNA-Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin

An der 3'-Position jedes Nukleotids ist eine OH-Gruppe vorhanden, welche die Desoxyribose über eine Phosphodiester-Bindung mit dem 5'-Kohlenstoffatom des Zuckers des nächsten Nukleotids verknüpft. Aus dieser Art der Kettenbildung (Primärstruktur) ergeben sich zwei definierte Enden des Nukleinsäure-Moleküls, ein 5'- sowie ein 3'-Ende. Da die DNA als Doppelhelix aufgebaut ist, lagern sich zwei Polynukleotidketten antiparallel zueinander an, d. h. der Leitstrang geht von 3' in 5'-Position und der Folgestrang von 5' in 3'-Position. Das gleichbleibende Rückgrat aus Desoxyriboseeinheiten jedes DNA-Strangs liegt aufgrund der Verknüpfung der Phosphat-Gruppen an der Außenseite der Doppelhelix und hat strukturelle Aufgaben. Weiterhin sind die Phosphat-Gruppen für die stark negative Ladung der DNA verantwortlich. Die Purin- und Pyrimidinbasen sind nach innen gekehrt und Träger der genetischen Information, die in der Sequenz der Basen festgelegt ist. Die in Abbildung 15 dargestellten Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren halten die beiden Ketten zusammen. Zusätzlich wird die Doppelhelix durch Van-der-Waals-Kräfte stabilisiert. Der Helixdurchmesser der Doppelstrang-DNA beträgt 2 nm. Die Struktur der DNA wiederholt sich nach 3,4 nm, so dass eine Windung etwa zehn Basen beinhaltet. Innerhalb der Doppelhelix bilden sich zwei Vertiefungen aus, da die glykosidischen Bindungen eines Basenpaares nicht diametral gegenüberliegen. Die große Furche der DNA ist 1,2 nm breit und 0,85 nm tief, während die kleine Furche lediglich 0,6 nm breit und 0,75 nm tief ist (Abbildung 16) [Karp, 2005].

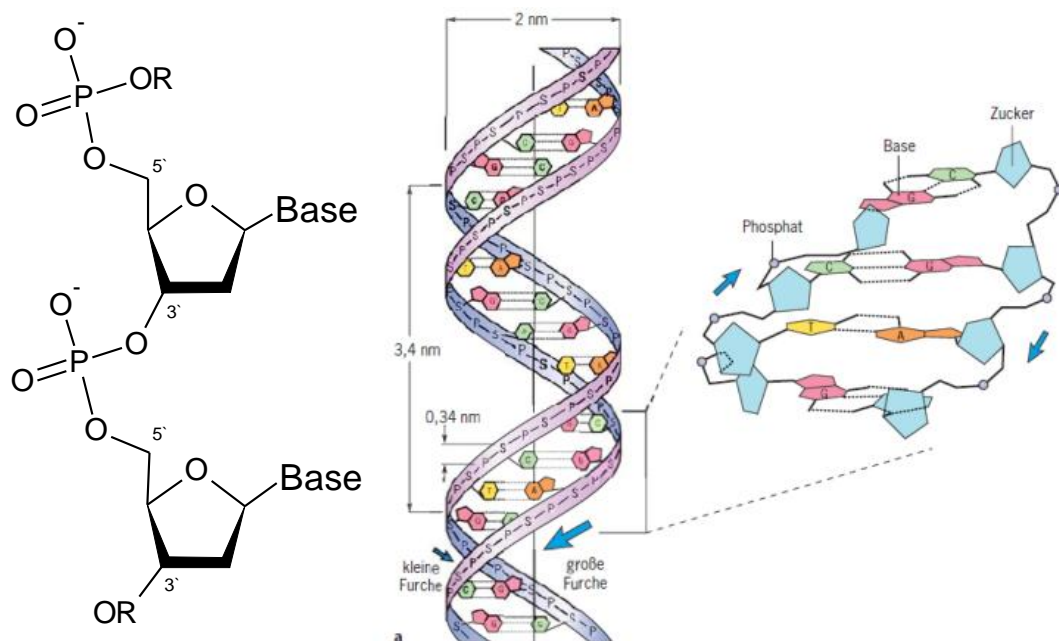


Abbildung 16 Der chemische Aufbau eines kleinen Abschnitts aus einem DNA-Einzelstrang (links) und die DNA-Doppelhelix in schematischer Darstellung mit kleiner und großer Furche (rechts) [Karp, 2005]

2.6.2 DNA-Schäden

Man unterscheidet zwischen direkt gentoxisch wirkenden Stoffen und indirekt gentoxisch wirkenden Stoffen. Zu ersteren zählen z. B. Alkylanzien oder ROS-Induktoren, ihnen ist gemeinsam, dass sie aufgrund ihrer Reaktivität direkt mit der DNA reagieren können. Zu den indirekt gentoxisch wirkenden Stoffen gehören beispielsweise polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe oder Nitrosamine, sie müssen erst durch metabolische Umwandlung aktiviert werden, so dass von den Metaboliten die gentoxische Wirkung ausgeht [Aigner, 2006]. Mögliche Arten von DNA-Schäden, die durch indirekt bzw. direkt gentoxisch wirkende Stoffe hervorgerufen werden können, sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6 Arten von Substanz-induzierten DNA-Schäden mit Beispielen [Vohr, 2010]

DNA-Schäden	Beschreibung	Beispiel
DNA-Addukte	Kovalente Bindung eines (metabolisch aktivierten) Fremdstoffs an DNA-Basen	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, wie Benz[a]pyren
Basenmodifikation	Reaktion von ROS mit DNA-Basen	Bildung von 7,8-Dihydro-8-Oxoguanin durch ROS
AP-Läsionen	Verlust einer Purin- (apurinische Stelle) oder Pyrimidin- (apyrimidinische Stelle) Base	Alkylierende Fremdstoffe wie Methylmethansulfonat
DNA-Strangbruch	Aufgelöste Desoxyribose-Phosphat-Bindung einer oder beider DNA-Stränge	Topoisomeraseinhibitoren, wie Topotecan oder ROS
Quervernetzung	Verbindung zweier Basen innerhalb eines DNA-Strangs, gegenüberliegender Basen oder einer Base mit Proteinen	Bifunktionelle Agentien, wie Tumor-Zytostatika (Cisplatin, Mitomycin C)
Interkalation bzw. nicht-kovalente Bindung	Einlagerung zwischen DNA-Basen (Interkalation) oder an die DNA-Helixwindungen, kann Raumstruktur stören	Flache Moleküle, wie Tumor-Zytostatikum Daunomycin

2.6.3 DNA-Reparaturmechanismen

Durch gewisse Kontrollmechanismen wie Zellzyklus-Arrest oder DNA-Reparaturmechanismen ist die Zelle in der Lage einen entstandenen DNA-Schaden zu beheben. Der Zellzyklus-Arrest findet am Ende der G1-Phase statt, in der die Kontrollpunkte im Zellzyklus für DNA-Schäden liegen. Der Arrest gibt der Zelle Zeit den entstandenen Schaden zu reparieren, bevor sie in die S-Phase eintritt, in der die DNA verdoppelt wird. Die Apoptose oder auch programmierter Zelltod genannt, sorgt für die Eliminierung von Zellen, die einen irreparablen genetischen Schaden erlitten haben und verhindert dadurch die Replikation von beschädigtem Erbgut, welches in Zellen zu unkontrollierter Zellteilung und somit zur Tumorentstehung führen könnte [Karp, 2005]. Verschiedene Reparaturmechanismen sind im Folgenden nach Vohr (2010) zusammengefasst:

- **Direkte Schadenreversion**
Die chemische Änderung an der DNA-Base wird enzymatisch rückgängig gemacht.
- **Basen-Exzisions-Reparatur (BER)**
Die fehlerhafte (z. B. oxidierte oder alkylierte) Base wird zunächst ausgeschnitten unter Bildung einer AP-Stelle. Im Anschluss wird diese Stelle mitsamt einiger (1-10) benachbarter Nukleotide ausgeschnitten und die entstandene freie Stelle anhand der Information im Gegenstrang neu synthetisiert.
- **Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)**
Ein größerer Bereich von etwa 30 Nukleotiden wird aus der DNA ausgeschnitten und anhand der Information im Gegenstrang neu synthetisiert.
- **Mismatch-Reparatur**
Entfernung von Basen-Fehlpaarungen sowie kleiner Insertions- und Deletions-Fehlpaarungen mehrerer Basen. Ablauf prinzipiell ähnlich zu BER bzw. NER.
- **Doppelstrangbruch-Reparatur**
Erfolgt über homologe Rekombination (HR) oder über die fehleranfällige nicht homologe Endenvereinigung (*non-homologous end joining*, NHEJ). Bei HR dient die genetische Information des homologen Chromosoms als Muster, während bei NHEJ die beiden Enden des Doppelstrangbruchs ohne Rücksicht auf Homologie vereinigt werden.

Die Zelle kann sich jedoch auch durch verschiedene Abwehrmechanismen vor DNA-Schäden schützen. Als Beispiel ist das Detoxifizieren von ROS durch Antioxidantien wie Vitamin E oder Vitamin C zu nennen oder auch die bereits in Kapitel 2.5.2.2 erwähnten

redoxsensitiven Enzyme (z. B. SOD, GST) sowie nicht-enzymatischen Radikalfänger (z. B. GSH).

2.6.4 Mutationen

Greifen diese Kontrollmechanismen nicht und es kommt nach einer DNA-Schädigung zur Replikation, wird der Schaden fixiert und als Mutation bezeichnet. Mutationen in somatischen Zellen können zu Veränderungen in der Zellteilung führen und somit gegebenenfalls zu der Entwicklung von Tumoren beitragen. Mutationen in Keimzellen führen zu Veränderungen, die auf die nachkommende Generation übertragen werden können [Eisenbrand & Metzler, 2005]. Je nach Art und Ausmaß der Veränderung des Erbmaterials wird zwischen folgenden Arten von Mutationen unterschieden [Fuhrmann, 2006]:

- **Gen-Mutationen**
 - Basenpaarsubstitutionen (Purin- gegen Purin-Base, Pyrimidin- gegen Pyrimidin-Base bzw. Purin- gegen Pyrimidin-Base)
 - Rastersubstitutionen (Verlust oder Addition einer oder mehrerer Basen)
- **Chromosomen-Mutationen (Aberrationen)**
 - Defizienz (Verlust eines Chromosomenabschnitts)
 - Deletion (Verlust eines terminalen Chromosomenabschnitts)
 - Insertion (Aufnahme eines fremden Chromosomenabschnitts)
 - Duplikation (Verdopplung eines Abschnitts)
 - Inversion (umgedrehte Abschnitte)
 - Translokation (Verschiebung eines Stücks innerhalb eines Chromosomensatzes)
 - Interchange (Austausch von Chromosomenabschnitten zwischen zwei verschiedenen Chromosomen)
- **Genom-Mutation**
 - Verlust eines Chromosoms (Aneuploidie)
 - Addition eines Chromosoms (Polyploidie)

Gen-Mutationen sind im Gegensatz zu Chromosomen- und Genom-Mutationen mikroskopisch nicht nachzuweisen. Des Weiteren führen auch nicht alle Mutationen zu schwerwiegenden Veränderungen innerhalb der Zelle. So kann eine Mutation auch nur minimale oder gar keine Effekte zur Folge haben. Man unterscheidet verschiedene Arten von Mutationen. Stille Mutationen haben keinen Einfluss auf die Genexpression, da der DNA-Schaden in einem nicht-codierenden Bereich liegt. Bei *Missense*-Mutationen kommt

es zwar zum Austausch einer DNA-Base in einem codierenden Bereich, dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Aminosäure. Von einer *Nonsense*-Mutation spricht man bei der Bildung eines Stopcodons, das die Transkription beendet und somit die Expression eines bestimmten Gens hemmt, wodurch die Bildung des entsprechenden Proteins inhibiert wird (Eisenbrand *et al.*, 2005).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Zelluläre Wirkungen traditioneller chinesischer Lebensmittel

3.1.1 Zytotoxische Eigenschaften

Die Bestimmung von zytotoxischen, bzw. wachstumshemmenden Eigenschaften einer Substanz dient in erster Linie der Ermittlung des Konzentrationsbereichs für die Untersuchung weiterer biologischer Endpunkte, da eine Beeinflussung des Zellwachstums dort zu falschpositiven bzw. falschnegativen Ergebnissen führen könnte. Bei der Zytotoxizität kann zwischen Kurzzeit- und Langzeiteffekten unterschieden werden. Eine unspezifische Schädigung der Membran wie beispielsweise durch denaturierende Substanzen kann bereits nach kurzen Zeiträumen detektiert werden. Eine spezifische Schädigung hingegen kann sich durchaus erst nach längerer Inkubationszeit bemerkbar machen. Darunter zählen z. B. Interaktionen mit Rezeptoren oder Signalkaskaden, sowie die Induktion von Apoptose. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Erfassung der Zellvitalität der Resazurin-Reduktionstest im Konzentrationsbereich von 1-1000 µg/ml (1 bzw. 24 h Inkubation) sowie zur Erfassung der Zellviabilität (24 h Inkubation) und der Wachstumshemmung (72 h Inkubation) im Konzentrationsbereich von 10-1000 µg/ml der Sulforhodamin B Test durchgeführt. Als Zellsystem wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie HT29 gewählt.

3.1.1.1 Zellvitalität (Resazurin-Reduktionstest)

Mögliche zytotoxische Effekte der Testsubstanzen können durch Messung der metabolischen Aktivität mittels Resazurin-Reduktionstest bestimmt werden. Intakte, vitale Zellen reduzieren den tiefblauen, nicht fluoreszierenden Farbstoff Resazurin zu seiner fluoreszierenden, pinkfarbenen Form Resorufin. Das Fluoreszenzsignal als Maß für die Zellvitalität wird im Anschluss photometrisch bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm bestimmt (Versuchsdurchführung siehe Kapitel 5.4.4) [O'Brien *et al.*, 2003].

Die relative Zellvitalität der beiden in Nährmedium gelösten Extrakte JS und PE und die Fraktionen (F) F1, F2 und F3 sowie F4, F5 und F6 wurde in Relation zur Mediumkontrolle (100 %) bestimmt. Als Positivkontrolle wurde auf jeder 96-well Platte Saponin (10 %) in N-

Medium verwendet, die zu einer Reduktion der relativen Vitalität auf unter 10 % führte (Daten nicht gezeigt).

Untersuchungen zur Zytotoxizität mittels Resazurin-Reduktionstest des wässrigen Gesamtextrakts aus JS sowie die Fraktionen F1, F2 und F3 sind in Abbildung 17A dargestellt. Extrakt JS und die Fraktionen F1, F2 bzw. F3 zeigten im Konzentrationsbereich von 1-1000 $\mu\text{g/ml}$ sowohl nach 1 h als auch nach 24 h Inkubationszeit keinen Einfluss auf die Zellvitalität in HT29 Zellen. Die höchste Konzentration von 1000 $\mu\text{g/ml}$ konnte aufgrund der geringen zur Verfügung gestandenen Menge an Fraktionen F1 und F2 nicht mehr getestet werden.

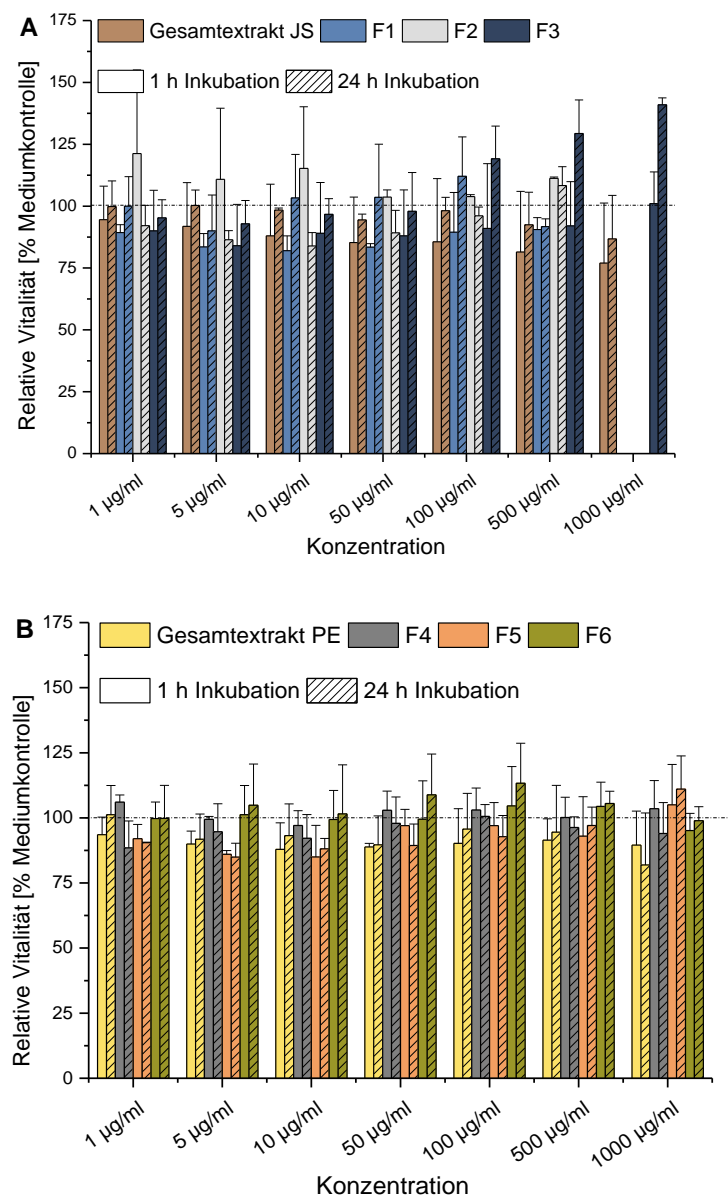


Abbildung 17 Untersuchungen zur Zellvitalität in HT29 Zellen nach 1 bzw. 24 h Inkubation mit Extrakt JS, F1, F2 und F3 (A) bzw. mit Extrakt PE, F4, F5 und F6 (B) im Konzentrationsbereich von 1-1000 $\mu\text{g/ml}$ im Resazurin-Reduktionstest ($n \geq 3$, $MW \pm SD$) im Vergleich zur Mediumkontrolle (100%). Als Positivkontrolle wurde 10 % Saponin verwendet (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse des Resazurin-Reduktionstestes des wässrigen Gesamtextrakts PE sowie F4, F5 und F6 sind in Abbildung 17B dargestellt. Extrakt PE sowie die getesteten Fraktionen beeinflussten im Konzentrationsbereich von 1-1000 µg/ml sowohl nach 1 h als auch nach 24 h Inkubationszeit die metabolische Aktivität von HT29 Zellen nicht.

3.1.1.2 Wachstumshemmung (Sulforhodamin B Test)

Der Sulforhodamin B (SRB) Test ist ein Test zur Bestimmung zytotoxischer bzw. wachstumshemmender Eigenschaften einer Substanz. Der Farbstoff bindet unter mild sauren Bedingungen an basische Aminosäuren von Zellproteinen. Da Zellzahl und Proteingehalt in einem konstanten Verhältnis miteinander stehen, können zytotoxische bzw. wachstumshemmende Eigenschaften einer Substanz im Vergleich zur Mediumkontrolle (100 %) bestimmt werden (Versuchsdurchführung siehe Kapitel 5.4.5) [Skehan *et al.*, 1990].

Aufgrund der geringen zur Verfügung gestandenen Menge der Fraktionen wurden mittels SRB Test lediglich die Gesamtextrakte aus JS bzw. PE getestet. Analog zum Resazurin-Reduktionstest wurden die Extrakte JS und PE direkt im Nährmedium gelöst und die Effekte in Relation zur Mediumkontrolle (100 %) gesetzt. Des Weiteren wurden um Effekte aufgrund eines veränderten Wasserstoffperoxid-Gehalts im Medium zu erfassen, die Inkubation sowohl in Koinkubation mit Katalase (100 U/ml) als auch ohne Katalasezusatz durchgeführt. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass bestimmte Substanzen (z. B. Polyphenole) in der Lage sind, H₂O₂ im Kulturmedium zu generieren [Halliwell, 2000; Esselen *et al.*, 2011]. In vorangegangenen Experimenten von Boettler *et al.* (2011), Bakuradze *et al.* (2010) oder Esselen *et al.* (2011) erwies sich ein Katalase-Zusatz mit einer Konzentration von 100 U/ml im Zellkulturmedium als ausreichend, um die Bildung von artifiziell Wasserstoffperoxid zu hemmen.

Wie in Abbildung 18 zu erkennen, ist nach einer Inkubationszeit von 24 h mit Extrakt JS 1-1000 µg/ml kein zytotoxischer Einfluss auf HT29 Zellen zu beobachten. Ebenso ist kein Unterschied des relativen Zellwachstums mit oder ohne Koinkubation von Katalase zu erkennen (Abbildung 18). Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 72 h führte im Konzentrationsbereich von 10-1000 µg/ml ebenfalls zu keiner wachstumshemmenden Wirkung in HT29 Zellen. Alle Werte der 24 bzw. 72 h Inkubation lagen im Bereich der Mediumkontrolle, somit kann eine zytotoxische und wachstumshemmende Wirkung durch Extrakt JS ausgeschlossen werden. Da sich die Ergebnisse in Anwesenheit von Katalase bei beiden Zeitpunkten nicht unterschieden haben, kann auch ein Beitrag von artifiziell Wasserstoffperoxid auf das Zellwachstum ausgeschlossen werden.

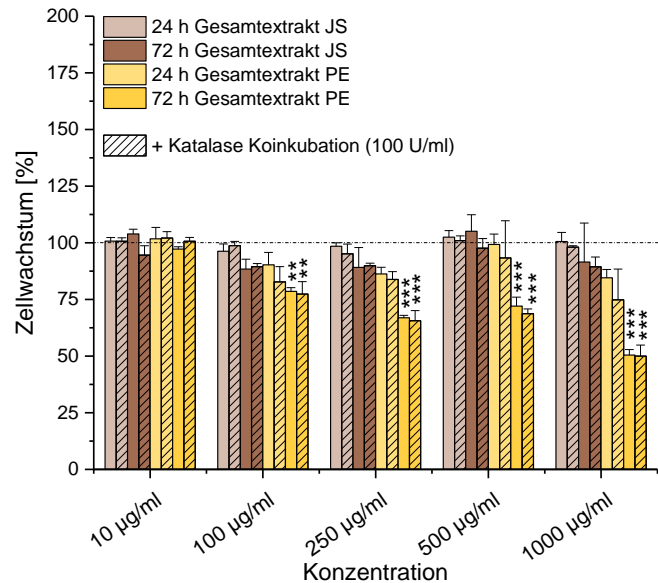


Abbildung 18 Untersuchungen zur Wachstumshemmung in HT29 Zellen nach 24 bzw. 72 h Inkubation mit dem Gesamtextrakt JS (braun) bzw. mit dem Gesamtextrakt PE (gelb) im Konzentrationsbereich von 10-1000 µg/ml ($n \geq 3$, $MW \pm SD$) mit und ohne Katalasezusatz (100 U/ml) im Vergleich zur Mediumkontrolle (100 %). Anova: ** $f < 0,01$, *** $f < 0,001$; * statistischer Unterschied zur geringsten Konzentration (10 µg/ml). Daten aus Diplomarbeit von Kathrin Kunz.

Die Inkubation mit Extrakt PE führte nach 24 h im Konzentrationsbereich bis 1000 µg/ml nur zu einer leichten, nicht signifikanten zytotoxischen Wirkung und reduzierte die relative Zellzahl auf ca. 80 %. Die Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) führte zu keiner Beeinflussung der marginalen zytotoxischen Wirkung (Abbildung 18). Im Gegensatz zur 24 h Inkubation führte eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 72 h zu einer deutlichen Abnahme der Überlebensrate nach Inkubation mit PE. Bereits eine Konzentration von 100 µg/ml PE zeigte eine signifikante wachstumshemmende Wirkung ($f < 0,01$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, die sich im weiteren Konzentrationsverlauf bis 1000 µg/ml verstärkte. In der höchsten Konzentration (1000 µg/ml) überlebten lediglich ca. 50 % der Zellen nach Inkubation mit PE. Einen ähnlich starken Effekt auf die Überlebensrate konnte auch nach Inkubation mit PE in Anwesenheit von Katalase beobachtet werden, so dass die wachstumshemmende Wirkung nicht auf mögliches, artifizielles Wasserstoffperoxid im Medium, sondern auf Bestandteile des Extrakts zurückzuführen sein scheint (Abbildung 18).

3.1.2 Antioxidative Wirkung gegenüber Menadion-induzierter ROS (modifizierter DCF Test)

Mit Hilfe des Dichlorfluorescein (DCF) Tests unter Verwendung eines zweistufigen Inkubationsprotokolls kann die antioxidative Wirkung von Substanzen gegenüber Menadion-induziertem oxidativem Stress untersucht werden. Um die präventive

Schutzwirkung gegenüber intrazellulär gebildetem ROS zu untersuchen, erfolgte zunächst eine 1 bzw. 24 h Vorinkubation im Konzentrationsbereich von 1-1000 µg/ml mit den im Nährmedium gelösten Testsubstanzen mit einer anschließenden Inkubation mit 2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat und darauffolgend mit dem Redoxcyclus Menadion (20 µM), der als Chinon über Redoxcycling intrazelluläre ROS generiert. Die Fluoreszenz wurde zu Beginn der Menadioninkubation und nach 3 h gemessen. Aus der Differenz beider Messungen ließ sich der Fluoreszenzanstieg, verursacht durch die Oxidation des nicht fluoreszierenden 2',7'-Dichlorfluorescein zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorfluorescein, bestimmen. Die Auswertung erfolgte als relative Fluoreszenzintensität in Prozent, bezogen auf die mit Menadion-behandelten Zellen (100 %). Die detaillierte Versuchsdurchführung ist in Kapitel 5.4.6 beschrieben.

Die Inkubation mit den Gesamtextrakten JS und PE und den jeweiligen Fraktionen F1, F2 und F3 bzw. F5 führten sowohl nach 1 h als auch nach 24 h Vorbehandlung im Konzentrationsbereich von 1-1000 µg/ml in HT29 Zellen zu keiner Abnahme der Fluoreszenzintensität und somit zu keiner präventiven Wirkung gegenüber der durch Menadion-induzierten ROS (Abbildung 19). F4 und F6 konnten im modifizierten DCF Test aufgrund der nicht ausreichenden Substanzmenge nicht getestet werden.

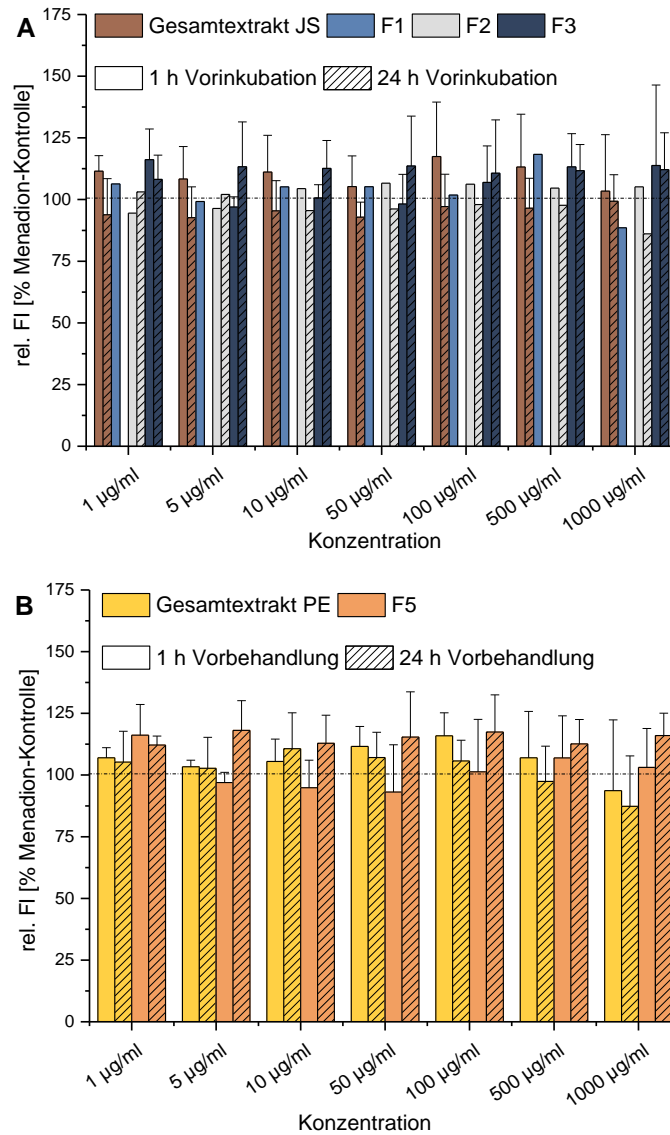


Abbildung 19 Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung des Gesamtextrakts JS sowie F1, F2 und F3 (A) und des Gesamtextrakts PE und der F5 (B) im Konzentrationsbereich von 1-1000 µg/ml in HT29 Zellen nach 1 bzw. 24 h Vorinkubation im modifizierten DCF Test (n=3, MW±SD) im Vergleich zur Menadion (20 µM)-behandelten Kontrolle (100 %).

3.1.3 Modulation des intrazellulären ROS-Status (DCF Test)

Zur Untersuchung des oxidativen Potentials der wässrigen Extrakte von JS bzw. PE wurde die Entstehung von intrazellulär gebildeten ROS in HT29 Zellen verwendet. Die Durchführung eines DCF-Experiments (Behandlung mit Extrakt JS bzw. PE) zeigte einen starken Anstieg des ROS-Gehalts ($\geq 100 \mu\text{g/ml}$), so dass in den folgenden Untersuchungen zum einen der Konzentrationsbereich von 50-500 µg/ml in kleineren Zwischenschritten (50, 100, 175, 250, 325, 400, 500 µg/ml) gewählt wurde und zum anderen analog zum SRB Test die Extrakte zusätzlich in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) getestet wurden, um

nähere Hinweise über die ROS-Induktion zu erhalten. Vergleichbar zum modifizierten DCF Test wird der relative Fluoreszenzanstieg durch Oxidation des nicht fluoreszierenden 2',7'-Dichlorfluorescein zum fluoreszierenden 2',7'-Dichlorfluorescein in Anwesenheit von ROS im Vergleich zur Lösungsmittel-behandelten Kontrolle (100 %) bestimmt. Die Fluoreszenzintensitäten der beiden im Nährmedium gelösten Extrakte aus JS und PE (\pm Katalase) wurden in Relation zur Mediumkontrolle (100 %) gesetzt. Die Versuchsdurchführung ist in Kapitel 5.4.6 beschrieben.

Extrakt JS verursachte einen signifikanten Anstieg ($f < 0,05$) von intrazellulär gebildetem ROS ab einer Konzentration von 175 $\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 20A). Extrakt PE erhöhte ebenfalls ab einer Konzentration von 175 $\mu\text{g/ml}$ mit einem Signifikanzniveau von $f < 0,05$ den intrazellulären ROS-Status (Abbildung 20B). Im weiteren Konzentrationsverlauf bis 500 $\mu\text{g/ml}$ kam es zu einer sehr starken Generierung von ROS bis zu einer relativen Fluoreszenzintensität von $362 \pm 59 \%$ nach Inkubation mit JS und einer relativen Fluoreszenzintensität von $357 \pm 77 \%$ nach Inkubation mit PE, die beide weit über dem Niveau der Positivkontrolle Menadion (20 μM) von $256 \pm 37 \%$ lagen.

In Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) wurde nach Inkubation mit Extrakt JS bis zu einer Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ keine ROS Bildung in HT29 Zellen beobachtet (Abbildung 20A, schraffierte Balken). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die zuvor detektierte ROS-Entstehung mit einer möglichen Reaktion zwischen Inhaltsstoffen des Extrakts und Bestandteilen des Zellkulturmediums unter Entstehung von H_2O_2 im Zusammenhang steht und nicht direkt auf die Inkubation mit JS zurückzuführen ist.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Extrakt JS wurde die ROS Entstehung in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) nach Inkubation mit Extrakt PE nicht vollständig gehemmt (Abbildung 20B, schraffierte Balken). Ab einer Konzentration von 325 $\mu\text{g/ml}$ wurde trotz der Katalase-Koinkubation ein signifikanter Anstieg ($f < 0,05$) des intrazellulären ROS-Spiegels beobachtet, der sich jedoch im weiteren Konzentrationsverlauf bis 500 $\mu\text{g/ml}$ in Anwesenheit von Katalase als niedriger erwies als ohne Katalasezusatz. Die höchste Konzentration an Extrakt PE (500 $\mu\text{g/ml}$) mit Katalasezusatz erreichte eine relative Fluoreszenzintensität von $261 \pm 64 \%$ und kann somit auf Bestandteile des Extrakts zurückgeführt werden.

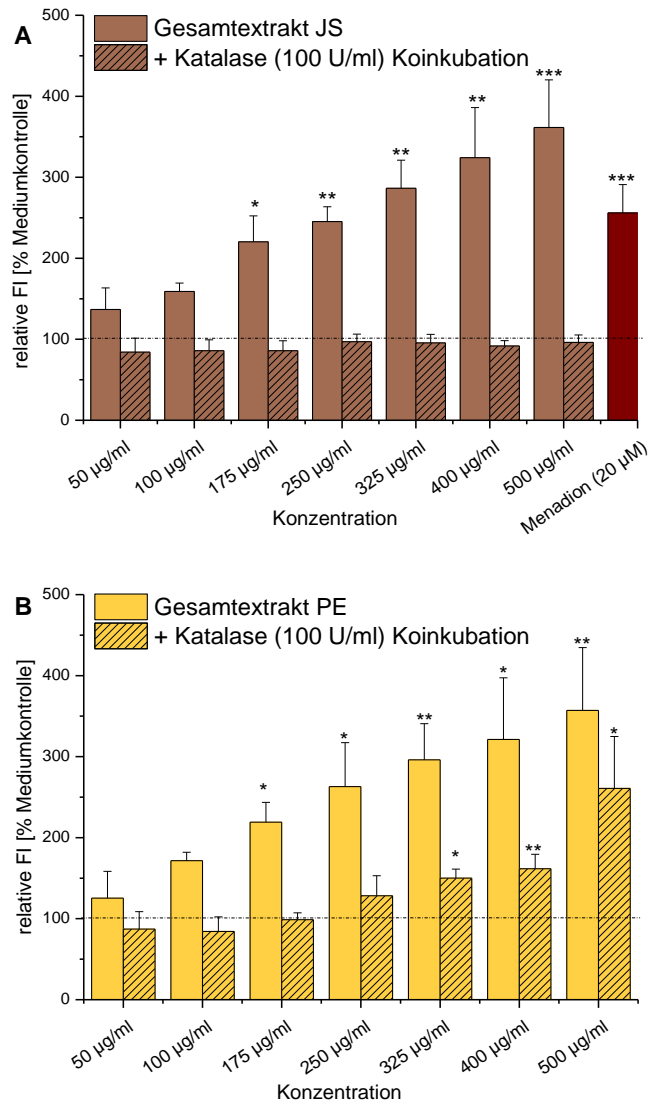


Abbildung 20 Untersuchungen zur ROS-Entstehung des Gesamtextrakts JS (A) bzw. PE (B) im Konzentrationsbereich von 50-500 µg/ml ± Katalase-Koinkubation (100 U/ml) in HT29 Zellen nach 3 h Inkubationszeit im DCF-Test (n≥3, MW±SD) im Vergleich zur Mediumkontrolle (100 %). Menadion (20 µM, 0,5 % DMSO) diene als Positivkontrolle. FI: Fluoreszenzintensität. Anova: *f<0,05 **f<0,01 ***f<0,001; * statistischer Unterschied zur geringsten Konzentration (50 µg/ml) bzw. zur 0,5 % DMSO-Kontrolle (Menadion).

3.1.4 Gentoxische Eigenschaften (Comet Assay)

Zur Bestimmung des gentoxischen Potentials der Gesamtextakte JS und PE nach 24 h Inkubation in HT29 Zellen wurde der Comet Assay, auch Einzelzellgelelektrophorese genannt, verwendet. Die in Agarose eingebetteten HT29 Zellen werden lysiert und die nackte DNA bei pH = 13 denaturiert. Dadurch bleibt der ursprüngliche räumliche Aufbau der DNA in Schleifen erhalten. Entsteht ein DNA-Schaden in Form eines DNA-Strangbruchs, ist diese DNA-Schleife entspannter und kann im elektrischen Feld weiter zur Anode wandern als intakte DNA. Nach Anfärben der DNA mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff

Ethidiumbromid, können die DNA-Schäden unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Weiterhin wurde der Assay mit einer zusätzlichen Behandlung mit dem Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) durchgeführt. FPG erkennt oxidierte DNA-Basen, insbesondere 8-Oxoguanin, und entfernt diese aus dem DNA-Strang [Collins *et al.*, 2013]. Die zusätzlich entstandenen Einzelstrangbrüche im Vergleich zur nicht mit FPG-behandelten Kontrolle dienen somit als Maß für oxidative DNA-Schäden. Aufgrund der im DCF Test ermittelten Ergebnisse wurden alle weiteren Untersuchungen mit den beiden Extrakten in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) durchgeführt, um falschpositive Effekte ausschließen zu können (siehe Kapitel 5.4.7).

Der Extrakt JS wies im Comet Assay nach einer Inkubationszeit von 24 h eine DNA-schädigende Wirkung in der höchsten getesteten Konzentration von 1000 µg/ml auf. Die zusätzliche Behandlung mit dem Reparatur-Enzym FPG führte zu einer leichten, signifikanten Erhöhung an DNA-Schäden (Abbildung 21A). Extrakt PE (≥ 500 µg/ml) verursachte in HT29 Zellen nach 24 h Inkubation zu einem signifikanten Anstieg ($f < 0,01$) der DNA-Strangbruchrate im Comet Assay. Zusätzlich induzierte Extrakt PE in der höchsten getesteten Konzentration von 1000 µg/ml signifikant den Status an FPG-sensitiven DNA-Strangbrüchen im Vergleich zu den lediglich mit Extrakt PE inkubierten HT29 Zellen ($f < 0,05$). Dies könnte auf DNA-Schäden hindeuten, die in der höchsten Konzentration (1000 µg/ml) durch oxidativen Stress verursacht wurden (Abbildung 21B).

Ein Vergleich der Ergebnisse aus Comet Assay und DCF Assay lässt einen Zusammenhang zwischen der Entstehung von ROS und dem DNA-schädigenden Potential des Gesamtexttrakts PE in den höheren getesteten Konzentrationen (≥ 500 µg/ml) erkennen.

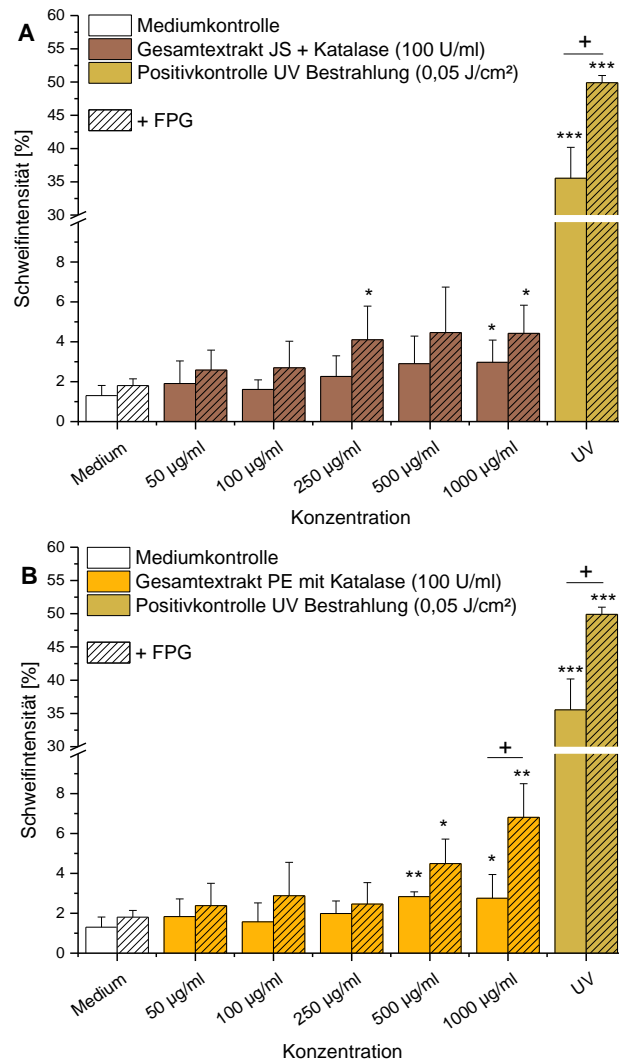


Abbildung 21 DNA-schädigende Wirkung des Gesamtexttrakts JS (A) und PE (B) im Konzentrationsbereich von 50-1000 µg/ml in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) ± FPG-Behandlung in HT29 Zellen nach 24 h Inkubationszeit im Comet Assay (n≥3, MW±SD). UV Licht (λ=312 nm; 0,05 J/cm²) diente als Positivkontrolle. (Anova: *f<0,05 **f<0,01 ***f<0,001; * statistischer Unterschied zur Mediumkontrolle; + statistischer Unterschied ± FPG).

3.1.5 Mutagene Wirkungen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)-Test

Die Entstehung von Mutationen sind in Kapitel 2.6.4 bereits erläutert worden. Eine detaillierte Versuchsdurchführung ist in Kapitel 5.4.8 zu finden. Der HPRT Test ist eine OECD (*Organisation for Economic Cooperation and Development*) Richtlinie und wird in Sektion 4, Nummer 476 "Testung von Chemikalien" beschrieben. Standardgemäß wird der HPRT Test in V79 Zellen durchgeführt [OECD, 1997].

Aufgrund der leichten DNA-schädigenden Wirkung beider Gesamtextrikte, insbesondere des Lebensmittelextrakts PE, wurden diese auf ein potentiell mutagenes Potential im HPRT

Test untersucht. Die Extrakte aus JS und PE wurden in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) direkt im Nährmedium gelöst und für 24 h inkubiert.

Sowohl Extrakt JS als auch Extrakt PE zeigten im Konzentrationsbereich von 100-1000 µg/ml im HPRT Test kein mutagenes Potential, lediglich die Inkubation mit der Positivkontrolle *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG, 20 µM) führte zu einem starken Anstieg der Mutationsfrequenz auf 1347 ± 94 % mit einer statistischen Signifikanz von $f < 0,001$ (Abbildung 22). Ein Absterben der Zellen bzw. Mutanten nach Inkubation mit den Gesamtextrakten kann ausgeschlossen werden, da parallel zur Bestimmung der Mutationsfrequenz die sogenannte "*cloning efficiency*" im HPRT Test mitbestimmt wurde, die potentielle, zytotoxische Effekte der Testsubstanz identifiziert hätte.

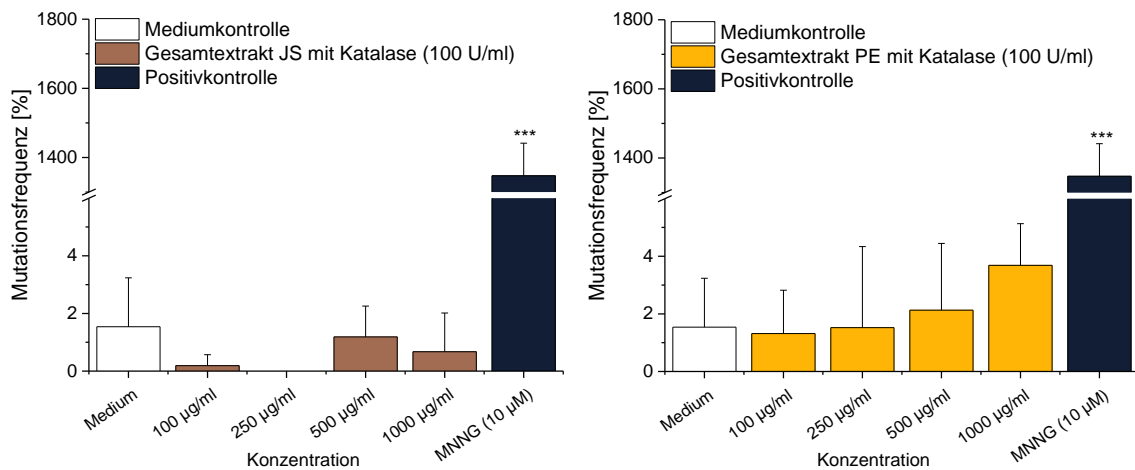


Abbildung 22 Bestimmung der mutagenen Eigenschaften des Extrakts JS (A) bzw. PE (B) in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) im Konzentrationsbereich von 100-1000 µg/ml nach 24 h Inkubation in V79 Zellen im HPRT Test (n=2, MW±range). *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) (20 µM) diente als Positivkontrolle. Anova: *** $f < 0,001$; * statistischer Unterschied zur Mediumkontrolle.

3.1.6 Einfluss auf die Genexpression von Nrf2 und Phase II Enzyme (QT-PCR)

Zelluläre Abwehr gegen oxidativen Stress oder Elektrophile wird hauptsächlich über den Nrf2/ARE-Signalweg reguliert. Inaktives Nrf2 wird im Zytosol durch das Actin-gebundene Protein Keap1 kontrolliert. In Anwesenheit von oxidativen oder elektrophilen Stimuli wird die Bindung zwischen Keap1 und Nrf2 gelöst und Nrf2 kann in den Zellkern translozieren. Dort fungiert Nrf2 als Transkriptionsfaktor, indem es an die ARE Region redoxsensitiver Gene bindet. Wird die Ablesung eines bestimmten Gens in Folge einer Substanzinkubation induziert, kann mittels quantitativer Realtime-PCR (QT-PCR) die Anzahl an mRNA-Kopien, die in der Zelle vorliegen mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green quantifiziert werden (vgl. Kapitel 5.4.10).

Da im Rahmen des Kooperationsprojekts die Überprüfung der Gesamtextrakte JS und PE auf potentiell antioxidative Effekte im Vordergrund stand, wurden diese auf ihren Einfluss auf Nrf2 selbst sowie auf die redoxsensitiven Gene UGT1A1, γ -GCL, GSTA1 und GSTT1 mittels QT-PCR in HT29 Zellen untersucht. Die Extrakte wurden in der Kurzzeit-Inkubation (3 h, analog zum DCF Test) und in der Langzeitinkubation (24 h) im Konzentrationsbereich von 50-1000 $\mu\text{g/ml}$ untersucht.

Wie in Abbildung 23A und B zu erkennen, zeigten Extrakt JS und Extrakt PE nach 3 h Inkubation im untersuchten Konzentrationsbereich von 50-1000 $\mu\text{g/ml}$ keinen Effekt auf die Genexpression von Nrf2 in HT29-Zellen. Die relativen Nrf2-Transkriptionsraten beider Extrakte lagen im Bereich der unbehandelten Mediumkontrolle (rel. Transkription = 1). Auch nach einer verlängerten Inkubationszeit von 24 h beeinflussten JS und PE die Nrf2-Transkription im gewählten Konzentrationsbereich (Abbildung 23C und D) nicht. Auch auf die Genexpression von γ -GCL sind nach 3 h sowie nach 24 h Behandlung mit Extrakt JS bzw. mit Extrakt PE keine signifikanten Effekte zu erkennen (Abbildung 23).

Des Weiteren wurden nach 3 h Inkubation mit Extrakt JS keine Induktion der Transkription der UGT1A1 beobachtet (Abbildung 23A). Die relative Transkription unterschied sich nur geringfügig von der Mediumkontrolle. Wohingegen nach 24 h die UGT1A1-Transkription ab der geringsten Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ JS im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht war und einen Wert von $1,5 \pm 0,0$ ($f < 0,001$) erreichte. Die höchste Konzentration (1000 $\mu\text{g/ml}$) zeigte eine Steigerung der Transkriptionsrate auf $2,1 \pm 0,3$ mit einem Signifikanzniveau von $f < 0,05$ und scheint somit biologisch relevant zu sein (Abbildung 23C). Die Inkubation mit Extrakt PE erhöhte nur nach 3 h und in der höchsten Konzentration (1000 $\mu\text{g/ml}$) die relative Transkription von UGT1A1 auf einen Wert von $1,9 \pm 0,2$. Nach einer verlängerten Inkubationszeit war dieser Effekt allerdings aufgehoben (Abbildung 23B und D).

Weiterhin wurden die Lebensmittelextrakte aus JS bzw. PE auf ihren Einfluss auf GSTA1 sowie GSTT1 untersucht. Eine 3 h Inkubation von HT29 Zellen mit JS modulierte die Transkription der GSTA1 nicht (Abbildung 23A). Extrakt PE (500 $\mu\text{g/ml}$) erhöhte nach 3 h marginal aber nicht signifikant die GSTA1-Transkription (Abbildung 23B). In der höchsten eingesetzten Konzentration von 1000 $\mu\text{g/ml}$ war dieser Effekt nicht mehr zu erkennen, so dass aufgrund der fehlenden Dosis-Wirkungsbeziehung und mathematischen Signifikanz die biologische Relevanz des Effektes bei der Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ ausgeschlossen werden kann. Nach 24 h Inkubation mit Extrakt JS in der höchsten Konzentration (1000 $\mu\text{g/ml}$) konnte ein deutlicher Anstieg der relativen Transkription von GSTA1 auf einen Wert von $2,3 \pm 0,4$ gemessen werden (Abbildung 23C). Dabei handelte es sich um eine

statistisch signifikante Erhöhung mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$, welche auch einen biologisch bedeutsamen Effekt darstellt. Extrakt PE hingegen erhöhte im gesamten Konzentrationsverlauf die GSTA1-Genexpression bis zu einer Konzentration von 1000 $\mu\text{g/ml}$ auch nach verlängerter Inkubationszeit von 24 h nicht (Abbildung 23D).

Auf die Genexpression von GSTT1 wurde nach 3 bzw. 24 h Inkubation mit den Extrakten JS und PE keine Modulation festgestellt (Abbildung 23). Die Erniedrigung der GSTT1-Genexpression auf einen Wert von $0,7 \pm 0,1$ durch den Extrakt aus JS (250 $\mu\text{g/ml}$) nach 24 h scheint nicht von biologischer Relevanz zu sein, da diese im weiteren Konzentrationsverlauf bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ wieder auf das Niveau der Lösungsmittelkontrolle ansteigt (Abbildung 23C).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nach 24 h Inkubation mit Extrakt JS ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ die relative Transkription von UGT1A1 signifikant anstieg und sich im weiteren Konzentrationsverlauf bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ noch weiter verstärkte. Außerdem erhöhte die höchste Konzentration von Extrakt JS (1000 $\mu\text{g/ml}$) nach 24 h signifikant den GSTA1-Transkriptionsstatus. Nach Inkubation mit Extrakt PE führte nur die 3 h Inkubation in der höchsten Konzentration von 1000 $\mu\text{g/ml}$ zu einem Anstieg der UGT1A1-Transkription. Die Transkription für die Gene Nrf2, GSTT1 und GCLC wurden durch beide Extrakte nach 3 bzw. 24 h im untersuchten Konzentrationsbereich nicht reguliert.

Im Rahmen des Kooperationsprojekts konnten von der Arbeitsgruppe Zhou mittels GC/MS-Analyse in den beiden wässrigen Gesamtextrakten eine Vielzahl von Inhaltsstoffen detektiert werden (Kapitel 2.1.3.3 und 2.1.3.4). Da eine antioxidative Wirksamkeit der traditionellen, chinesischen Lebensmittel im Vordergrund des Kooperationsprojekts stand, wurden die Einzelsubstanzen Pyrazin, 2-Methylpyrazin sowie 2,6-Dimethylpyrazin zur weiteren Untersuchung ihres potentiellen Einflusses auf den Nrf2/ARE-Signalweg ausgewählt. Zum einen gibt es bereits Hinweise aus der Literatur im Hinblick auf mögliche antioxidative Effekte einzelner Pyrazine, wie z. B. Tetramethylpyrazin [Li *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2003], zum anderen konnte u. a. die Entstehung von Pyrazinen im Kaffee nachgewiesen werden [Pickard *et al.*, 2013], die im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit eine Rolle spielten.

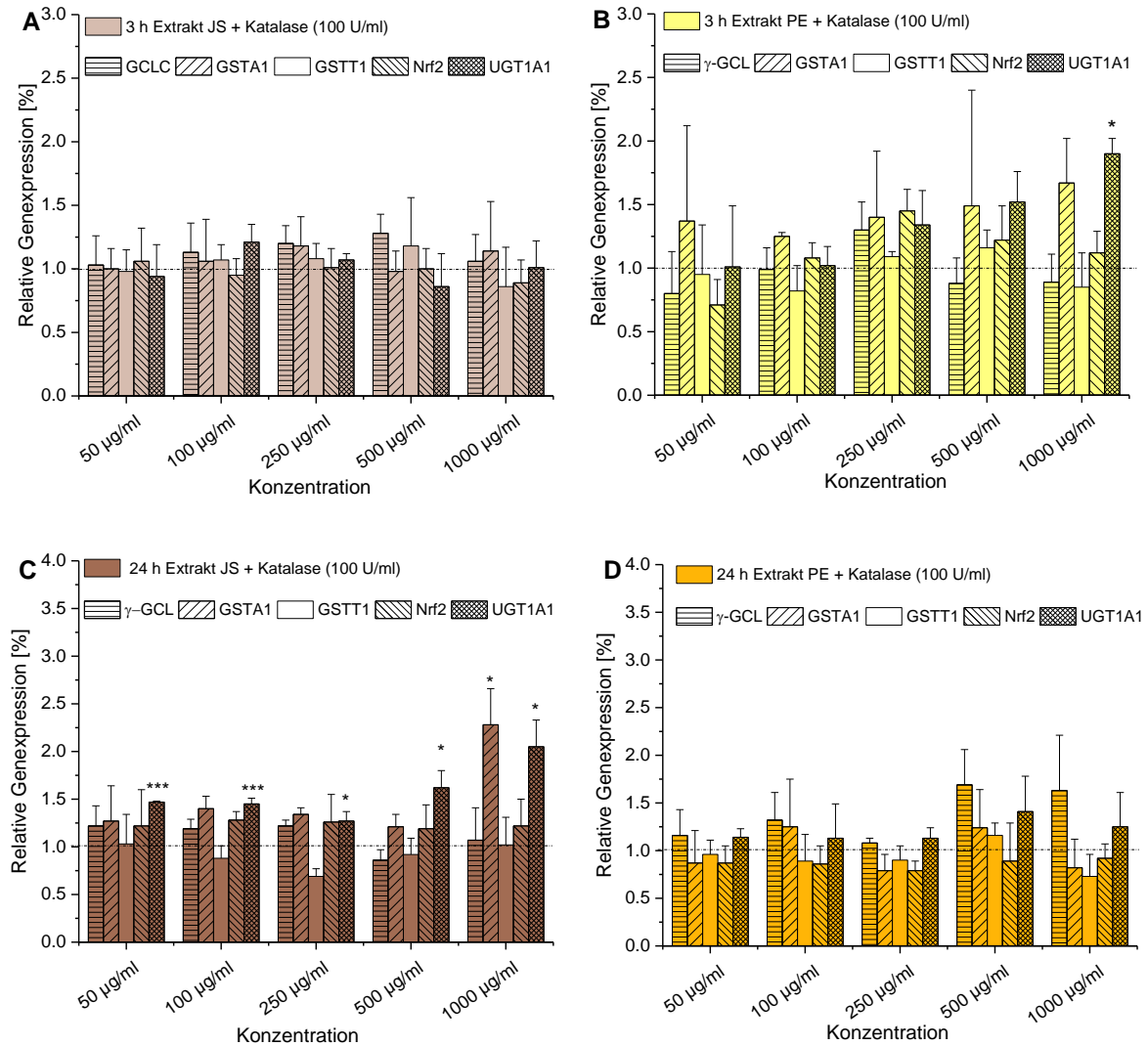


Abbildung 23 Modulation der relativen Transkription nach der 3 h Inkubation mit dem Extrakt JS (A) bzw. PE (B) sowie nach der 24 h Inkubation mit Extrakt JS (C) bzw. PE (D) im Konzentrationsbereich von 50-1000 µg/ml in HT29 Zellen bestimmt mittels quantitativer RealTime PCR (n≥3, MW±SD). Als Kontrolle diente Medium (rel. Transkription = 1). Normalisiert wurde auf β-Aktin als „housekeeping gene“. Anova: *f<0,05 statistischer Unterschied zur Mediumkontrolle. Daten aus Diplomarbeit von Kathrin Kunz

Wie in Abbildung 24A, C und E zu erkennen, zeigten Pyrazin, 2-Methylpyrazin und 2,6-Dimethylpyrazin nach 3 h Inkubation im untersuchten Konzentrationsbereich von 1-1000 µM keinen Effekt auf die Genexpression von γ-GCL, GSTA1 und UGT1A1. Die relativen Transkriptionsraten dieser Gene lagen im Bereich der unbehandelten Kontrolle (1 % PBS). Nach 3 h Inkubation mit Pyrazin sowie mit 2-Methylpyrazin konnte eine marginale Erhöhung der GSTT1- sowie der Nrf2-Transkriptionsrate beobachtet werden, die jedoch nicht von biologischer Bedeutung sind.

Auch nach einer Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 h konnte im Konzentrationsbereich von 1-1000 µM mit Pyrazin keine Beeinflussung der Nrf2-

Transkription sowie der Genexpression redoxsensitiver Gene beobachtet werden (Abbildung 24B).

Nach der Inkubation mit 2-Methylpyrazin kam es nach 24 h in der niedrigsten Konzentration von 1 μM zu einem nicht signifikanten Anstieg der UGT1A1-Transkription auf $2,0 \pm 0,9$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle, die jedoch im weiteren Konzentrationsverlauf bis 1000 μM auf eine relative Genexpression von $1,4 \pm 0,1$ wieder abfiel (Abbildung 24D). In der höchsten Konzentration von 1000 μM erhöhte 2-Methylpyrazin auch die Transkription der anderen Genen (GSTA1, GSTT1, Nrf2 und γ -GCL) um das 1,5-fache im Vergleich zur Kontrolle, die jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung nicht von biologischer Relevanz zu sein scheint.

Des Weiteren führte die 24 h Inkubation mit 2,6-Dimethylpyrazin bis 1000 μM zu keinem Anstieg der relativen Genexpression der untersuchten Gene und Nrf2 selbst. Im gesamten Konzentrationsbereich bewegte sich die relative Transkription auf dem Niveau der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 24F).

Zusammengefasst modulierten die drei Einzelverbindungen Pyrazin, 2-Methylpyrazin und 2,6-Dimethylpyrazin bis zu einer Konzentration von 1000 μM die untersuchten Gene UGT1A1, GSTA1, GSTT1, Nrf2 und γ -GCL nach 3 bzw. 24 h Inkubationszeit nicht.

Ergebnisse und Diskussion

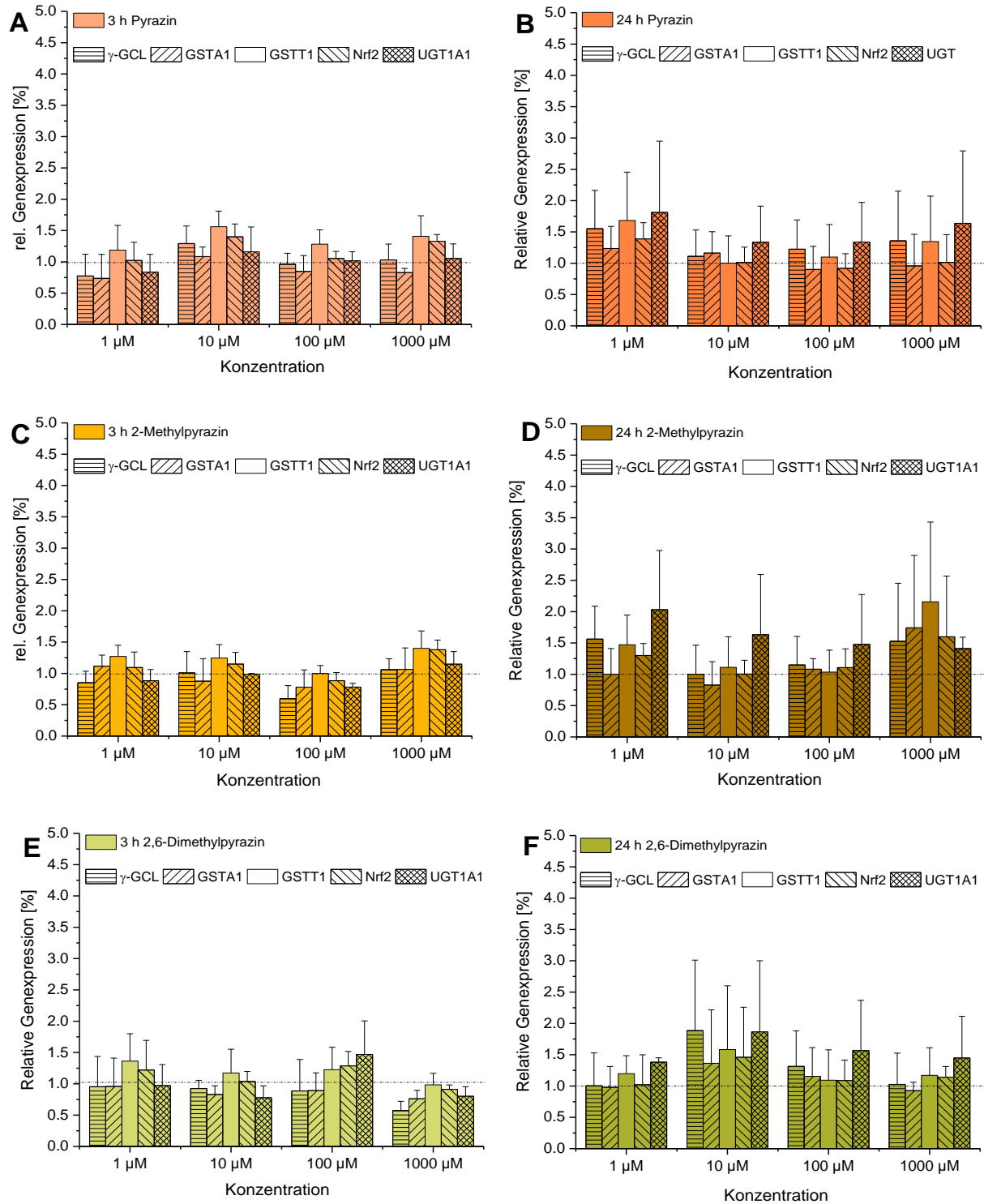


Abbildung 24 Modulation der relativen Transkription nach 3 bzw. 24 h Inkubation mit Pyrazin (A bzw. B), 2-Methylpyrazin (C bzw. D) und 2,6-Dimethylpyrazin (E bzw. F) im Konzentrationsbereich von 1-1000 µM in HT29 Zellen bestimmt mittels quantitativer RealTime PCR (n≥3, MW±SD). Als Kontrolle dient 1 % PBS im Endansatz (rel. Transkription = 1). Normalisiert wurde auf β-Aktin als „housekeeping gene“.

3.1.7 Diskussion der zellulären Effekte von Extrakten traditioneller chinesischer Lebensmittel

Weder die getesteten Gesamtextrakte JS bzw. PE noch die Fraktionen zeigten in den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Testsystemen die postulierten, antioxidativen Eigenschaften. Die wässrigen Gesamtextrakte JS bzw. PE sowie F1, F2, F3 und F5 induzierten im untersuchten Zellsystem HT29 keine antioxidative Schutzwirkung gegenüber eines Menadion-induzierten oxidativen Stresses. Auch die Ergebnisse des zellfreien TEAC Tests zur Überprüfung der direkten antioxidativen Kapazität von Stoffen oder Extrakten, der im Rahmen einer Masterarbeit im Arbeitskreis durchgeführt wurde, ließen im Vergleich zur Referenzsubstanz Trolox keine antioxidative Wirkung der Extrakte vermuten und korrelierten somit mit den Ergebnissen des antioxidativen DCF Tests [Masterarbeit, Sara Lehr]. Von Melanoidinen wurden allerdings bereits antioxidative Effekte in der Literatur berichtet. So führte die Vorbehandlung (2 bzw. 20 h) mit zuvor mit Pepsin verdauten Kaffee-Melanoidinen (0,5-10 µg/ml) zu einem vollständigen Ausbleiben der zytotoxischen Wirkung von *tert*-Butylhydroperoxid. Weiterhin schützte die Vorbehandlung teilweise vor einer Reduktion der GSH-Konzentration bzw. vor einem Anstieg des Malondialdehyd-Spiegels, die durch *tert*-Butylhydroperoxid in HepG2 Zellen (Zellen eines humanen Leberzellkarzinoms) hervorgerufen wurden [Goya *et al.*, 2007]. In einer weiteren Studie an HT29 Zellen konnte gezeigt werden, dass Melanoidin-Fractionen aus Kaffee, die ebenfalls einem Verdau mit Pepsin unterzogen wurden, eine größere Schutzwirkung gegenüber Menadion-verursachten DNA-Schäden im Comet Assay zeigten als die Melanoidine, die unverdaut inkubiert wurden. Daraus schließen die Autoren eine Modifikation der Melanoidine durch den Verdau, die mit einer stärkeren DNA-schützenden Wirkung einhergeht [Pino-García *et al.*, 2012]. Faist *et al.* (2002) untersuchten den Einfluss von Malz-Melanoidinen in Caco-2 Zellen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts und konnten insbesondere für die Melanoidine mit einem Molekulargewicht von 10.000 Da eine Erhöhung der GST-Aktivität von rund 33 % im Vergleich zur Kontrolle nachweisen. Möglicherweise ist das Ausbleiben der antioxidativen Wirkung der Extrakte aus JS bzw. PE u. a. damit zu erklären, dass die hochmolekularen Melanoidin-Fractionen in den zur Verfügung gestellten Extrakten nicht enthalten waren, da diese bei der Herstellung mittels Ultrafiltration aufgereinigt wurden und somit überwiegend niedermolekulare Verbindungen enthielten (< 5000 Da).

Im Hinblick auf potentielle, negative Eigenschaften wurde neben der Entstehung von ROS und der Erfassung möglicher DNA-Schäden und Mutationen auch die Zytotoxizität der Extrakte und deren Fraktionen in Form von Zellvitalität und Wachstumshemmung

bestimmt. Beide Extrakte bis zu einer Konzentration von 1000 µg/ml beeinflussten die relative Zellvitalität nach 1 bzw. 24 h Inkubationszeit nicht. Ebenso war mittels SRB Test kein zytotoxischer Effekt in HT29 Zellen nach Inkubation mit dem Extrakt JS bis 1000 µg/ml nach 24 h sowie kein wachstumshemmender Effekt nach 72 h zu verzeichnen. Lediglich die Langzeitinkubation (72 h) mit dem Extrakt PE führte zu einem Rückgang des Zellwachstums in Konzentrationen ≥ 100 µg/ml. Der IC_{50} -Wert mit und ohne Katalasezusatz beträgt ca. 1000 µg/ml. Demnach kann nach 72 h von einer Hemmung der Proliferation durch den Extrakt PE ausgegangen werden, da keine zytotoxischen Effekte nach einer Inkubationszeit von 24 h aufgetreten sind. Auch der chinesische Kooperationspartner testete den wässrigen Extrakt PE in einer Konzentration von 1000 µg/ml in Ana-1 Zellen (murine Makrophagen) mittels LDH leakage Test (Freisetzung von Laktatdehydrogenase) und konnte zytotoxische Effekte im Vergleich zur Mediumkontrolle beobachten [Zhou *et al.*, 2015]. Im Gegensatz dazu konnte die Arbeitsgruppe jedoch auch zeigen, dass von einzelnen Fraktionen der Gesamtextrakte aus JS bzw. PE in sehr hohen Konzentrationen von bis zu 8 mg/ml eine Schutzwirkung gegenüber einer Wasserstoffperoxid-vermittelten Zytotoxizität in MGC-803 Zellen (humane Magentumor-Zelllinie) ausging [Persönliche Mitteilung Prof. Zhou].

Neben der Beeinflussung des Zellwachstums wurden die Extrakte JS bzw. PE mittels DCF Test auf eine potentielle Induktion von intrazellulären ROS in HT29 Zellen untersucht. Der Extrakt JS induzierte hoch signifikant den konzentrationsabhängigen Gehalt an intrazellulären ROS. Dieser Effekt wurde jedoch in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) vollständig gehemmt. Dies deutet darauf hin, dass artifizielle ROS im Zellkulturmedium akkumulieren und somit die beobachteten Effekte nicht substanzbedingt zu erklären sind. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Polyphenole im Zellkulturmedium nicht stabil sind und mit Bestandteilen aus dem Kulturmedium unter Entstehung von Wasserstoffperoxid oder anderen Oxidationsprodukten reagieren. Dabei spielen insbesondere Metallionen und Hydrogencarbonat als Bestandteile des Mediums eine bedeutende Rolle [Bellion *et al.*, 2009; Halliwell *et al.*, 2010]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Extrakt JS wurde die ROS-Entstehung in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) nach Inkubation mit Extrakt PE nicht vollständig gehemmt. Ab einer Konzentration von 325 µg/ml konnte trotz der Katalase-Koinkubation ein signifikanter Anstieg ($f < 0,05$) des intrazellulären ROS-Spiegels beobachtet werden, der jedoch im weiteren Konzentrationsverlauf bis 500 µg/ml in Anwesenheit von Katalase niedriger war als ohne den Katalasezusatz. Die höchste Konzentration an Extrakt PE (500 µg/ml) mit Katalasezusatz erreichte eine relative Fluoreszenzintensität von 261 ± 64 %, die auf dem Niveau der Positivkontrolle Menadion (20 µM) lag.

Um falschpositive Effekte ausschließen zu können, wurden die folgenden Untersuchungen (Comet Assay, HPRT-Test und QT-PCR) in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Untersuchung zur Modulation des ROS-Spiegels konnte nach Inkubation mit den Extrakten vor allem durch den Extrakt PE in Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{g/ml}$ eine signifikante DNA-schädigende Wirkung, insbesondere auch ein Anstieg der FPG-sensitiven Stellen in der höchsten getesteten Konzentration von $1000 \mu\text{g/ml}$ als Marker für oxidative DNA-Schäden beobachtet werden. Extrakt JS wies im Comet Assay nach einer Inkubationszeit von 24 h eine leichte DNA-schädigende Wirkung in der höchsten getesteten Konzentration von $1000 \mu\text{g/ml}$ auf. Die zusätzliche Behandlung mit dem Reparatur-Enzym FPG führte zu einer leichten jedoch statistisch nicht signifikanten Erhöhung an DNA-Schäden. Bei der Erhitzung von Fleisch können in Abhängigkeit von der Temperatur und Erhitzungsdauer sowie von der Art des Fleisches mutagene Substanzen wie z. B. heterozyklische aromatische Amine entstehen. Einige dieser Vertreter, wie 2-Amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]-chinolin oder 2-Amino-3,4-dimethyl-imidazo[4,5-f]-chinolin, zählen mitunter zu den potentesten Mutagenen, die im Ames Test untersucht wurden [Turesky, 2007]. Somit sollte im Anschluss an den Comet Assay überprüft werden, ob sich der DNA-Schaden manifestiert und es folglich zu einer Mutation kommt. Eine mutagene Wirkung konnte jedoch nach 24 h Inkubation mit beiden Lebensmittelextrakten JS und PE im HPRT Test nicht beobachtet werden.

Da die vermehrte Bildung von ROS zu einem Ungleichgewicht in der Zelle und schließlich zu oxidativem Stress führt, wird der Nrf2-Signalweg aktiviert bzw. redoxsensitive Gene hochreguliert, um ROS abzuwehren und unschädlich zu machen (Kapitel 2.5.2.2). Aus diesem Grund wurde die relative Expression von Nrf2 selbst und von den Genen GSTA1, GSTT1, UGT1A1 und γ -GCL mittels QT-PCR nach Inkubation mit den Extrakten aus JS und PE in HT29 Zellen untersucht. Aufgrund der starken Induktion von ROS durch Extrakt PE wäre zu erwarten, dass es nach der Inkubation in der Folge des intrazellulären ROS-Gehalts auch zu einer stärkeren Induktion redoxsensitiver Gene kommt. Diese Annahme konnte jedoch nicht bestätigt werden, es wurde lediglich ein schwacher Einfluss von Extrakt PE auf die UGT1A1-Transkription nach 3 h Inkubation in der höchsten Konzentration ($1000 \mu\text{g/ml}$) beobachtet. Einen stärkeren Effekt auf die UGT1A1-Transkription war nach 24 h Inkubation mit Extrakt JS zu beobachten, der die Transkription ab der geringsten Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ auf einen Wert von 1,5 ($f < 0,001$) erhöhte. Die höchste Konzentration ($1000 \mu\text{g/ml}$) zeigte eine Steigerung der UGT1A1-Transkriptionsrate auf 2,1 mit einem Signifikanzniveau von $f < 0,05$ und scheint insbesondere aufgrund des

konzentrationsabhängigen Anstiegs auch biologisch relevant zu sein. Ebenso hatte die höchste Konzentration des Extrakt JS eine Erhöhung des GSTA1-Levels zur Folge.

Die in den Extrakten aus JS und PE identifizierten Einzelverbindungen Pyrazin, 2-Methylpyrazin und 2,6-Dimethylpyrazin beeinflussten die Transkription von γ -GCL, Nrf2, UGT1A1, GSTA1 und GSTT1 sowohl nach 3 h als auch nach 24 h Inkubation bis zu einer Konzentration von 1000 μ M nicht und scheinen somit für den schwachen Einfluss der Extrakte auf den Nrf2/ARE-Signalweg nicht verantwortlich zu sein.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse, die durch die beiden Extrakte JS und PE in HT29 Zellen beobachtet werden konnte, ist in Tabelle 7 dargestellt. Es lässt sich festhalten, dass insbesondere der Gesamtextrakt aus PE Verbindungen enthält, die im verwendeten Zellmodell HT29 nach einer Inkubationszeit von 3 h oxidativen Stress induziert haben ($\geq 325 \mu\text{g/ml}$) und es folglich zu einer DNA-schädigenden Wirkung ($> 500 \mu\text{g/ml}$) sowie vor allem zu einer Erhöhung von oxidativen DNA-Schäden (1000 $\mu\text{g/ml}$) kam. Auch die Erhöhung der UGT1A1 nach 3 h könnte mit der ROS-Induktion zusammenhängen, da die Zelle Entgiftungsmechanismen hochreguliert, um das intrazellulär gebildete ROS unschädlich zu machen. Des Weiteren lag der IC_{50} -Wert für eine Inkubationszeit von 72 h mit und ohne Katalasezusatz bei einer Konzentration von 1000 $\mu\text{g/ml}$, was darauf hindeutet, dass die entstandenen Schäden durch die ROS-Induktion und den damit verbundenen (oxidativen) DNA-Schäden, zumindest in der Langzeitinkubation von 72 h, zu einer Hemmung der Proliferation geführt haben könnten. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass es in Folge der ROS-Induktion zur Entstehung von quervernetzten Proteinaggregaten kam, die aufgrund ihrer Hydrophobizität ebenso die Zellviabilität beeinträchtigen können, was in der Literatur bereits beschrieben wurde [Shringarpure *et al.*, 2001].

Es konnten im Extrakt PE überwiegend Aldehyde, Ketone und heterozyklische Verbindungen sowie Aromaten identifiziert werden (Kapitel 2.1.3). Als Beispiele wurden in der Literatur Untersuchungen zu AA, 5-HMF und 2-Hexenal überprüft, ob diese einen Beitrag zu den adversen Effekten geleistet haben könnten. In HT29 Zellen hatte eine 5-HMF Konzentration von 300 $\mu\text{g/ml}$ einen Rückgang der Zellproliferation auf rund 67 % zur Folge [Herrero *et al.*, 2012]. Des Weiteren zeigte 5-HMF ein zytotoxisches Potential in V79 ($\text{LC}_{50} = 115 \text{ mM}$) und Caco-2 Zellen ($\text{LC}_{50} = 118 \text{ mM}$) und depletierte konzentrationsabhängig (20-120 mM) den intrazellulären GSH-Spiegel in beiden Zellmodellen. Eine DNA-schädigende Wirkung konnte jedoch im Rahmen dieser Untersuchung bis zu einer Konzentration von 80 mM, in denen noch keine zytotoxischen Effekte auftraten, nicht beobachtet werden [Janowski *et al.*, 2000]. 2-Hexenal zeigte im

Gegensatz zu 5-HMF stärkere zytotoxische Effekte, so dass nach 24 h Inkubationszeit und einer 4 bzw. 5-tägigen Nachbehandlungszeit ein IC_{50} Wert von 16,8 μM berechnet werden konnte. Auch führte 2-Hexenal zu einer potenten GSH-Reduktion (2,5-25 μM) sowie zu DNA-Schäden (0,2-0,5 mM) in V79 bzw. Caco-2 Zellen [Janowski *et al.*, 2000]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch AA in HT29 Zellen auf potentiell adverse Effekte untersucht, der ermittelte IC_{50} -Wert für AA lag bei etwa 1000 μM . Eine prooxidative Wirkung konnte lediglich in der höchsten AA-Konzentration (1000 μM) ohne statistische Signifikanz festgestellt werden. Darüber hinaus induzierte AA ($\geq 500 \mu\text{M}$) DNA-Strangbrüche und erhöhte den Gehalt an FPG-sensitiven DNA-Schäden. Somit zeigten zwar 5-HMF, 2-Hexenal bzw. AA in verschiedenen Zellmodellen adverse Effekte, jedoch erst in deutlich höheren Konzentrationen als sie im Inkubationsmedium während der Inkubation mit Extrakt PE vorlagen und erklären die Wirkungen des Extrakts PE in HZ29 Zellen nicht vollständig.

Die Maillard-Reaktion, der Strecker-Abbau sowie der Fettsäure-Abbau spielen in der Entstehung von Aromen im Lebensmittel eine große Rolle. Vom Kooperationspartner wurden daher größtenteils ungesättigte und gesättigte Aldehyde bzw. Ketone in den niedermolekularen, wässrigen Extrakten JS und PE detektiert. Insbesondere für Aldehyde findet man in der Literatur Hinweise auf einen zytotoxischen Wirkmechanismus aufgrund ihrer Reaktivität, indem sie in der Zelle zu Proteinglykation und zur Entstehung von Proteincarbonylen führen [O'Brien *et al.*, 2005]. Untersuchungen von LoPachin und Gavin (2014) zeigten anhand des HSAB (*hard and soft, acid and base*; harte und weiche, Säuren und Basen)-Konzepts, dass insbesondere kurzkettige Aldehyde sowie gesättigte, langkettige Aldehyde als harte Elektrophile fungieren und beispielsweise mit dem Stickstoff der primären Aminogruppen in der ϵ -Seitenkette von Lysin-Resten reagieren. Im Gegensatz dazu können u. a. α,β -ungesättigte Carbonyle oder Alkenale als weiche Elektrophile betrachtet werden, die dementsprechend weiche, nukleophile Thiol-Gruppen von Cysteinen bevorzugen. Auf der Grundlage des Wirkmechanismus könnten die einzelnen Aldehyde eines Gemischs, wie sie z. B. in einem Extrakt vorkommen, in Wechselwirkung treten und additiv oder synergistisch die Toxizität hervorrufen [LoPachin und Gavin, 2014]. Denkbar wäre dies zumindest für Extrakt PE, bei dem korrelierend zu den Ergebnissen aus dem SRB Test eine Wachstumshemmung beobachtet werden konnte.

Der Extrakt JS zeigte in den verwendeten Testsystemen kaum zelluläre Wirkungen, mit Ausnahme der schwachen DNA-schädigenden Wirkung (1000 $\mu\text{g/ml}$) und des stärkeren Effekts auf die UGT1A1-Transkription ($\geq 50 \mu\text{g/ml}$) sowie GSTA1-Transkription (1000 $\mu\text{g/ml}$), die jedoch nach 1 bzw. 24 h Vorinkubation keine Schutzwirkung gegenüber des Menadion-induzierten oxidativen Stresses im modifizierten DCF Test gezeigt hatte. Die starke ROS-

Induktion konnte in Anwesenheit von Katalase (100 U/ml) vollständig gehemmt werden, so dass davon auszugehen ist, dass Extrakt JS im Gegensatz zu PE keine prooxidativen Verbindungen enthält. Gleichzeitig konnte jedoch auch keine antioxidative Schutzwirkung nachgewiesen werden. Als mögliche Gründe für die marginalen Effekte von Extrakt JS im Vergleich zu Extrakt PE könnte die unterschiedliche Zusammensetzung der Extrakte und damit verbunden potentiell weniger reaktivere Carbonyl und Dicarbonyl-Verbindungen, sowie die Lebensmittelmatrix eine Rolle gespielt haben.

Tabelle 7 Zusammenfassung der Ergebnisse der Extrakte JS bzw. PE in HT29 Zellen

Endpunkt	Inkubationszeit	Extrakt JS	Extrakt PE
Metabolische Aktivität	1 h ± Katalase	-	-
	24 h ± Katalase	-	-
Lebendzellzahl	24 h ± Katalase	-	-
	72 h ± Katalase	-	100 µg/ml ***
ROS-Induktion	3 h	175 µg/ml *	175 µg/ml *
	3 h ± Katalase	-	325 µg/ml *
DNA-Schäden	24 h + Katalase	1000 µg/ml *	500 µg/ml **
Oxidative DNA-Schäden	24 h + Katalase	250 µg/ml *	500 µg/ml *
UGT1A1-Transkription	3 h + Katalase	-	1000 µg/ml *
	24 h + Katalase	50-1000 µg/ml *	-
GSTA1-Transkription	3 h + Katalase	-	-
	24 h + Katalase	1000 µg/ml *	-

Anova: *f<0,05 **f<0,01 ***f<0,001; * statistischer Unterschied zur Mediumkontrolle

3.2 Entstehung und zelluläre Wirkungen eines Acrylamid-Niacin-Addukts

3.2.1 Synthesen

3.2.1.1 Acrylamid-Niacin-Addukt (ANA)

AA und Niacin wurden in destilliertem Wasser gelöst und für 2,5 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung im Eisbad wurde der auskristallisierte Feststoff abfiltriert und als Niacin mittels ^1H -NMR-Spektroskopie charakterisiert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingengt und gegebenenfalls ausfallendes Niacin erneut abfiltriert. Danach wurde das Produkt säulenchromatographisch über Kieselgel aufgereinigt. Als Fließmittel wurde Methanol (20 %) in bidestilliertem Wasser verwendet. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie-Platten überprüft, die zusammengehörenden Fraktionen vereint und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer sowie an der Vakuumpumpe entfernt. Der isolierte Feststoff wurde mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie als *N*-Propanamid-3-carboxy-pyridinium charakterisiert (Abbildung 25).

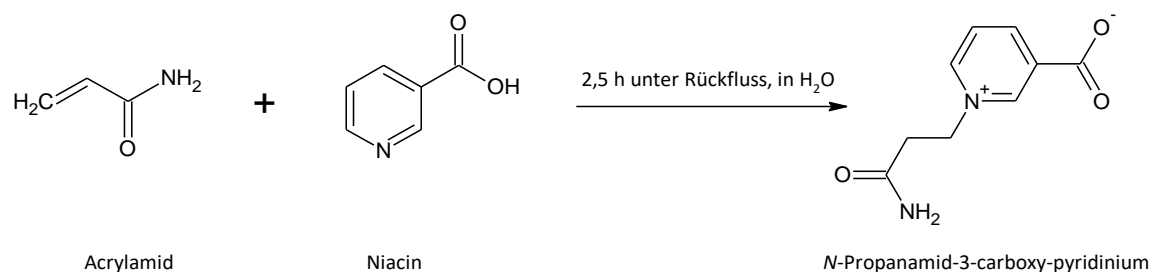


Abbildung 25 Synthese ANA in Anlehnung an Zeng *et al.* (2010)

NMR-Spektroskopische Daten:

^1H -NMR (400 MHz, D_2O , $\delta = 4,78$ ppm): $\delta = 9,22$ (s, 1 H), $\delta = 8,93$ (d, 1 H, $^3J = 6,24$), $\delta = 8,86$ (d, 1 H, $^3J = 8,0$), $\delta = 8,10$ (t, 1 H, $^3J = 7,12$), $\delta = 4,94$ (t, 2 H, $^3J = 6,54$), $\delta = 3,10$ (t, 3 H, $^3J = 6,54$).

^{13}C -NMR (400 MHz, D_2O): $\delta = 132,72$ (C), $\delta = 167,56$ (C), $\delta = 145,61$ (C), $\delta = 145,50$ (C), $\delta = 145,27$ (C), $\delta = 137,24$ (C), $\delta = 127,89$ (C), $\delta = 57,51$ (C), $\delta = 35,31$ (C).

3.2.1.2 Deutiertes Acrylamid-Niacin-Addukt (ANA-d₃)

2,3,3-d₃-AA und Niacin wurden in destilliertem Wasser gelöst und für 2,5 h in einem Thermoblock unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde analog zur Aufbereitung des nicht deuterierten Addukts über eine Kieselgel-Kartusche aufgereinigt. Das Lösungsmittel der entsprechenden Fraktionen wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der ausgefallene Feststoff nochmals gefriergetrocknet. Der isolierte Feststoff wurde mittels LC-MS/MS als *N*-2,2,3-d₃-Propanamid-3-carboxy-pyridinium charakterisiert (Abbildung 26, Abbildung 28).

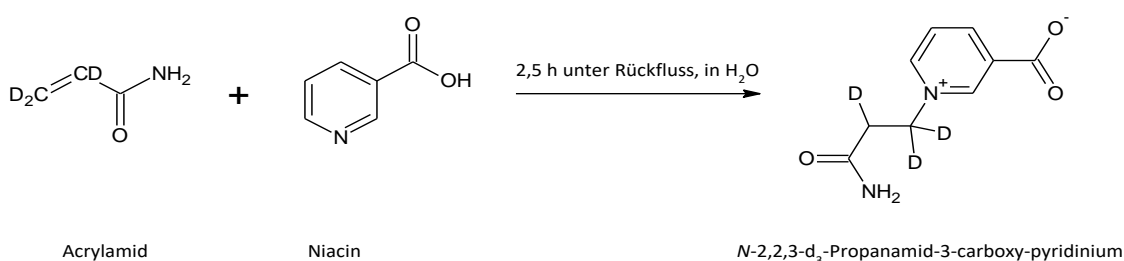


Abbildung 26 Synthese ANA-D₃

3.2.1.3 *N*-Propanamidpyridinium (PAP)

3-Chlorpropanamid wurde in Pyridin gelöst und für 10 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde mit Toluol gewaschen, um Rückstände von Pyridin zu entfernen und mit Dichlormethan gewaschen, um Rückstände von 3-Chlorpropanamid zu entfernen. Anschließend wurde der Feststoff am Rotationsverdampfer sowie an der Vakuumpumpe getrocknet und mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie als *N*-Propanamidpyridinium charakterisiert (Abbildung 27).

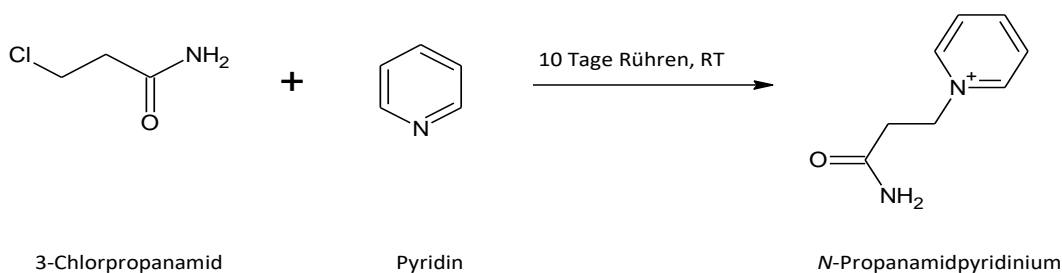


Abbildung 27 Synthese *N*-Propanamidpyridinium (PAP)

NMR-Spektroskopische Daten:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O , $\delta = 4,78$ ppm) $\delta = 8,87$ (d, 2 H, $^3\text{J} = 5,52$), $\delta = 8,55$ (t, 1 H, $^3\text{J} = 7,84$), $\delta = 8,10$ (t, 2 H, $^3\text{J} = 7,1$), $\delta = 4,88$ (t, 2 H, $^3\text{J} = 6,4$), $\delta = 3,10$ (t, 2 H, $^3\text{J} = 6,46$).

3.2.2 Methodenentwicklung und -etablierung zur Bestimmung von ANA in Kaffeebohnen

ANA sollte im analytischen Teil der vorliegenden Arbeit auf seine mögliche Entstehung in Kaffeebohnen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Röstens untersucht werden. ANA ist chemisch betrachtet eine sehr polare Verbindung, die sich in den Untersuchungen als nur in Wasser löslich erwies. Aufgrund der Zwitterionen-Struktur ergibt sich die Möglichkeit die Carboxyfunktion an der 3-Position anzusäuern, so dass ANA als Kation vorliegt (Abbildung 9). Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften sollte ANA flüssigchromatographisch in den Kaffeebohnen-Proben aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch bestimmt und quantifiziert werden.

3.2.2.1 Methodenentwicklung

Mit einer geeigneten Trennsäule konnte ANA auch in Realproben von Störsignalen abgetrennt werden. Eine sehr gute Empfindlichkeit bei der Detektion konnte durch Anwendung der Elektrospray-Ionisation im positiven *multiple reaction monitoring* (MRM) Modus realisiert werden. Im ersten Schritt wurden verschiedene Trennsäulen (Tabelle 8) und verschiedene Fließmittel (ACN, MeOH, bidest. H_2O) in ungesäuerter und angesäuerter Form (0,1 % Ameisensäure (FA), 1 % FA) getestet, um eine geeignete HPLC-Methode zur Trennung von ANA mit einer geeigneten Retentionszeit zu erreichen.

Tabelle 8 Verwendete Testsäulen

Säule	Stationäre Phase
Machery-Nagel Nucleodur C18 Pyramid	Octadecylmodifizierung mit polarem Endcapping
Machery-Nagel Nucleodur Phenyl-Hexyl	Phenyl-Hexyl
Kinetex Phenomenex PFP	Pentafluorphenyl
Agilent Poroshell Hilic 120	Kieselgel

Die beste Trennleistung von ANA wurde durch die in Tabelle 9 dargestellten Parameter und Einstellungen umgesetzt.

Tabelle 9 Übersicht der HPLC-Bedingungen zur Bestimmung von ANA

Gerät	1260 Infinity HPLC Anlage (Agilent, Waldbronn)	
Säule	Poroshell Hilic 120 x 2 mm, 4 µM Durchmesser (Agilent Germany)	
Flussrate	0,35 ml/min	
Fließmittel	A: Wasser mit 0,1 % FA	B: ACN mit 0,1 % FA
Injektionsvolumen	25 µl	
Ofentemperatur	40 °C	

Eine optimale Trennung des Analyten konnte mit einem binären Gradienten erreicht werden, der in Tabelle 10 dargestellt ist.

Tabelle 10 Pumpengradient

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0,00	90	10
0,10	90	10
5,00	65	35
5,50	50	50
6,50	50	50
6,60	90	10
10,00	90	10

Ein repräsentatives Chromatogramm einer ANA-Messung unter Verwendung der Säule Agilent Poroshell Hilic 120 ist in Abbildung 28 dargestellt.

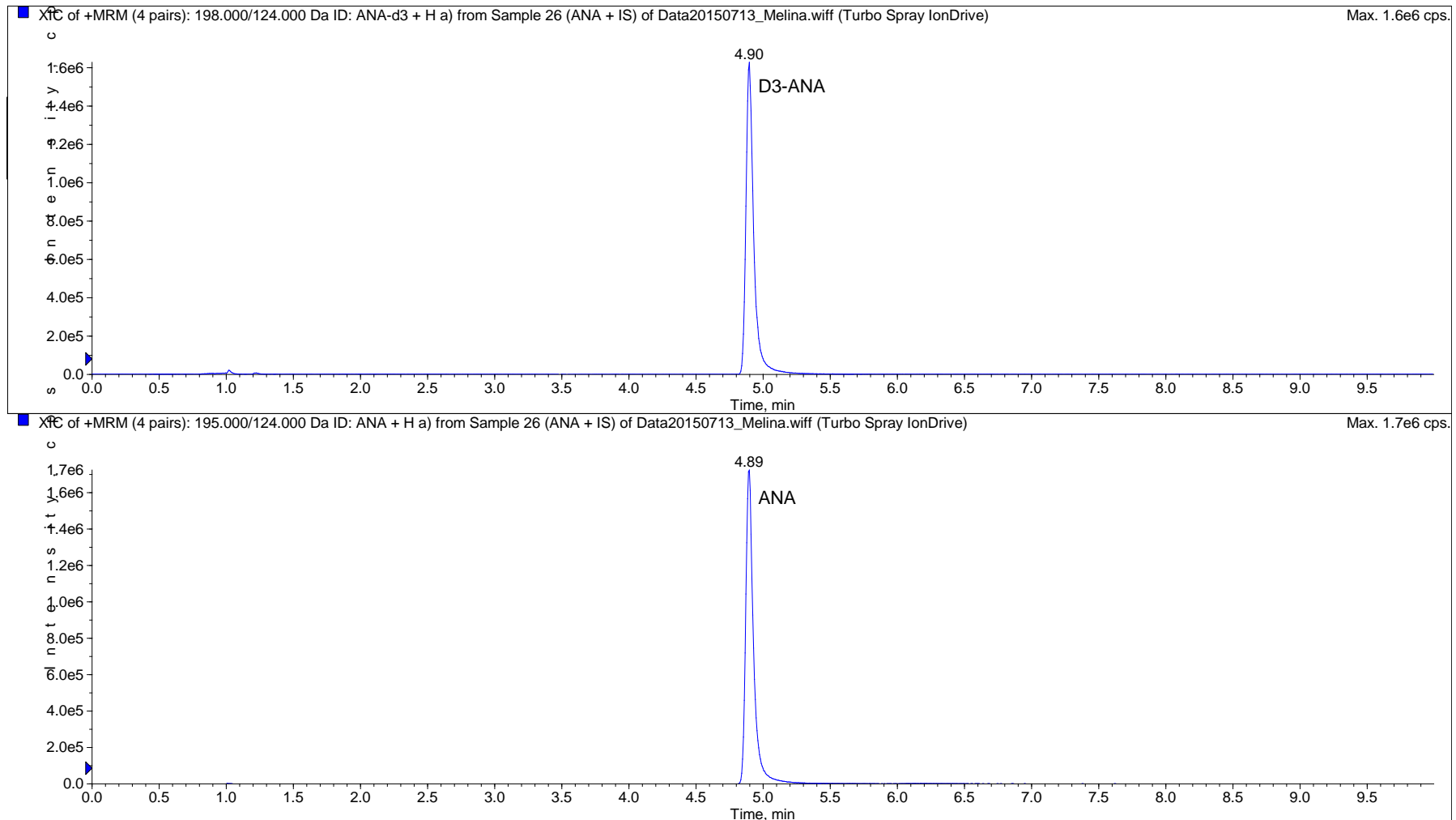


Abbildung 28 Repräsentatives HPLC-MS-Chromatogramm einer Messung von ANA (Rt=4,89 min; 198/124 Da) und D₃-ANA (Rt=4,90 min; 195/124 Da)

3.2.2.2 Optimierung der gerätespezifischen Parameter

Im MRM Modus wurde ANA erfasst und über eine Kalibriergerade quantifiziert. Die Q1-Massen des Analyten sowie die des isotonenmarkierten Standards wurden bestimmt. Für ANA ergab sich im Q1-Scan das Masse-zu-Ladungsverhältnis von m/z 195 und für d_3 -ANA dementsprechend ein um drei Masseneinheiten höheres Verhältnis von m/z 198.

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die gerätespezifischen Parameter zur Bestimmung von ANA, die anschließend für die Kalibrierung und Messungen der Kaffeebohnen-Proben verwendet wurden.

Tabelle 11 Parameter Massenspektrometer

	ANA	ANA	d_3 -ANA	d_3 -ANA
Q1 Masse [m/z]	195	195	198	198
Q3 Masse [m/z]	124	72	124	75
DP [V]	20	20	20	20
EP [V]	10	10	10	10
CE [V]	23	22	23	22
CXP [V]	15	15	15	15
CUR [psi]			30	
CAD			High	
IS [V]			5500	
TEM [°C]			350	
GS1			40	
GS2			40	

Q1 = Quadrupol 1 (m/z); Q3 = Quadrupol 3 (m/z); DP: Declustering Potential; EP: Entrance Potential; CE: Collision Energy; CEP: Cell Entrance Potential; CXP: Cell Exit Potential; CUR: Curtain Gas; CAD: Collision Activated Dissociation; IS: IonSpray Voltage; TEM: Temperature; GS1: Gas 1; GS2: Gas 2

Anschließend wurde eine Kalibriergerade (0,1, 0,5, 1,0, 2,5 und 5,0 ng/ml) mit jeweils 10 ng/ml isotonenmarkierten Standard vermessen. Es wurde für jede Konzentration der

Quotient aus der Peakfläche des Analyten und aus der Peakfläche des isotopenmarkierten Standards gebildet und gegen die Konzentration aufgetragen (Tabelle 12).

Tabelle 12 Konzentration, Peakflächen und Quotienten der Peakflächen der Kalibrierreihe

Konzentration [ng/ml]	Peakfläche ANA	Peakfläche D ₃ -ANA	Verhältnis
0,1	7,31E+01	1,01E+07	0,00001
0,5	3,58E+05	1,12E+07	0,03196
1,0	6,35E+05	1,06E+07	0,05991
2,5	1,52E+06	1,07E+07	0,14206
5,0	3,24E+06	1,08E+07	0,30000

In Abbildung 29 ist die Kalibriergerade mit Geradengleichung dargestellt.

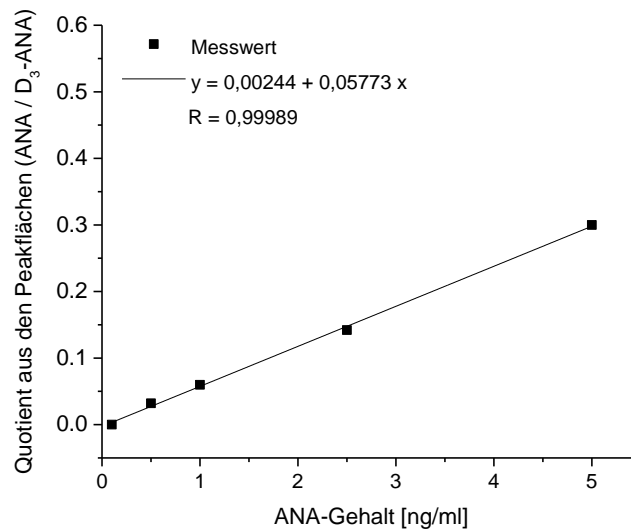


Abbildung 29 Kalibriergerade zur Quantifizierung von ANA

3.2.2.3 Entstehung von ANA während der Kaffeeröstung

Die Lebensmittelkontaminante AA unterliegt aufgrund ihrer gentoxischen Eigenschaften dem ALARA-Prinzip, so dass die Verbrauchereexposition weiterhin zu minimieren ist. Es wurde bei Zeng *et al.* (2009, 2010) gezeigt, dass das wasserlösliche Vitamin Niacin unter Entstehung eines *N*-Propanamid-3-carboxypyridinium kovalent an AA bindet und dass dieses Addukt (ANA) eine Möglichkeit zur Reduktion des AA-Gehaltes in Lebensmitteln

darstellen könnte. Während der Kaffeeröstung entsteht neben AA durch den thermischen Abbau von Trigonellin auch Niacin. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob es während der Kaffeeröstung zur Bildung von ANA kommt.

In einem Vorversuch wurden zunächst *Arabica* Gerüstbohnen (viermalige Extraktion in Wasser bei 98 °C für jeweils 1 h; Freundliche Gabe von Prof. Humpf) mit einer wässrigen Lösung aus Niacin (2 mM) und AA (1000 µM) für 30 min bei RT geschüttelt und anschließend im Trockenschrank bei 180 ± 5 °C für 15 min erhitzt. Die Proben wurden in einer Doppelbestimmung nach 3, 6, 9, 12 und 15 min entnommen und bei RT getrocknet. Danach wurden 25 mg je Probe mit jeweils 1 ml bidestilliertem Wasser auf einem Schüttler bei 25 °C für 30 min extrahiert. Die Proben wurden im Anschluss bei 10.000 g 1 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert, um eventuelle Feststoffpartikel der Bohnen aus der Lösung zu entfernen. Im Anschluss wurde der Überstand 1:1000 mit bidestilliertem Wasser verdünnt und mittels LC-MS vermessen. Die ANA-Gehalte wurden mit Hilfe der Kalibriereihe (Abbildung 29) unter Verwendung des Quantifizierungstools der Analyst Software 1.62 (AB Sciex Germany GmbH, Darmstadt) ermittelt, auf die eingewogene Menge der Kaffeeprobe (25 mg) bezogen und anschließend in ng ANA pro g Probe umgerechnet. Die Entstehung von ANA konnte zu allen Zeitpunkten in den vordotierten Gerüstbohnen nachgewiesen werden (Abbildung 30).

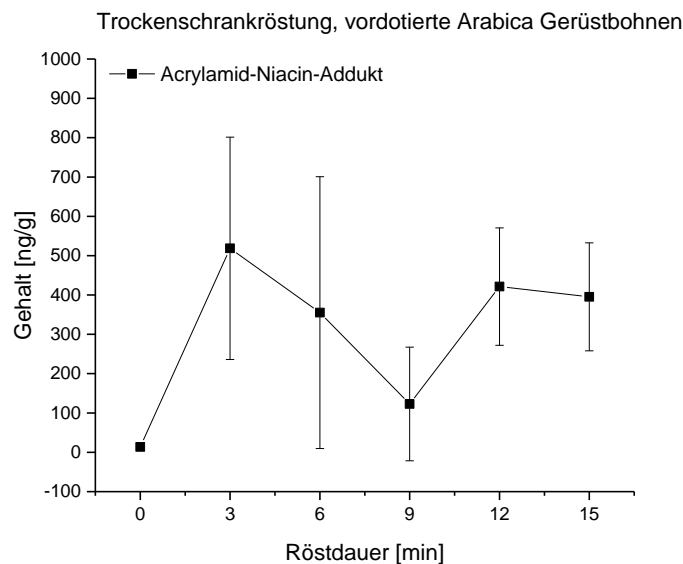


Abbildung 30 ANA-Gehalt [ng/ml] der vordotierten Arabica Gerüstbohnen im Trockenschrank bei 180 ± 5 °C erhitzt, durchgeführt als Doppelbestimmung (MW \pm Spannweite).

Bereits nach 3 min Erhitzung im Trockenschrank konnte ein Anstieg des ANA-Gehaltes von $518,6 \pm 282,8$ ng/g detektiert werden, der im weiteren Zeitverlauf bis 15 min unter

Berücksichtigung der Spannweite auf einem ähnlich hohen Niveau von $395,4 \pm 137,2$ ng/g blieb.

Aufgrund des erfolgreichen Vorversuchs wurden Proben von Kaffeebohnen während des Röstprozesses in Kooperation mit der Kaffeerösterei "Röstbar" in Münster entnommen. Zunächst wurden an einem für Teströstungen geeigneten kleinen Trommelröster Bohnen (Washed Yirgacheffe-2, Anbaugbiet: Ayichesh in Äthiopien) bei 180 °C für 12 min geröstet. Die Proben wurden als Doppelbestimmung nach 3, 6, 9 und 12 min entnommen, im Anschluss gemahlen und 4 h in Wasser extrahiert (25 mg/ml). Im Anschluss erfolgte die Messung mittels LC-MS. Die ANA-Gehalte wurden mit Hilfe der Kalibriereihe (Abbildung 29) unter Verwendung des Quantifizierungstools der Analyst Software 1.62 ermittelt und analog zu den Ergebnissen aus dem Modell-Röstversuch ermittelt. Die Ergebnisse dieser Röstung sind in Abbildung 31 dargestellt.

Im Vergleich zur Trockenschrankröstung konnte in den Realproben erst nach einer Röstdauer von 9 min ein ANA-Gehalt von $142,4 \pm 109,2$ ng/g detektiert werden. Der Wert steigt sogar gegen Ende der Röstung (12 min) weiter auf ein Maximum von $166,4 \pm 1,2$ ng/g an.

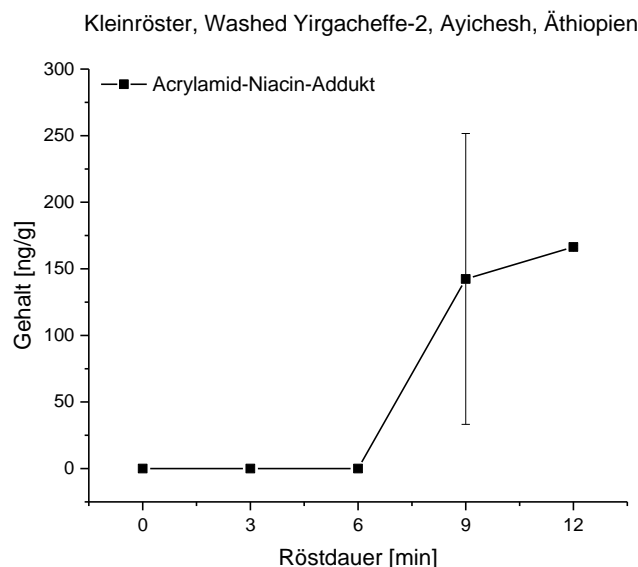


Abbildung 31 ANA-Gehalt [ng/ml] in Kleinproben der Sorte Washed Yirgacheffe-2 bei 180 °C geröstet, durchgeführt als Doppelbestimmung ($MW \pm$ Spannweite).

Im nächsten Schritt wurde an einem für Produktionsröstungen geeigneten großen Trommelröster (Kolumbien Supremo, Anbaugbiet: Antioquia in Kolumbien) bei 180 °C für 16,5 min geröstet. Die Proben wurden nach 3, 6, 9, 12 und 15 und 16,5 min als

Doppelbestimmung entnommen, ebenfalls im Anschluss gemahlen und 4 h in Wasser extrahiert (25 mg/ml). Im Anschluss erfolgte die Messung mittels LC-MS. Die Quantifizierung der ANA-Gehalte erfolgte analog.

Die Ergebnisse dieses Versuchs wurden nicht graphisch dargestellt, da alle gemessenen Proben zwar oberhalb der Nachweisgrenze, jedoch unterhalb der von der Analyst Software 1.62 ermittelten Bestimmungsgrenze lagen und daher keine Quantifizierung möglich war.

3.2.3 Zytotoxische Eigenschaften

Für Erläuterungen zur Zytotoxizität wird auf Kapitel 3.1.1 verwiesen.

3.2.3.1 Zellvitalität (Resazurin-Reduktionstest)

Die relative Zellvitalität der Testsubstanzen NMP, Trigonellin, Niacin, AA, ANA und PAP wurde analog zu den Extrakten JS und PE mittels Resazurin-Reduktionstest bestimmt (3.1.1.1), mit Ausnahme der Zellvitalität, die auf die Lösungsmittelkontrolle (1 % PBS, normiert auf 100 %) bezogen wurden (Versuchsdurchführung siehe Kapitel 5.4.4). Zusätzlich wurde durch eine 24 h Vorinkubation und anschließende Koinkubation mit BSO (500 μ M) der intrazelluläre GSH-Spiegel in HT29 Zellen reduziert [Perry *et al.*, 1992]. Dadurch war gewährleistet, die Testsubstanzen ohne Entgiftungskapazität durch GSH zu testen, um Rückschlüsse über ihre potentiellen, intrazellulären Wirkungen im Vergleich zu HT29 Zellen mit physiologischem GSH-Status ziehen zu können.

Im Konzentrationsbereich von 10-1000 μ M führten die jeweiligen Inkubationen mit Niacin, NMP sowie Trigonellin nach 1 h Inkubation zu keiner Beeinflussung der Zellvitalität sowohl mit als auch ohne GSH-Depletion in HT29 Zellen. Auch bei einer Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 h bis zu einer Konzentration von 1000 μ M blieb die relative Zellvitalität nach Inkubation mit den Testsubstanzen auf dem Niveau der Lösungsmittelkontrolle (1 % PBS) (Abbildung 32A und B).

Auch AA beeinflusste nach 1 h Inkubation die relative Zellvitalität bis zu einer Konzentration von 1000 μ M nicht, die Werte blieben auf dem Niveau der Lösungsmittelkontrolle. Nach 24 h hingegen reduzierte AA signifikant die Zellvitalität ab einer Konzentration von 500 μ M ($f < 0,05$) auf 59,4 %; dieser Effekt verstärkte sich im weiteren Konzentrationsverlauf bis 1000 μ M auf einen Wert von $47,8 \pm 5,3$ %. Unter GSH-Verarmung reagierten die HT29 Zellen wesentlich sensitiver auf AA, was zu einer signifikanten Verstärkung der zytotoxischen Eigenschaften von AA in Konzentrationen ≥ 100 μ M führte ($f < 0,001$) (Abbildung 32B). In den beiden höchsten getesteten Konzentrationen konnte nach 24 h Inkubationszeit in GSH-depletierten HT29 Zellen lediglich noch eine Vitalität von $2,6 \pm 0,8$ %

(500 μM) und $1,3 \pm 0,6 \%$ (1000 μM) detektiert werden. Der ermittelte IC_{50} -Wert von AA in GSH-depletierten Zellen nach 24 h Inkubation lag bei $143,7 \pm 12,1 \mu\text{M}$.

Nach Inkubation mit ANA konnte im getesteten Konzentrationsbereich bis 1000 μM nach 1 h und auch nach 24 h Inkubation keine Beeinflussung der Zellvitalität festgestellt werden. Auch nach 24 h Vor- und 1 bzw. 24 h Koinkubation mit BSO (500 μM) und der somit fehlenden Entgiftungsmöglichkeit konnte unter gleichen Inkubationsbedingungen mit ANA kein Einfluss auf die Zellvitalität in HT29 Zellen festgestellt werden (Abbildung 32C). PAP beeinträchtigte die Zellvitalität im Konzentrationsbereich von 10-1000 μM nach 1 bzw. 24 h Inkubationszeit in HT29 nicht. Weiterhin hat die GSH-Depletion keinen Rückgang der relativen Zellvitalität in HT29 Zellen nach Inkubation mit PAP zur Folge gehabt (Abbildung 32C).

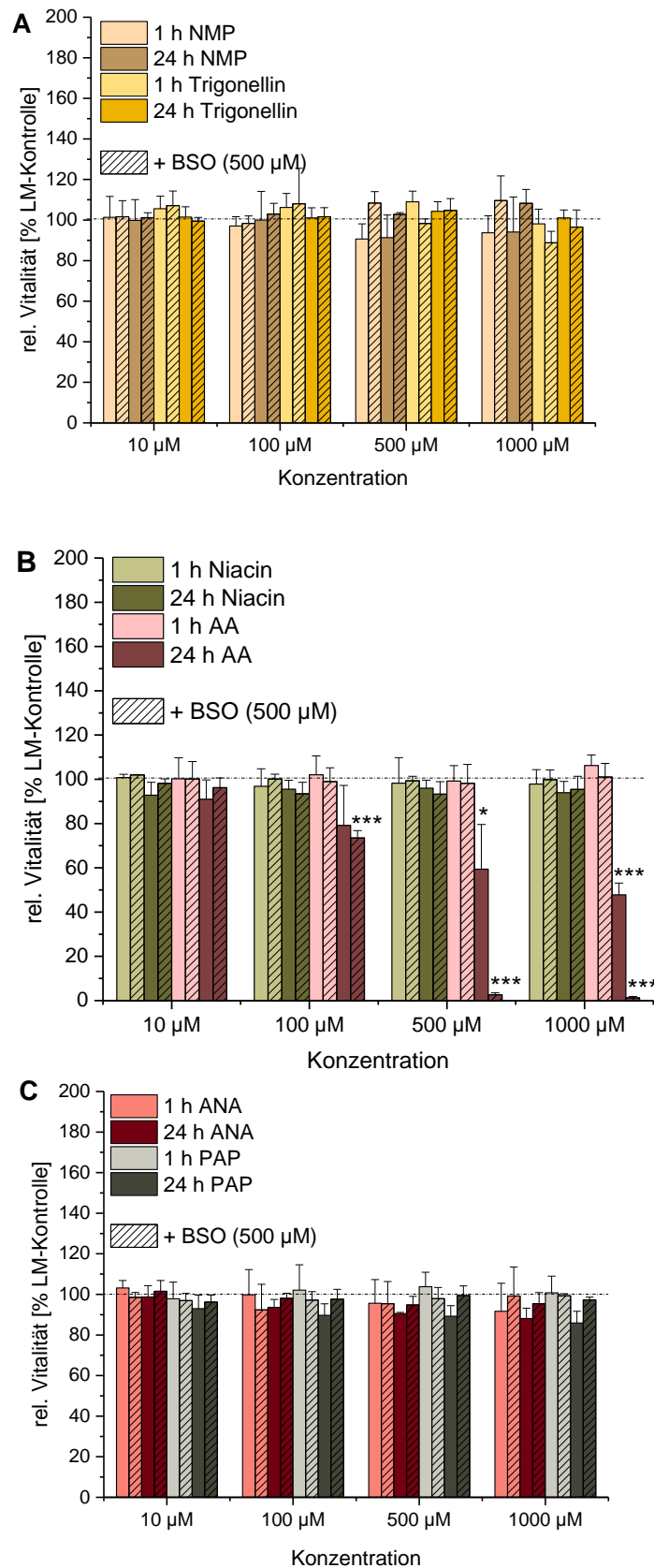


Abbildung 32 Untersuchungen zur Zellvitalität in HT29 Zellen nach 1 bzw. 24 h Inkubation mit NMP bzw. Trigonellin (A), Niacin bzw. AA (B) und ANA bzw. PAP (C) im Konzentrationsbereich von 10-1000 µM ± BSO (500 µM) im Resazurin-Reduktionstest (n≥3, MW±SD) im Vergleich zur Lösungsmittel-behandelten Kontrolle (100 %). Anova: *f<0,05 ***f<0,01 ****f<0,001; * statistischer Unterschied zur geringsten Konzentration (10 µM).

Aufgrund fehlender Daten zur zellulären Wirkung von ANA sollte die Testsubstanz neben der Untersuchung in der metabolisch kompetenten Zelllinie HT29 zusätzlich im Vergleich zu AA in der Zelllinie V79 mit und ohne GSH-Depletion getestet werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass V79 Zellen keine CYP450-Aktivität aufweisen, somit ist bei diesen Zellen gewährleistet, die Muttersubstanz ohne metabolische Aktivierung testen zu können [Glatt *et al.*, 1987]. Aber auch in V79 Zellen konnte nach 1 bzw. 24 h Inkubation mit ANA im Konzentrationsbereich von 10-1000 μM kein Einfluss auf die Zellvitalität beobachtet werden (Abbildung 33). AA wurde in einer sehr hohen, physiologisch irrelevanten Konzentration (6 mM) als Positivkontrolle eingesetzt, welche anhand von Untersuchungen von Puppel (2007) bereits einen Rückgang der Zellvitalität zur Folge hatte. AA reduzierte demnach nach 24 h Inkubationszeit die relative Zellvitalität auf einen Wert von rund 60 %. In GSH-depletierten Zellen fiel dieser Effekt deutlich stärker aus, die Behandlung mit AA hatte einen Rückgang der Zellvitalität auf etwa 11 % mit einem Signifikanzniveau von $f < 0,01$ zur Folge (Abbildung 33).

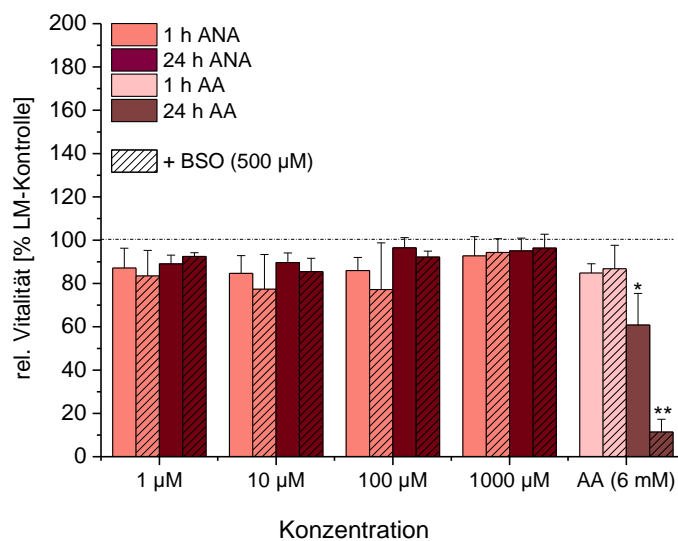


Abbildung 33 Untersuchungen zur Zellvitalität in V79 Zellen nach 1 bzw. 24 h Inkubation mit ANA im Konzentrationsbereich von 1 μM bis 1000 μM sowie AA (6 mM) \pm BSO (500 μM) im Resazurin-Reduktionstest ($n \geq 3$, $\text{MW} \pm \text{SD}$) im Vergleich zur Lösungsmittel-behandelten Kontrolle (100 %). (Anova: * $f < 0,05$ *** $f < 0,001$; * statistischer Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle).

3.2.3.2 Wachstumshemmung

Der Einfluss von ANA bzw. PAP auf das Zellwachstum in HT29 Zellen wurde mittels SRB Test analog zu den Extrakten JS bzw. PE bestimmt (Kapitel 3.1.1.2). Vergleichbar zum Resazurin-Reduktionstest wurde die zytotoxische bzw. wachstumshemmende Wirkung von ANA und PAP in Relation zur Lösungsmittelkontrolle (1 %PBS, normiert auf 100 %) gesetzt und die

Untersuchung in GSH-depletierten und nicht depletierten HT29 Zellen durchgeführt. Eine detaillierte Versuchsdurchführung wird in Kapitel 5.4.5 beschrieben.

Abbildung 34 stellt das Ergebnis des SRB-Tests nach 24 bzw. 72 h Inkubation mit ANA im Konzentrationsbereich 10-1000 μM dar. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (1 % PBS) konnte nach beiden Inkubationszeitpunkten bis zu einer Konzentration von 200 μM kein signifikanter Rückgang der Zellzahl beobachtet werden. Betrachtet man die Ergebnisse bei höheren Konzentrationen, ist festzustellen, dass nach 24 h ab einer ANA-Konzentration von 400 μM ein signifikanter Abfall ($f < 0,05$) der Überlebensrate erkennbar war, der sich im weiteren Konzentrationsverlauf bis 1000 μM (61,1 %) verstärkte. Im Gegensatz hierzu war nach 72 h Inkubation erst ab der höchsten gemessenen ANA-Konzentration von 1000 μM ein signifikanter wachstumshemmender Effekt ($f < 0,05$) zu beobachten, der jedoch mit einem Wert von 73,7 % höher lag als nach einer Inkubationszeit von 24 h. Ein Vergleich beider Inkubationszeitpunkte zeigte ohnehin, dass die wachstumshemmenden Effekte in Konzentrationen $\geq 200 \mu\text{M}$ nach einer Inkubationszeit von 72 h über dem Niveau der 24 h Inkubation lagen. So konnte bei einer Substanzkonzentration von 1000 μM nach 72 h Inkubation eine durchschnittliche Überlebensrate von 72,3 % beobachtet werden, während diese nach 24 h Inkubation bereits ab einer Konzentration von 600 μM schon unter 70 % lag und schließlich bei der höchsten Konzentration von 1000 μM auf 58,9 % Überlebensrate abfiel. Aufgrund der stärkeren wachstumshemmenden Wirkung nach 24 h deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Zellen in der Lage sind die entstandenen Schäden, wie z. B. eine mögliche Beeinflussung der Proteinexpression oder DNA-Schäden, nach einer verlängerten Inkubationszeit von 72 h wieder zu reparieren.

Das Fehlen der Carboxygruppe an Position 3 des Pyridinium-Gerüsts bei PAP führte zu einer Verstärkung der wachstumshemmenden Wirkung in HT29 Zellen. Bereits eine Konzentration von 50 μM reduzierte nach 72 h signifikant die Zellviabilität ($f < 0,05$) auf einen Wert von 73,8 %, die sich im weiteren Konzentrationsverlauf bis 1000 μM weiter absenkte (57,7 %). Im Vergleich zu ANA, zeigte auch PAP im SRB Test nach 24 h Inkubation eine Verstärkung der wachstumshemmenden Wirkungen, da bereits ab einer Konzentration von 100 μM ein Rückgang der Zellviabilität beobachtet werden konnte. Einen Unterschied der zytotoxischen Wirkungen durch PAP zwischen der 24 und 72 h Inkubation konnte nicht festgestellt werden. Die höchste gemessene Konzentration (1000 μM) führte nach beiden Inkubationszeitpunkten zu einer Reduktion der Überlebensrate auf etwa 60 % (Abbildung 34).

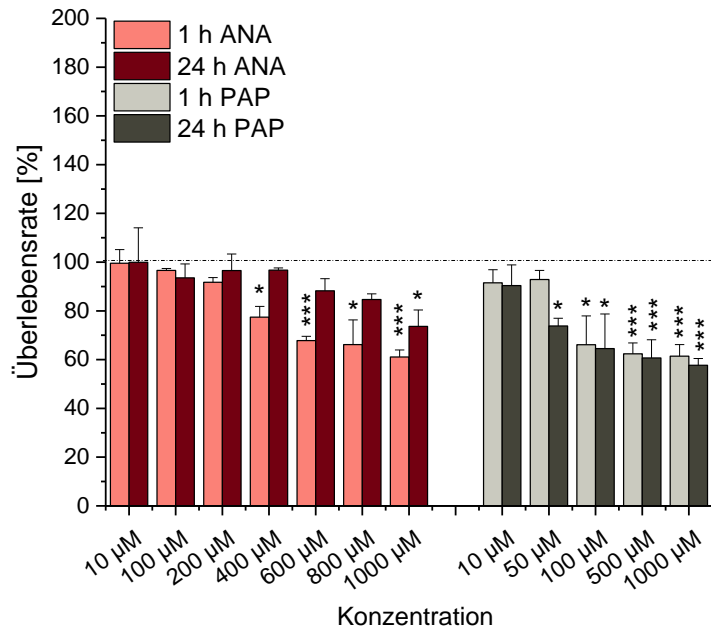


Abbildung 34 Untersuchungen zur Wachstumshemmung in HT29 Zellen nach 24 bzw. 72 h Inkubation mit ANA bzw. PAP im Konzentrationsbereich von 10-1000 µM SRB-Test (n≥3, MW±SD) im Vergleich zur Lösungsmittel-behandelten Kontrolle (100 %). Anova: *f<0,05 **f<0,01 ***f<0,001; * statistischer Unterschied zur geringsten Konzentration (10 µM). ANA: Daten aus Diplomarbeit Carolin Haushofer

3.2.4 Modulation des intrazellulären ROS-Levels (prooxidativer DCF Test)

Analog zu den Extrakten JS bzw. PE wurden NMP, Trigonellin, Niacin, AA, ANA sowie PAP mittels DCF Test in HT29 Zellen untersucht (Kapitel 3.1.3), um ebenfalls nähere Hinweise über eine potentiell ROS-induzierende Wirkung zu erhalten. Die Fluoreszenzintensitäten (FI) der Testsubstanzen im Konzentrationsbereich 10-1000 µM (± GSH-Depletion) wurden in Relation zur Lösungsmittelkontrolle (1 % PBS, normiert auf 100 %) gesetzt. Die Versuchsdurchführung ist in Kapitel 5.4.6 beschrieben.

Die Positivkontrolle Menadion (20 µM) induzierte nach 3 h Inkubation statistisch hochsignifikant (f<0,001) den Spiegel an intrazellulärem ROS auf einen Wert von $255,9 \pm 34,9$ % in HT29 Zellen (Abbildung 35A). Niacin und Trigonellin induzierten nach einer Inkubationszeit von 3 h sowohl in HT29 Zellen als auch in GSH-depletierten Zellen den Spiegel an intrazellulärem ROS im Konzentrationsbereich von 10-1000 µM nicht (Abbildung 35A und B), die Werte blieben auf dem Niveau der Lösungsmittelkontrolle. Nach 3 h Inkubation erhöhte NMP lediglich in GSH-depletierten HT29 Zellen den Status an intrazellulärem ROS auf einen Wert von $125,6 \pm 5,3$ % (Abbildung 35A). Auch AA führte in der höchsten getesteten Konzentration von 1000 µM zu oxidativem Stress in HT29 Zellen, der sich unter GSH-Depletion verstärkte, so dass ein signifikanter Anstieg des ROS-Gehalts auf einen Wert von $134,0 \pm 17,0$ % detektiert werden konnte (Abbildung 35B).

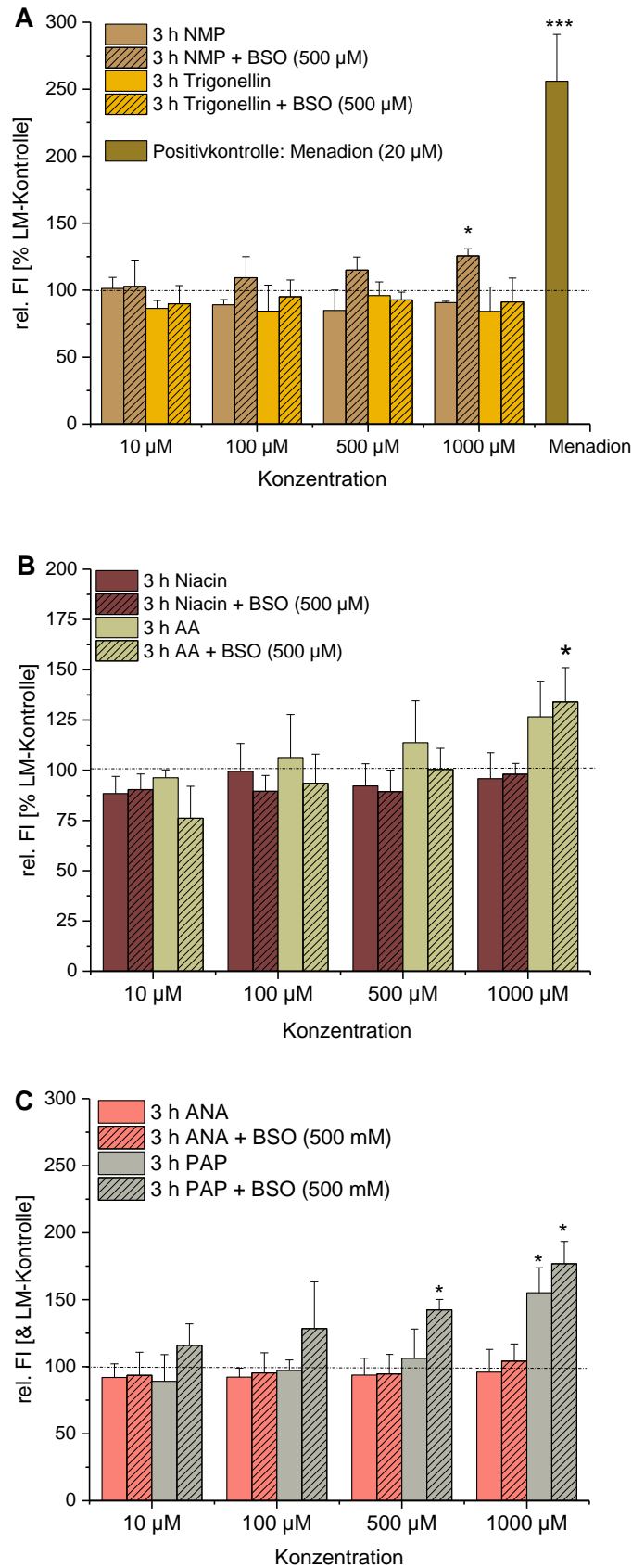


Abbildung 35 Untersuchungen zur ROS-Entstehung nach Inkubation mit NMP bzw. Trigonellin (A), Niacin bzw. AA (B) und ANA bzw. PAP (C) im Konzentrationsbereich von 10-1000 μM ± BSO (500 μM) in HT29 Zellen nach 3 h Inkubationszeit im DCF Test (n≥3, MW±SD) im Vergleich zur Lösungsmittel-behandelten Kontrolle (100 %). Menadion (20 μM, 0,5 % DMSO) diente als Positivkontrolle. Anova: *f<0,05;***f<0,001 statistischer Unterschied zur geringsten Konzentration (10 μM) bzw. zur DMSO-Kontrolle (Menadion).

ANA erhöhte in beiden Zellsystemen (GSH-depletierte und nicht depletierte HT29 Zellen) den Gehalt an ROS bis zu einer Konzentration von 1000 μM nicht, die Werte lagen auf Höhe des Kontrollniveaus. Das Fehlen der Carboxygruppe bei PAP hingegen hatte einen signifikanten Anstieg des ROS-Levels ab einer Konzentration von 1000 μM mit einer relativen Fluoreszenzintensität in Höhe von $142,5 \pm 29,7\%$ in HT29 Zellen zur Folge (Abbildung 35C). Werden HT29 Zellen zusätzlich vor Substanz-Inkubation durch die BSO Vor- und Koinkubation an GSH verarmt, kommt es zu einer Verstärkung dieses Effekts und es ließ sich bereits ab einer PAP-Konzentration von 500 μM eine Erhöhung des ROS-Spiegels ($142,4 \pm 7,8\%$) mit einer statistischen Signifikanz von $f < 0,05$ messen. Nach 3 h Inkubation mit PAP in der höchsten Konzentration von 1000 μM konnte sogar eine signifikante Induktion ($f < 0,05$) des Levels an intrazellulär gebildetem ROS auf $176,8 \pm 16,7\%$ beobachtet werden (Abbildung 35C).

3.2.5 Gentoxische Wirkungen (Comet Assay)

Das gentoxische Potential von NMP, Trigonellin, Niacin AA, ANA sowie PAP nach 1 bzw. 24 h Inkubation in HT29 Zellen wurde analog zu den Extrakten JS und PE mit Hilfe des Comet Assays bestimmt (beschrieben in Kapitel 3.1.4). Aufgrund der bisher schwachen Wirkungen der Testsubstanzen wurden diese in der Kurzzeit-Inkubation (1 h) lediglich in den beiden höchsten Konzentrationen von 500 μM bzw. 1000 μM (\pm GSH-Verarmung) untersucht. Die 24 h Inkubation mit NMP, Trigonellin, Niacin und ANA wurde im gesamten Konzentrationsbereich von 10-1000 μM (\pm GSH-Verarmung) getestet. Aufgrund der starken zytotoxischen Wirkung in HT29 Zellen wurde das DNA-schädigende Potential von AA und PAP im Konzentrationsbereich von 10-500 μM bestimmt. Zusätzlich wurde auch die potentielle Entstehung an oxidativen DNA-Schäden mittels FPG-Behandlung bestimmt (Versuchsdurchführung siehe Kapitel 5.4.7).

Nach Bestrahlung der HT29 Zellen mit UV-B-Licht ($0,05 \text{ J/cm}^2$) kam es zu einem signifikanten Anstieg der Schweifintensität auf $28,21 \pm 2,89\%$ ($f < 0,001$), die zusätzliche Behandlung mit FPG verstärkte die DNA-schädigende Wirkung des UV-B-Lichtes und erhöhte signifikant die Schweifintensität auf $34,33 \pm 1,11\%$ ($f < 0,001$) (Abbildung 36A). Weiterhin ergab nach Bestrahlung der HT29 Zellen die Behandlung mit FPG im Vergleich zur Behandlung ohne FPG einen signifikanten Unterschied ($f < 0,05$), was die Aktivität des Reparaturenzyms FPG belegt. Die Ergebnisse der 1 h Inkubation mit NMP und Trigonellin sind in Abbildung 36A dargestellt. Auch nach der Behandlung mit FPG zur Detektion von oxidativen DNA-Schäden ließ sich keine erhöhte Anzahl an DNA-Schäden im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (1 % PBS) beobachten. Ebenso führte die 1 h Inkubation mit Niacin

und AA bis zu einer Konzentration von 1000 μM zu keiner Erhöhung der DNA-strangbrechenden Wirkung. Auch unter GSH-Depletion konnte nach Behandlung mit Niacin bzw. AA im untersuchten Zellsystem HT29 kein DNA-schädigendes Potential der Testsubstanzen im Comet Assay beobachtet werden (Abbildung 36B). Analog dazu, zeigten ANA als auch PAP nach 1 h Inkubation sowohl in HT29 Zellen bzw. als auch in GSH-depletierten HT29 Zellen bis zu einer Konzentration von 1000 μM kein DNA-schädigendes Potential (Abbildung 36C). Darüber hinaus wurde durch die zusätzliche Behandlung mit FPG nach Inkubation mit AA, Niacin, ANA oder PAP kein Anstieg an oxidativen DNA-Schäden detektiert. Zusammengefasst erhöhte keine der untersuchten Testsubstanzen nach 1 h Inkubation bis zu einer Konzentration von 1000 μM (\pm GSH-Depletion) die Anzahl von (oxidativen) DNA-Schäden.

Die Ergebnisse der 24 h Inkubation mit NMP und Trigonellin sind in Abbildung 37A dargestellt. Trigonellin zeigte bis 1000 μM sowohl mit als auch ohne FPG Inkubation in GSH-depletierten Zellen sowie in Zellen mit normalem GSH Status keine DNA-schädigende Wirkung. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle erhöhte NMP die Anzahl der DNA-Schäden auf $2,87 \pm 0,76 \%$ in der höchsten Konzentration von 1000 μM . Eine Depletion des intrazellulären GSH-Spiegels verstärkte die DNA-strangbrechende Wirkung von NMP in Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{M}$. Die Schweifintensität stieg nach 500 μM NMP auf $3,49 \pm 0,26 \%$ und nach 1000 μM NMP auf $4,82 \pm 1,33 \%$ an. Ein Anstieg der oxidativen DNA-Strangbrüche durch FPG wurde in NMP-Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{M}$ sowohl in GSH-depletierten als auch in nicht depletierten HT29 Zellen beobachtet, die jeweils zur FPG-unbehandelten Konzentration statistische Signifikanz aufwiesen.

Die Ergebnisse des Comet Assays der 24 h Inkubation mit Niacin im Konzentrationsbereich von 10-1000 μM sowie mit AA im Konzentrationsbereich von 10-500 μM sind in Abbildung 37B dargestellt. Ein gentoxisches Potential konnte nach Inkubation mit Niacin bis zu einer Konzentration von 1000 μM sowohl mit GSH- als auch ohne GSH-Depletion nicht festgestellt werden. Weiterhin konnten auch keine oxidativen DNA-Schäden mittels FPG Inkubation in beiden Zellsystemen (\pm BSO) detektiert werden. AA induzierte DNA-Schäden in der höchsten Konzentration von 500 μM und erhöhte die Schweifintensität auf $3,91 \pm 0,65 \%$. Eine Depletion des intrazellulären GSH-Spiegels erhöhte die DNA-schädigende Wirkung von AA in HT29 Zellen jedoch nicht. Ein signifikant erhöhter Gehalt an FPG-sensitiven DNA-Schäden ($6,24 \pm 1,39 \%$), im Vergleich zur FPG-unbehandelten AA Inkubation, konnte allerdings in der höchsten getesteten AA-Konzentration (500 μM) beobachtet werden.

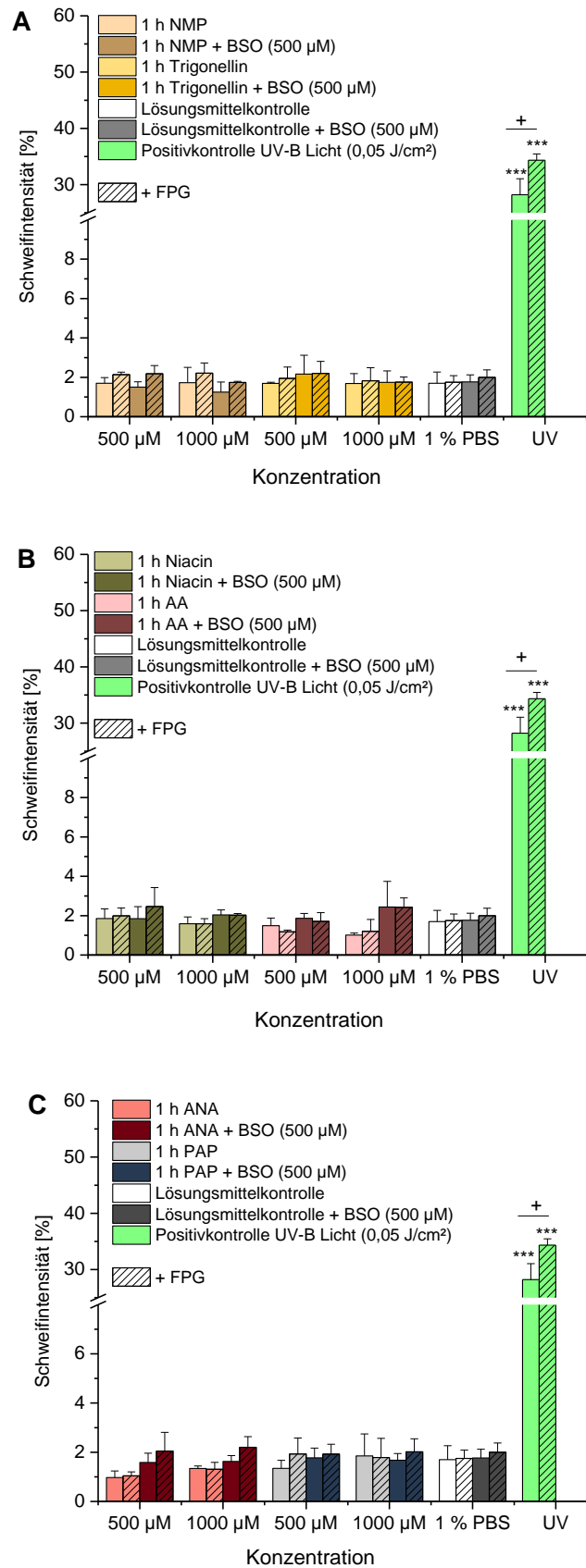


Abbildung 36 DNA-schädigende Wirkung nach 1 h Inkubation mit NMP bzw. Trigonellin (A), Niacin bzw. AA (B) und ANA bzw. PAP (C) im Konzentrationsbereich von 500-1000 µM ± BSO (500 µM) in HT29 Zellen im Comet Assay (n≥3, MW±SD). UV Licht (λ=312 nm; 0,05 J/cm²) diente als Positivkontrolle. Anova: ***f<0,001; * statistisch signifikanter Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle; + statistisch signifikanter Unterschied ± FPG.

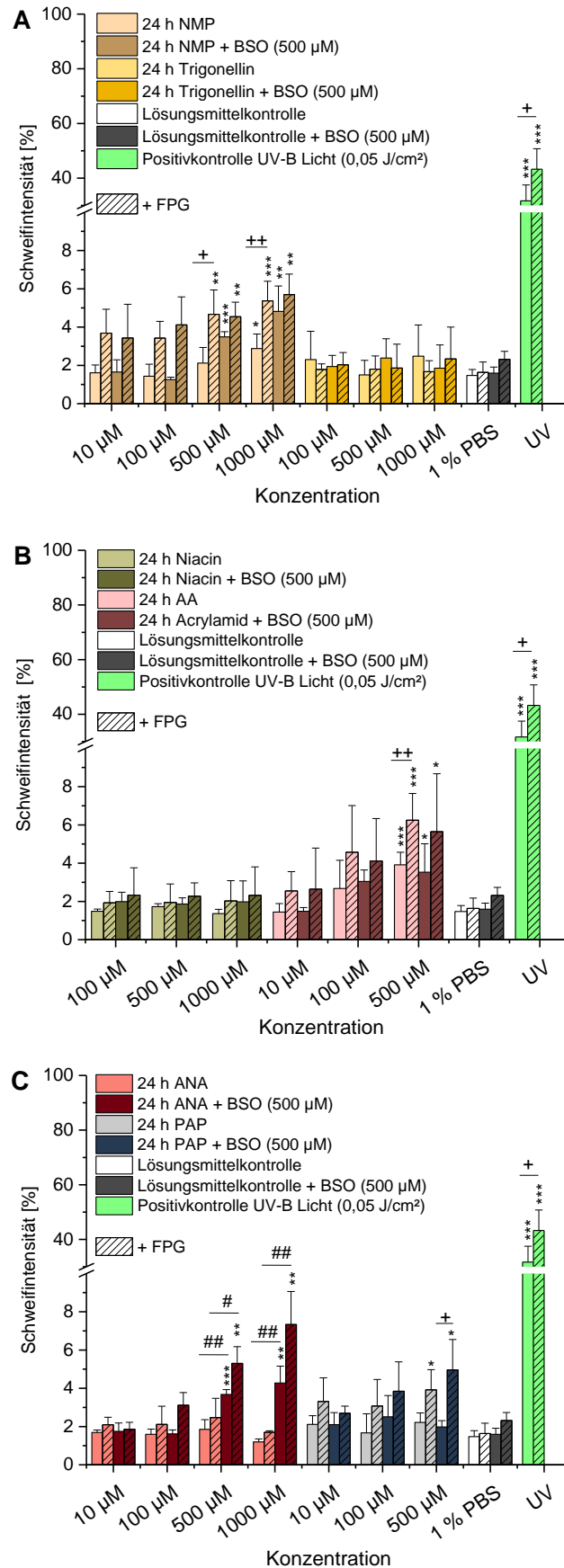


Abbildung 37 DNA-schädigende Wirkung nach 24 h Inkubation mit NMP bzw. Trigonellin (A), Niacin bzw. AA (B) sowie ANA bzw. PAP (C) im Konzentrationsbereich von 10-1000 µM ± BSO (500 µM) in HT29 Zellen im Comet Assay (n≥3, MW±SD). UV Licht (λ=312 nm; 0,05 J/cm²) diente als Positivkontrolle. Anova: *f<0,05 **f<0,01 ***f<0,001); * statistisch signifikanter Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle; + statistisch signifikanter Unterschied ± FPG.

ANA erhöhte die DNA-Strangbruchrate in HT29 Zellen im Konzentrationsbereich von 10-1000 μM nach 24 h Inkubation nicht (Abbildung 37C). Weiterhin konnten keine FPG-sensitiven DNA-Strangbrüche nach der Inkubation mit ANA beobachtet werden. Die DNA-Schäden blieben auf dem Niveau der Lösungsmittelkontrolle. In GSH-depletierten HT29 Zellen erhöhte ANA konzentrationsabhängig die Anzahl der DNA-Schäden ab einer Konzentration von 500 μM mit einer Schweifintensität von $3,67 \pm 0,25 \%$ und induzierte den Gehalt an oxidativen DNA-Schäden auf $5,30 \pm 0,87 \%$, was sich jedoch als nicht signifikant erwies. Zusätzlich wurde ein signifikanter Anstieg oxidativer DNA-Schäden in GSH-depletierten Zellen, im Vergleich zu HT29 Zellen mit normalem GSH-Status, in Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{M}$ detektiert. Dies könnte auf eine zelluläre Abfangreaktion von ANA durch GSH hindeuten, welche mit einer geringeren Genotoxizität einhergeht. PAP induzierte keine DNA-Schäden bis zu einer Konzentration von 500 μM nach 24 h Inkubation in HT29 Zellen mit und ohne GSH-Depletion (Abbildung 37C). Eine Erhöhung der oxidativen DNA-Schäden wurde lediglich bei einer Konzentration von 500 μM beobachtet. Nach einer Inkubation mit 500 μM PAP in HT29 Zellen konnte eine DNA-Strangbruchrate von $3,92 \pm 1,05 \%$ gemessen werden. Unter GSH-Depletion erhöhte sich in dieser Konzentration der Effekt auf $4,96 \pm 1,58 \%$.

Zusammengefasst zeigten NMP und AA nach 24 h in unterschiedlichen Konzentrationen eine DNA-schädigende Wirkung in HT29 Zellen (\pm GSH-Depletion, \pm FPG-Behandlung). ANA hingegen erhöhte die Anzahl von DNA-Schäden lediglich in GSH-verarmten HT29 Zellen und PAP hatte lediglich einen Anstieg von oxidativen DNA-Schäden (\pm GSH-Depletion) zur Folge. Nach erfolgreicher Testung in der metabolisch kompetenten Zelllinie HT29 sollte ANA analog zur Testung der zytotoxischen Wirkungen mittels Resazurin-Reduktionstest zusätzlich im Vergleich zu AA in der Zelllinie V79 mit und ohne GSH-Depletion getestet werden, um nähere Hinweise der Effekte der Muttersubstanz ohne metabolische Aktivierung zu erhalten. AA wurde auch im Comet Assay in einer sehr hohen, physiologisch irrelevanten Konzentration (6 mM) als Positivkontrolle eingesetzt, welche in den Untersuchungen in V79 Zellen bereits eine DNA-schädigende Wirkung zur Folge hatte [Puppel, 2007].

AA (6 mM) zeigte nach beiden Inkubationszeitpunkten (1 und 24 h) ein DNA-schädigendes Potential, welches sich unter GSH-Depletion verstärkte und statistisch signifikant war ($f < 0,05$). ANA erhöhte marginal die DNA-Strangbruchrate in V79 Zellen in den beiden höchsten getesteten Konzentrationen (100-1000 μM) nach einer Inkubationszeit von 1 bzw. 24 h (Abbildung 38). Unter GSH-Depletion verstärkte ANA die Anzahl der DNA-Schäden im untersuchten Konzentrationsbereich (1-1000 μM) jedoch nicht.

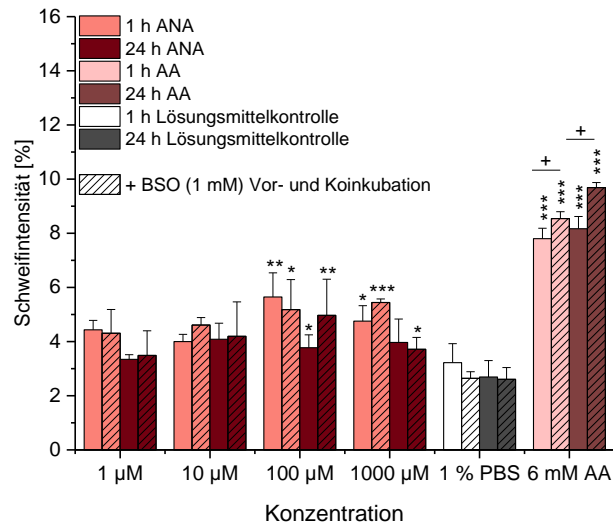


Abbildung 38 DNA-schädigende Wirkung nach 1 bzw. 24 h Inkubation mit ANA im Konzentrationsbereich von 1-1000 µM ± BSO (1000 µM) in V79 Zellen im Comet Assay ($n \geq 3$, $MW \pm SD$). AA (6 mM) diente als Positivkontrolle. Anova: * $f < 0,05$ ** $f < 0,01$ *** $f < 0,001$); * statistisch signifikanter Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle; + statistisch signifikanter Unterschied ± BSO.

3.2.6 Einfluss auf die Genexpression von Nrf2 und Phase II Enzyme (QT-PCR)

Aufgrund der Struktur-Analogie zum Nrf2-Aktivator NMP wurde zunächst der Einfluss der Testsubstanzen ANA und PAP im Konzentrationsbereich 1-1000 µM auf Nrf2 selbst sowie auf die redoxsensitiven Gene UGT1A1, γ -GCL und GSTA1 bzw. GSTT1 mittels quantitativer RealTime PCR analog zu den Untersuchungen der Extrakte JS und PE in HT29 Zellen untersucht (3.1.6). Die Versuchsdurchführung wird in Kapitel 5.4.10 erläutert.

ANA im Konzentrationsbereich von 1-1000 µM beeinflusste das Transkriptionslevel für γ -GCL, GSTA1, UGT1A1 und Nrf2 nach 3 h Inkubation nicht. Die relative Transkription der untersuchten Zielgene blieb auf dem Niveau der Lösungsmittelkontrolle. Jedoch konnte nach 3 h ein signifikanter Abfall ($f < 0,05$) der GSTT1-Transkription durch die Inkubation mit ANA (500 µM) beobachtet werden, die sich aber im weiteren Verlauf bis 1000 µM auf das Niveau der Lösungsmittelkontrolle wieder erhöhte, so dass ein biologischer Effekt ausgeschlossen werden kann (Abbildung 39A). Darüber hinaus kam es zu einem 1,5-fachen Anstieg der GSTA1-Transkription bei einer ANA-Konzentration von 100 µM bzw. 1000 µM im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Die relative Transkription der γ -GCL scheint sich zwar nach einer Inkubationszeit von 24 h im untersuchten Konzentrationsbereich von 1-1000 µM durch ANA minimal aktivieren zu lassen, allerdings ohne statistische Signifikanz im Vergleich zur PBS-Kontrolle. Auch die Transkription der UGT1A1 wurde nach 24 h Inkubation marginal bis zu einer Konzentration von 100 µM erhöht und fiel ab einer Konzentration von 500 µM wieder auf das Niveau der Kontrolle ab. Dieser Trend wurde

ebenfalls bei der Transkription der GSTA1 beobachtet. Zusammenfassend zeigte ANA nach einer verlängerten Inkubationszeit von 24 h keine biologisch relevante Erhöhung der Transkriptionsraten der untersuchten Gene γ -GCL, GSTA1, GSTT1, UGT1A1 und Nrf2 in HT29 Zellen im Konzentrationsbereich von 1-1000 μ M (Abbildung 39B).

Nach 3 h Inkubation mit PAP konnte eine Modulation der γ GCL-, GSTT1-, UGT1A1- bzw. Nrf2-Transkription bis zu einer Konzentration von 1000 μ M ausgeschlossen werden. Es konnte lediglich eine signifikante Erhöhung ($f < 0,05$) der GSTA1-Genexpression nach 3 h (10 μ M) beobachtet werden (Abbildung 39C). Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 h hatte ebenfalls einen signifikanten Anstieg ($f < 0,05$) der GSTA1-Genexpression bei einer PAP-Konzentration von 100 μ M zur Folge (Abbildung 39D), der bis zu der höchsten Konzentration von 1000 μ M auf einem ähnlichen Niveau von etwa 1,5 blieb, jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant war. Zusammenfassend hatte PAP ($\geq 100 \mu$ M) lediglich auf die GSTA1-Genexpression eine biologisch relevante Erhöhung zur Folge.

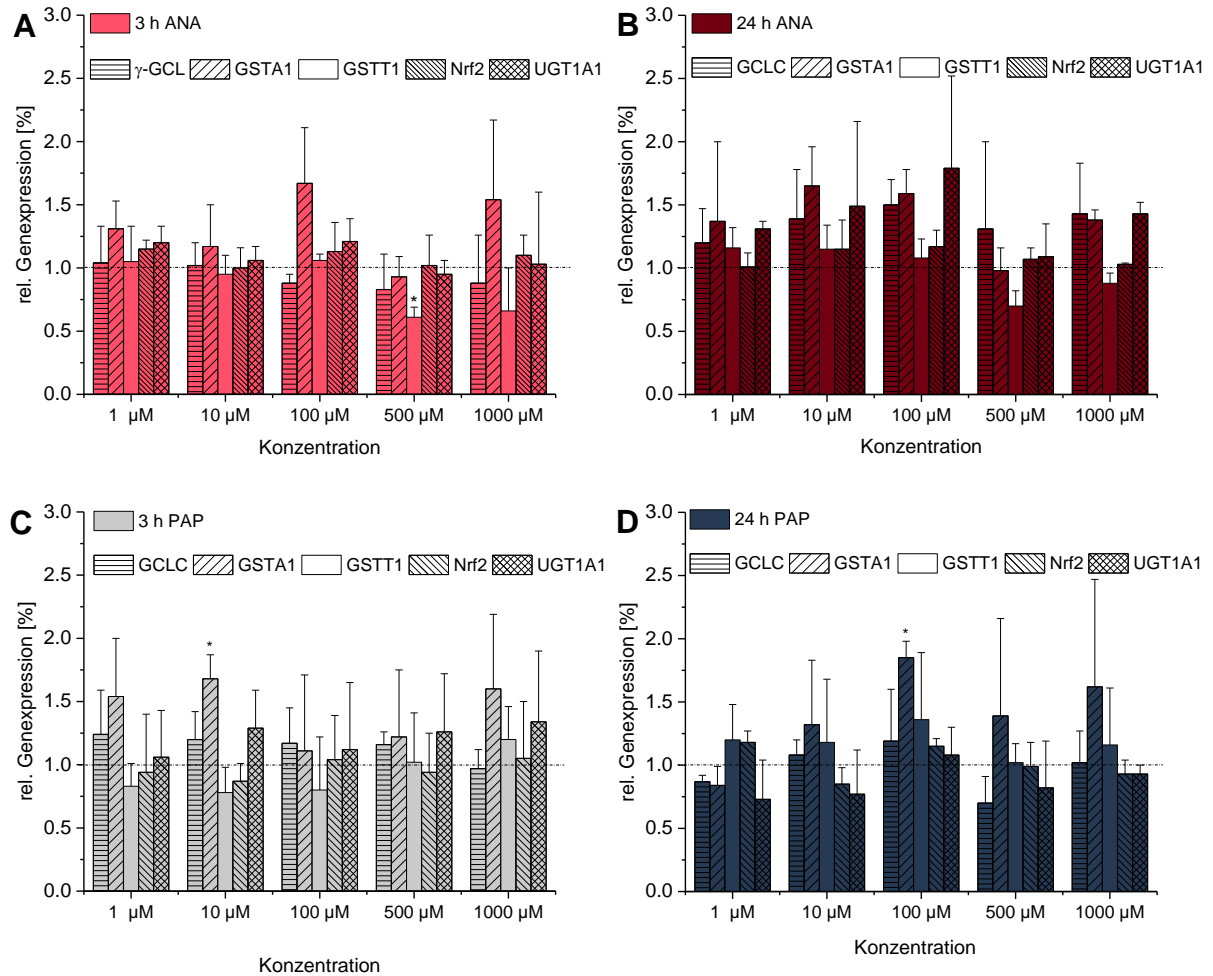


Abbildung 39 Modulation der relativen Transkription nach Inkubation mit ANA nach 3 h (A) bzw. 24 h Inkubationszeit (B) sowie mit PAP nach 3 h (C) bzw. 24 h Inkubationszeit (D) im Konzentrationsbereich von 1-1000 µM nach 3 h Inkubation in HT29 Zellen bestimmt mittels quantitativer RealTime PCR (n≥3, MW±SD). Als Kontrolle dient 1 % PBS im Endansatz (rel. Transkription = 1). Normalisiert wurde auf β -Aktin als „housekeeping gene“. Anova: *f<0,05 **f<0,01 ***f<0,001; * statistisch signifikanter Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle. Daten aus Diplomarbeit von Kathrin Kunz.

Aufgrund der mittels DCF Test beobachteten ROS-induzierenden Wirkung sowie der mittels Comet Assay gemessenen (oxidativen) DNA-Schäden insbesondere in GSH-depletierten HT29 Zellen, wurde der Einfluss von ANA, PAP, AA und NMP im Konzentrationsbereich von 10-1000 µM nach 3 h Inkubationszeit unter GSH-Verarmung auf die bereits erwähnten redoxsensitiven Gene und auf das Nrf2-Gen selbst untersucht. ANA erhöhte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle die Transkription von GSTT1 (10 µM) sowie signifikant (f<0,05) die Transkription von GSTA1 (100 µM), die von biologischer Relevanz zu sein scheinen (Abbildung 40A). Auch nach Behandlung mit PAP (100 µM) konnte eine marginale Erhöhung der GSTA1-Transkription beobachtet werden (Abbildung 40B), die jedoch deutlich schwächer als nach Inkubation mit ANA ausfiel

AA (100 μM) induzierte die GSTT1-Transkriptionsrate nur schwach und erhöhte sie auf einen Wert von 1,9 (Abbildung 40C). Die größte modulierende Wirkung der vier untersuchten Testsubstanzen in GSH-depletierten HT29 Zellen ließ sich nach Inkubation mit NMP feststellen. So führte eine 100 μM Inkubation mit NMP zu einer Erhöhung der Transkriptionsrate von GSTA1 auf einen Wert von $2,6 \pm 0,9$ mit statistischer Signifikanz ($f < 0,05$). Des Weiteren konnte in der höchsten Konzentration von 1000 μM eine modulierende Wirkung auf alle untersuchten Gene festgestellt werden, am stärksten wurde jedoch die relative Transkription von γ -GCL und Nrf2 durch NMP moduliert (Abbildung 40D).

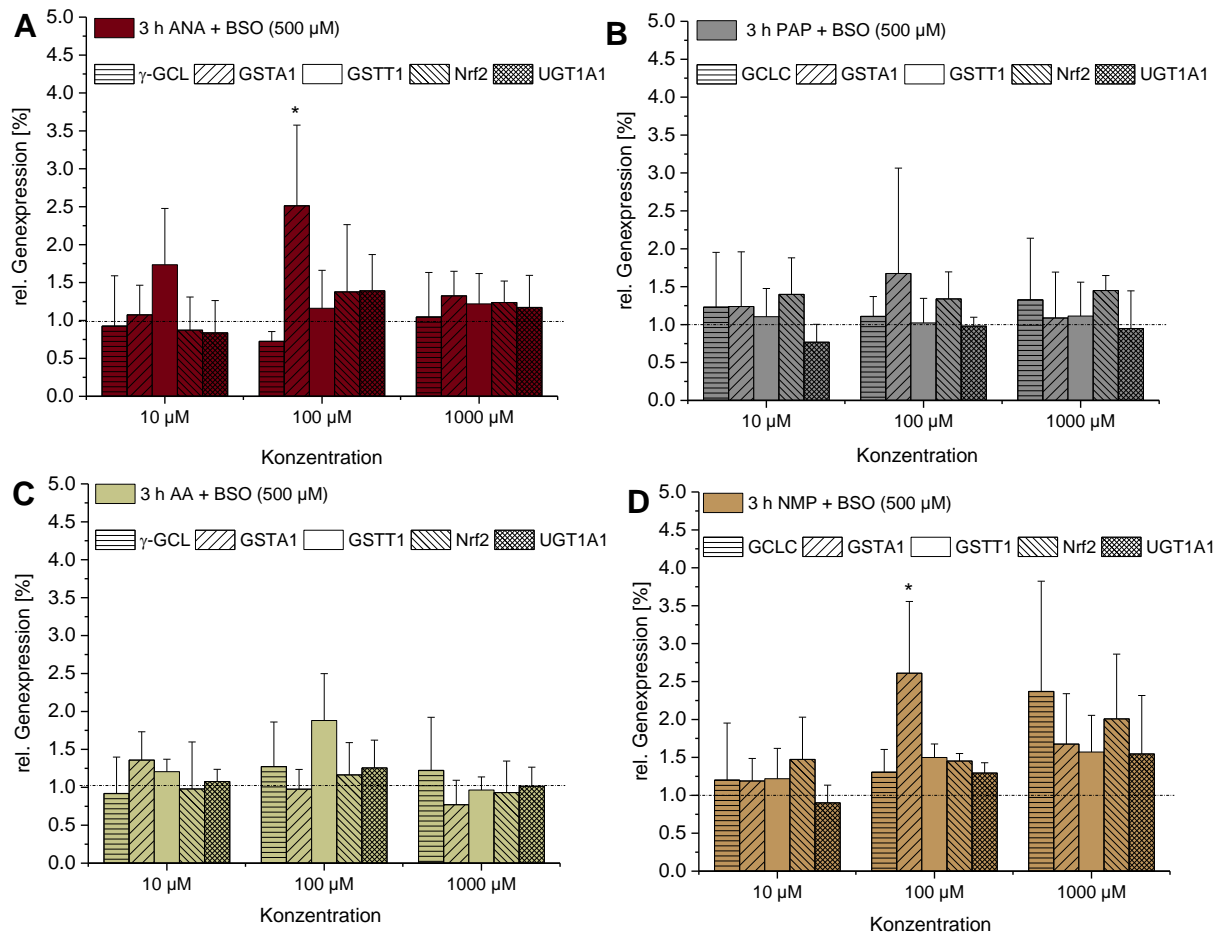


Abbildung 40 Modulation der relativen Transkription nach Inkubation mit ANA (A), PAP (B), AA (C) bzw. NMP (D) im Konzentrationsbereich von 10-1000 μM nach 3 h Inkubation in GSH-depletierten HT29 Zellen bestimmt mittels quantitativer RealTime PCR ($n \geq 3$, $\text{MW} \pm \text{SD}$). Als Kontrolle dient 1 % PBS im Endansatz (rel. Transkription = 1). Normalisiert wurde auf β -Aktin als „housekeeping gene“. Anova: * $f < 0,05$; * statistisch signifikanter Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle.

3.2.7 Einfluss auf die Nrf2 Translokation in den Zellkern

Unter physiologischen Bedingungen in der Zelle wird der Gehalt an Nrf2 im Zytoplasma durch permanenten proteosomalen Abbau auf einem niedrigen Basalniveau gehalten. Unter Exposition von oxidativem Stress oder Induktoren, löst sich die Bindung zwischen Nrf2 und Keap1, wodurch Nrf2 in der Lage ist in den Zellkern zu translozieren. Im Zellkern bildet Nrf2 mit anderen Transkriptionsfaktoren mit basischer Leucinezipper-Domäne ein Heterodimer und bindet an das ARE in der Promotorregion von Zielgenen, um ihre Expression hoch zu regulieren [Sykiotis *et al.*, 2010; Niture *et al.*, 2010]. Aufgrund der leichten oxidativen Wirkungen und der möglicherweise damit verbundenen schwachen Effekte auf die redoxsensitiven Gene und Nrf2 selbst, die nach Behandlung mit ANA, PAP, NMP und AA in GSH-depletierten HT29 Zellen beobachtet werden konnten, wurde überprüft, ob es nach 3 h Inkubation mit den Testsubstanzen (10-1000 μM) zu einer Erhöhung des Nrf2-Proteingehalts im Zellkern GSH-depletierter HT29 Zellen kam (Versuchsdurchführung, siehe Kapitel 5.4.9). Die densitometrische Auswertung ist in Abbildung 41A dargestellt, die repräsentativen Western Blots in Abbildung 41B.

Nach 3 h Inkubation zeigte die densitometrische Auswertung nach Inkubation mit ANA einen konzentrationsabhängigen Anstieg des nukleären Nrf2-Proteinstatus im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle, die jedoch aufgrund der hohen Standardabweichungen zumindest in der niedrigsten Konzentration (10 μM) biologisch nicht relevant zu sein scheinen. Ein Vergleich mit einem repräsentativen Western Blot lässt in den beiden anderen Konzentrationen (100 μM ; 1000 μM) eine erhöhte Menge an Nrf2 im Zellkern vermuten, die densitometrische Auswertung ergab eine relative Proteinmenge von $126 \pm 65 \%$ bzw. $143 \pm 51 \%$ im Zellkern. Im Vergleich zu ANA, zeigte auch PAP einen Anstieg des Nrf2 Proteinspiegels im Zellkern ab einer Konzentration von 100 μM , der in der höchsten getesteten Konzentration von 1000 μM nach densitometrischer Auswertung mit einer relativen Proteinmenge von $152 \pm 17 \%$ auch signifikant war ($f < 0,01$). AA hingegen beeinflusste die Nrf2-Translokation in den Zellkern GSH-depletierter HT29 Zellen bis zu einer Konzentration von 1000 μM nicht. Die durch densitometrische Auswertung ermittelte Proteinmenge im Zellkern blieb auf dem Niveau der Lösungsmittelkontrolle (100 %).

In GSH-depletierten HT29 Zellen konnte durch NMP eine starke Induktion des nukleären Nrf2-Proteinlevels bei der niedrigsten getesteten Konzentration von 10 μM beobachtet werden. Der deutliche Anstieg der relativen Proteinexpression lag im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle bei $204 \pm 15 \%$ mit einem Signifikanzniveau von $f < 0,001$. Im weiteren Konzentrationsverlauf führte die höchste Konzentration von NMP (1000 μM)

jedoch zu einer statistischen Verringerung ($f < 0,05$) der relativen Nrf2-Proteinmenge im Zellkern auf einen Wert von $75 \pm 14 \%$ gegenüber der PBS-Kontrolle.

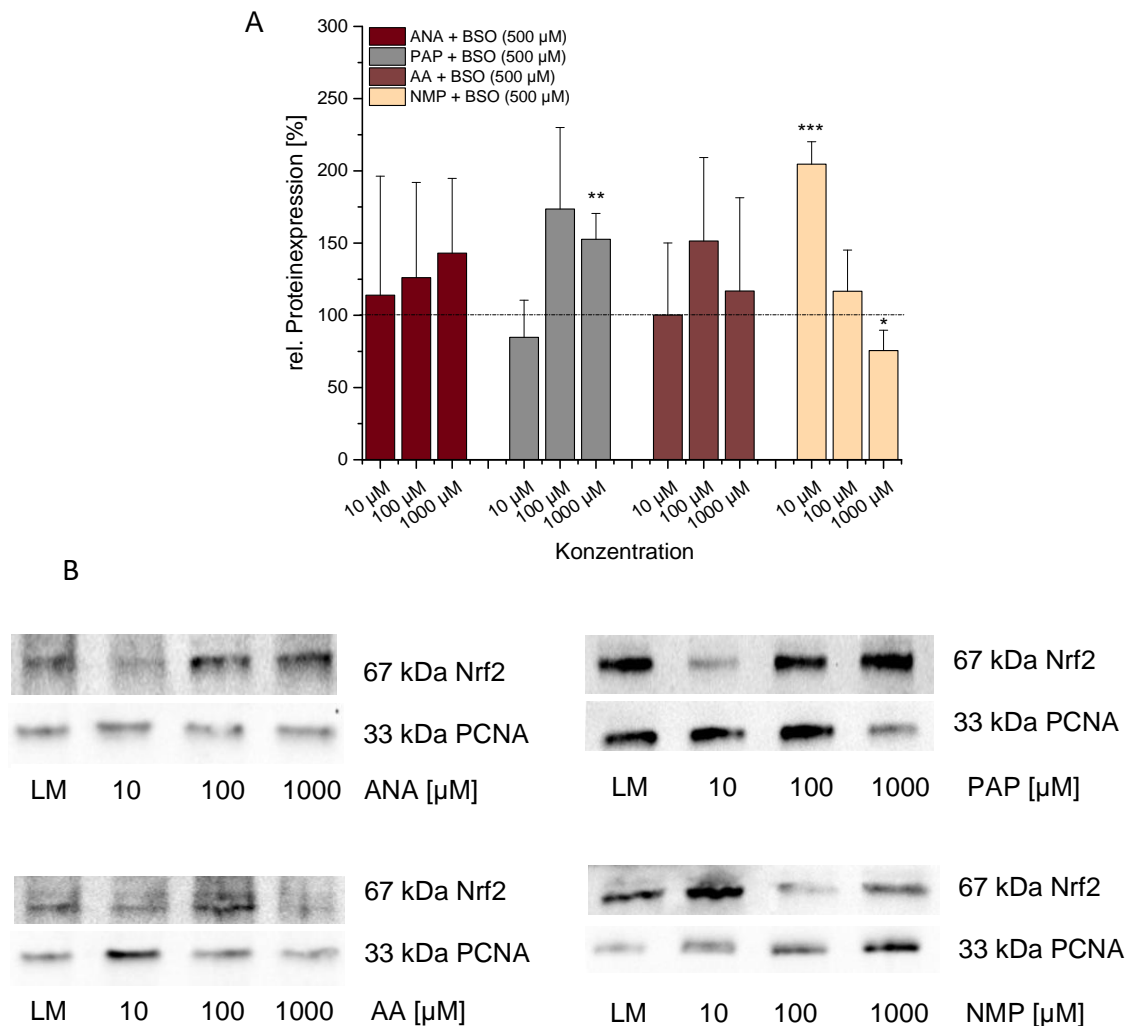


Abbildung 41 Modulation des nukleären Nrf2-Proteinlevels nach 3 h Inkubation mit ANA, PAP, AA bzw. NMP im Konzentrationsbereich von 10-1000 µM in GSH-depletierten HT29 Zellen bestimmt mittels Western Blot Analyse ($n \geq 3$, $MW \pm SD$) und anschließender densitometrischer Auswertung mittels BioRad's ChemiDoc (A). Repräsentatives Western Blot Experiment (B). Als Lösungsmittelkontrolle (LM) diente 1 % PBS (=100 %) sowie PCNA als Beladungskontrolle. (Anova: * $f < 0,05$; *** $f < 0,001$; * statistischer Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle).

3.2.8 Diskussion

Bevor Niacin möglicherweise technologisch Niacin-ärmeren Lebensmitteln zugesetzt werden könnte, um die AA-Bildung im Lebensmittel während der Herstellung zu reduzieren, sollte im zweiten Teilprojekt zunächst die technologisch bedingte potentielle Entstehung von ANA während der Kaffeeröstung untersucht werden. Da in der Kaffeebohne beide Reaktionspartner auf natürlichem Weg entstehen, wäre somit eine „natürliche“ Abfangreaktion oder Maskierung von AA bei der Kaffeeröstung denkbar.

LC/MS-Analyse

Zusammenfassend ließ sich in den LC/MS-Analysen die Entstehung von ANA sowohl im Modell-Röstversuch (Trockenschrank) als auch in den im kleinen Trommelröster erhitzten Kaffeebohnen nachweisen. Im Modell-Röstversuch wurden *Arabica*-Gerüstbohnen (Freundliche Gabe von Prof. Humpf) mit einer wässrigen Lösung aus AA (1 mM) und Niacin (2 mM) vorbehandelt und anschließend im Trockenschrank erhitzt. Nach Aufbereitung und Extraktion konnte dabei die Entstehung von ANA zu allen Zeitpunkten beobachtet werden. Eine Abhängigkeit zwischen der Röstdauer und des ANA-Gehalts wurde jedoch während des Modellversuchs nicht festgestellt. Dies könnte womöglich mit der sehr hohen, unrealen Vordotierung der Gerüstbohnen mit AA und Niacin sowie dem gleichzeitigen Vorliegen beider Reaktionspartner von Anfang an zusammenhängen. Da dieser Versuch in erster Linie einem qualitativen Nachweis diente und die Frage klären sollte, ob ANA überhaupt unter diesen Bedingungen in Kaffeebohnen entsteht, wurden anschließend in der Kaffeerösterei "Röstbar" in Münster Proben unter standardisierten Realbedingungen entnommen. Zum einen wurde an einem für Teströstungen geeigneten, kleinen Trommelröster (100 g) die Sorte Washed Yirgacheffe-2, Anbaugebiet: Ayichesh in Äthiopien geröstet und anschließend mittels LC/MS untersucht. Zum anderen wurde an einem für Produktionsröstungen geeigneten, großen Trommelröster (50-80 kg) die Sorte Kolumbien Supremo, Anbaugebiet: Antioquia in Kolumbien, geröstet und analog zu den Röstproben des Kleinröstlers aufgearbeitet und mittels LC/MS gemessen. Die Untersuchungen am Kleinröster zeigten eine zeitabhängige Bildung von ANA. So konnte ab einer Röstdauer von 9 min ein Gehalt von $142,4 \pm 109,2$ ng pro g Kaffeebohne nachgewiesen werden, der gegen Ende der Röstung nach 12 min noch weiter auf ein Maximum von $166,4 \pm 1,2$ ng/g Kaffeebohne anstieg. Im großen Trommelröster lagen zu allen gemessenen Zeitpunkten die ANA-Gehalte nach Quantifizierung mit der verwendeten Analyst Software 1.62 zwar oberhalb der Nachweisgrenze, jedoch unterhalb der Bestimmungsgrenze, so dass keine näheren Hinweise im Hinblick auf Zeitabhängigkeit und Gehalte erhalten werden konnten. Eine Beeinflussung durch die Größe des Rösters kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden,

erscheint jedoch aufgrund der gleichen Rösttemperatur und vergleichbaren Wärmeverteilung in den Trommelröstern eher unwahrscheinlich, was darauf hindeutet, dass die unterschiedlichen Kaffeesorten (Washed Yirgacheffe und Kolumbien Supremo) die Entstehung von ANA beeinflusst haben könnten. Die Reaktionspartner Niacin und AA müssen während der Röstung erst einmal gebildet werden, bevor sie miteinander reagieren können. Die gleichzeitige Bildung bzw. zumindest das gleichzeitige Vorliegen der Edukte während der Röstung ist Voraussetzung für die Bildung von ANA und stellt die größte Schwierigkeit dar, da auch die Bildung der Edukte von der Rösttemperatur und -dauer abhängig sind. Beide Bohnensorten waren zwar von der Sorte *Coffea Arabica*, stammten jedoch aus unterschiedlichen Anbaugebieten (Kolumbien bzw. Äthiopien), was ebenfalls einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Bohnen im Hinblick auf ihren Trigonellin-, Asparagin- und Niacin-Gehalt hat.

Bagdonaite *et al.* untersuchten 2008 verschiedene Kaffeebohnen der Sorten *Coffea canephora (Robusta)* und *Coffea arabica* auf die Entstehung von AA während der Kaffeeröstung. Die höchsten Gehalte an AA entstanden bereits innerhalb der ersten Minuten während der Röstung und nahmen mit steigender Röstdauer und Rösttemperatur ab. Die untersuchte Sorte *Cameroon Robusta* zeigte innerhalb der ersten Minuten der Röstung bei einer Temperatur zwischen 240-250 °C einen starken Anstieg des AA-Gehalts auf ein Maximum von 3800 ng/g, der sich jedoch im weiteren Verlauf des Röstprozesses schnell reduzierte. Einen deutlich geringeren AA-Gehalt konnte in den Bohnen der Sorte *Brazilian Santos Arabica* detektiert werden, die lediglich ein Maximum von 500 ng/g erreichten. Allerdings reduzierte sich auch bei dieser Sorte im weiteren Röstverlauf der Gehalt an AA. Der starke Anstieg sowie rasche Abfall des AA-Gehalts konnte auch anhand von Untersuchungen von Lantz *et al.* (2006) während der Röstung von *Arabica* Kaffeebohnen aus Kolumbien bestätigt werden. Aufgrund dessen weisen leichter geröstete Kaffeebohnen höhere AA-Gehalte als stärker geröstete Kaffeebohnen auf. Schätzungsweise findet ein AA-Abbau > 95 % in der Bohne während des Röstens statt. Allerdings ähneln sich auch die Entstehungskurven und folglich die AA-Gehalte bei Rösttemperaturen von 210, 230 bzw. 250 °C sehr stark, so dass in diesem Temperaturbereich keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen waren [Taeymans *et al.*, 2004; Stadler und Scholz, 2006]. Eine Korrelation zwischen den AA-Gehalten und der Ausgangskonzentration von Asparagin in den grünen Bohnen wurde ebenso in Untersuchungen von Bagdonaite *et al.* (2008) festgestellt. So konnte für die Sorte *Robusta* im Durchschnitt eine Asparagin-Konzentrationen in Höhe von 797 µg/g sowie eine AA-Konzentration in Höhe von 708 ng/g nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden in der Sorte *Arabica* im Durchschnitt

geringere Asparagin-Gehalte von 486 µg/g sowie folglich geringere AA-Gehalte in Höhe von 374 ng/g bestimmt. Im Rahmen dieser Veröffentlichung wurden weiterhin zehn *Arabica* Sorten aus unterschiedlichen Anbaugebieten unter gleichen Röstbedingungen (Konvektionsröster, 240 °C) auf ihren AA-Gehalt hin untersucht. Im Kaffee aus Kenia konnten dabei die geringsten AA-Gehalte (299 ng/g) detektiert werden, in dem aus Indien die höchsten Gehalte (575 ng/g).

Neben des Gehalts an AA in der Kaffeebohne spielt auch der Gehalt an Niacin für die Entstehung von ANA eine Rolle. Niacin entsteht durch Demethylierung an der Stickstoff-Position des Pyridin-Grundgerüsts von Trigonellin während des Erhitzungsprozesses. Stadler *et al.* (2002) untersuchten den thermischen Abbau von Trigonellin in Abhängigkeit der Rösttemperatur und -dauer. Bei einer Temperatur von 220 °C konnte der mengenmäßig höchste relative Umsatz von Trigonellin zu Niacin erst nach einer für Kaffeebohnen unrealistischen Röstdauer von 60 min (10,85 %) beobachtet werden (durchschnittliche Röstdauer: 14 bis 20 min). Wurde die Temperatur auf 230 °C erhöht, stieg im gesamten Zeitverlauf der relative Umsatz zu Niacin an, die höchste Umsetzung von 17,08 % konnte jedoch nach wie vor erst nach einer Dauer von 60 min beobachtet werden. Erst bei einer Temperatur von 240 °C zeigte sich eine deutlich frühere Demethylierung zu Niacin bereits nach 10 min (14,1 %), die ihr Maximum nach einer Röstdauer von 20 min (16,85 %) erreichte und für die Kaffeeröstung aufgrund der Zeitdauer auch von Relevanz ist. Bezogen auf das Trockengewicht enthalten die Bohnen je nach Sorte zwischen 0,3 und 1,3 % Trigonellin, in leicht gerösteten Kaffees (*American coffee*) liegt der Niacin-Gehalt somit in etwa bei 10 mg/100 g, wohingegen in stark geröstetem Kaffee, dem sogenannten *Italian coffee*, der Gehalt auf bis zu 40 mg/100 g ansteigt [Adrian und Frangne, 1991]. Die Konzentration von Niacin im Kaffee ist somit unmittelbar von der Röstdauer und -temperatur abhängig. Eine Korrelation zwischen dem Trigonellin- bzw. Niacin-Gehalt sowie der jeweiligen Kaffeesorte scheint es jedoch nicht zu geben. In Untersuchungen von Casal *et al.* (2000) ließ sich für *Arabica*-Kaffee im Vergleich zu *Robusta*-Kaffee nur eine Tendenz zu höheren Trigonellin-Gehalten ohne statistische Signifikanz identifizieren.

Da die Realproben in der Kaffeerösterei "Röstbar" in Münster bei niedrigen Temperaturen (180-190 °C) über einen längeren Zeitraum (bis zu 17 min) und damit unter milderen Bedingungen geröstet wurden, hat jedoch zumindest die vergleichsweise niedrige Rösttemperatur womöglich einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Menge des gebildeten Niacins sowie auf die Bildung von AA gehabt. Unter Verwendung des detektierten ANA-Gehalts in Höhe von $166,4 \pm 1,2$ ng/g in der fertig gerösteten Kaffeebohne washed Yirgacheffe-2 sowie unter den Annahmen, dass während des

Kaffeebrühens das stark hydrophile ANA ohne Verluste extrahiert wird, sowie pro Tasse Kaffee in etwa 10 g Kaffeepulver zum Brühen verwendet werden, liegt eine ANA-Aufnahme von 1,66 µg (8,51 nmol) pro Tasse Kaffee im Rahmen des Möglichen. Das gleichzeitige Vorliegen von Niacin und AA sowie deren Menge sind für die Bildung von ANA essentiell, daher müssten für exaktere Gehaltsbestimmungen ein weitaus größerer Stichprobenumfang untersucht werden, um nähere Hinweise bezüglich Temperaturabhängigkeit und Einfluss der Sorte auf die ANA-Entstehung zu erhalten.

Die Ergebnisse der Kaffeeuntersuchung mittels LC/MS bestätigte somit, dass eine Aufnahme von ANA über Kaffee im Rahmen des Möglichen liegt und lieferte einen wichtigen Beitrag zur Idee, stark AA-belastete Lebensmittel vor dem Erhitzungsprozess mit Niacin vorzubehandeln, um die AA-Bildung währenddessen zu reduzieren. Um eine Unbedenklichkeit von ANA zu untersuchen, sollte die Verbindung in HT29 Zellen auf potentiell adverse aber auch antioxidative Effekte untersucht werden. Die beiden Edukte AA und Niacin wurden als Vergleichssubstanzen neben den strukturell ähnlichen Kaffeeinhaltsstoffen NMP und Trigonellin ebenfalls in die Untersuchungen mit einbezogen. Zusätzlich wurde PAP, welches bis auf die fehlende Carboxygruppe an Position C3 mit der chemischen Struktur von ANA übereinstimmte und somit als decarboxyliertes Analogon zu NMP fungierte, ebenso auf potentielle zelluläre Effekte in HT29 Zellen analysiert. Ebenso wurden die Untersuchungen in HT29 Zellen mit verringerter antioxidativer Abwehr in Folge einer GSH-Depletion untersucht, um Anhaltspunkte zu den Wirkungen der Stoffe im gestressten Zustand der Zelle erhalten zu können.

Zytotoxizität

Störungen der zellulären Funktionen sind im Allgemeinen die Folge von Zytotoxizität, die u. a. durch Inhibierung oder Aktivierung von Enzymen und Rezeptoren oder einer Hemmung des Elektronentransports ausgelöst werden können. Zum einen kann dies auf kovalenten als auch auf nicht-kovalenten Reaktionen (z. B. ROS-Induktion) beruhen. Nukleophile, zelluläre Bestandteile wie Proteine, Lipide, RNA bzw. DNA dienen als Angriffspunkt für zytotoxische, elektrophile Substanzen, demnach sind kovalente Bindungen mit den Makromolekülen die Folge. Allerdings reagieren auch kleinere Moleküle in der Zelle mit Elektrophilen, im Falle von GSH werden die zytotoxischen Substanzen dabei auch schnell entgiftet. GSH kommt zwar in Zellen ubiquitär vor, die Menge an freiem GSH ist jedoch insbesondere bei hohen Substanzinkubationen schnell aufgebraucht. Damit gerät das Redox-Gleichgewicht der Zelle außer Kontrolle, wodurch sie anfälliger gegenüber oxidativen Schäden wird [Guengerich *et al.*, 2005]. Wie bereits in Kapitel 2.5.1 beschrieben, führt ROS zu Schäden an Proteinen, Lipiden und DNA. Als mögliche Endpunkte, durch die

sich eine zytotoxische Wirkung einer Testsubstanz entfalten kann, ist die Nekrose durch den Verlust der Membranintegrität und damit verbundener Zelllyse, die Auslösung des programmierten Zelltods (Apoptoseinduktion) sowie die Hemmung des Zellwachstums bzw. der Zellteilung zu nennen.

ANA zeigte sowohl nach 1 h als auch nach 24 h Inkubationszeit im untersuchten Konzentrationsbereich von 10-1000 μM keinen Einfluss auf die Zellvitalität von HT29 Zellen. Auch eine Depletierung von GSH mit BSO (500 μM) modulierte die relative Zellvitalität nach Inkubation mit ANA bis 1000 μM nach einer Inkubationszeit von 1 bzw. 24 h nicht. Der Verlust der Carboxyfunktion an Position C3 in PAP führte zu keiner gesteigerten Zytotoxizität im Vergleich zu ANA. Um einen Beitrag von CYP450-vermittelten Phase I-Metaboliten zur zytotoxischen Wirkung an HT29 Zellen abzuschätzen, wurden V79 Zellen (Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters) in die Untersuchungen miteinbezogen. Eine Inkubation mit ANA führte nach beiden Inkubationszeitpunkten (1 bzw. 24 h) bis zu einer Konzentration von 1000 μM zu keinem Rückgang der Zellvitalität von V79 Zellen.

Da zelluläre Wirkungen von ANA und PAP bisher in der Literatur noch nicht beschrieben sind, wurde im Rahmen einer Diplomarbeit im Arbeitskreis die zytotoxische bzw. wachstumshemmende Wirkung von ANA mittels SRB Test weiter untersucht [Diplomarbeit, Carolin Haushofer]. Insbesondere die Langzeitinkubation von 72 h erlaubte Rückschlüsse auf eine mögliche wachstumshemmende Wirkung, da dieser Inkubationszeitraum eine Verdopplungszeit (48-60 h) der HT29 Zellen beinhaltet. Nach 24 h ab einer ANA-Konzentration von 400 μM war ein signifikanter Abfall ($f < 0,05$) der Überlebensrate zu erkennen, der sich im weiteren Konzentrationsverlauf bis 1000 μM (61 %) verstärkte. Im Gegensatz hierzu war nach 72 h Inkubationszeit erst ab der höchsten gemessenen ANA-Konzentration von 1000 μM ein signifikanter wachstumshemmender Effekt ($f < 0,05$) zu beobachten, der jedoch mit einem Wert von 74 % höher lag als die Wachstumshemmung nach einer Inkubationszeit von 24 h. Aufgrund der stärkeren zytotoxischen Wirkung nach 24 h deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sich die Zellen nach einer verlängerten Inkubationszeit von 72 h wieder regenerieren können. Das Fehlen der Carboxygruppe an Position 3 des Pyridinium-Gerüsts bei PAP führte zu einer Verstärkung der wachstumshemmenden Wirkung in HT29 Zellen. Bereits eine Konzentration von 50 μM reduzierte nach 72 h signifikant die Zellviabilität ($f < 0,05$) auf einen Wert von 74 %, die sich im weiteren Konzentrationsverlauf bis 1000 μM weiter absenkte (58 %). Im Vergleich zu ANA zeigte auch PAP nach 24 h Inkubation eine Verstärkung der wachstumshemmenden Wirkung und hatte ab einer Konzentration von 100 μM einen Rückgang der Zellviabilität zur Folge. Einen Unterschied in der wachstumshemmenden Wirkung nach Inkubation mit PAP

zwischen der 24 bzw. 72 h Inkubation konnte allerdings nicht festgestellt werden. Die höchste gemessene Konzentration (1000 μM) führte nach beiden Inkubationszeitpunkten zu einer Reduktion der Überlebensrate auf etwa 60 %.

Zusammenfassend zeigten ANA und PAP lediglich eine zytotoxische Wirkung mittels SRB Test, der Rückschlüsse auf die Lebendproteinmenge behandelter Zellen in Relation zur Lebendproteinmenge unbehandelter Zellen erfasst. Die Untersuchung mittels Resazurin-Reduktionstest, der auf dem Metabolismus der Zellen basiert und somit ein Vitalitätsnachweis darstellt, fiel nach Inkubation mit ANA und PAP negativ aus. Trotz der zytotoxischen bzw. wachstumshemmenden Wirkung von ANA in HT29 Zellen scheinen die Effekte für den Menschen jedoch nicht relevant zu sein, da die Effekte erst in sehr hohen Konzentrationen ($\geq 400 \mu\text{M}$) auftraten, die voraussichtlich weit über einer möglichen Aufnahme durch Kaffee liegen. Die vermittelte Zytotoxizität durch PAP machte sich zwar bereits in geringeren Konzentrationen ($\geq 50 \mu\text{M}$) als bei ANA bemerkbar, sie diene jedoch als Modellverbindung, deren Entstehung im Lebensmittel und damit die potentielle Aufnahme für den Menschen bisher nicht bestätigt ist.

AA führte nach 24 h Inkubation zu einer signifikanten Reduktion der Zellvitalität von HT29 Zellen. Unter GSH-Verarmung reagierten die HT29 Zellen wesentlich sensitiver auf AA, was eine signifikante Verstärkung der zytotoxischen Eigenschaften von AA widerspiegelte. Der IC_{50} -Wert von AA in GSH-depletierten Zellen nach 24 h Inkubation lag bei $143,7 \pm 12,1 \mu\text{M}$. Im Vergleich hierzu lag der IC_{50} Wert von AA in HT29 Zellen mit physiologischem GSH-Status mit etwa $1000 \mu\text{M}$ deutlich höher. In der Untersuchung in V79 Zellen, in der AA (6 mM) als Positivkontrolle diente, wurde nach 24 h die Zellvitalität um etwa 40 % vermindert. Nach Depletion des GSH-Status und damit fehlender Entgiftungsmöglichkeit erwies sich AA als signifikant zytotoxisch und erniedrigte die Zellvitalität sogar auf 11 %. In weiteren Untersuchungen führte die 6 h Inkubation mit AA ab einer Konzentration von 2 mM im WST-1 Test an V79 Zellen zu einer Abnahme der Zellvitalität, die sich in GSH-depletierten V79 Zellen und damit fehlender Entgiftungsmöglichkeit deutlich verstärkte. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 h beeinflusste erst ab einer Konzentration von 6 mM die Zellvitalität, die sich allerdings unter GSH-Verarmung bereits ab einer Konzentration von $750 \mu\text{M}$ beeinflussen ließ [Puppel, 2007]. Zusammenfassend liegen jedoch die Konzentrationen, in denen AA in den beiden Zellmodellen HT29 sowie V79 die relative Zellvitalität reduzierte, oberhalb einer täglichen Aufnahme und scheinen somit für den Menschen nicht relevant zu sein. Warum allerdings HT29 Zellen gegenüber der AA-vermittelten Zytotoxizität das sensitivere Zellmodell zu sein scheint, wird im Folgenden diskutiert. HT29 Zellen besitzen kein CYP2E1 Enzym [Yu *et al.*, 2001], welches in der Lage ist

AA zum bedeutsam reaktiveren und toxischeren Metaboliten GA umzuwandeln [Ghanayem *et al.*, 2005]. Allerdings konnte bereits bei Konzentrationen $> 500 \mu\text{M}$ AA eine deutliche Reduktion der Zellvitalität in HT29 Zellen und folglich eine höhere Sensitivität im Vergleich zu V79 Zellen beobachtet werden. Untersuchungen von Bourguine *et al.* (2012) ergaben, dass HT29 Zellen über einige Phase I und II Enzyme verfügen und somit metabolisch kompetent sind. Da jedoch die Behandlung von V79 Zellen in sehr hohen AA-Konzentrationen von 6 mM einen Rückgang der Zellvitalität auf lediglich 40 % zur Folge hatte und V79 Zellen keine CYP-Aktivität aufweisen [Glatt *et al.*, 1987], spricht dieses Ergebnis gegen eine mögliche Beeinflussung anderer fremdstoffmetabolisierender Enzyme. Weiterhin exprimieren HT29 Zellen Transporter der *ATP-binding cassette* (ABC) Familie bzw. überexprimieren im Vergleich zu humanem, gesundem Kolongewebe Transporter der *Solute Carrier* (SLC) Familie. Diese Transporter sind für den Import (SLC) bzw. Export (ABC) von Substanzen, u. a. von Xenobiotika oder Phase I/II Metabolite verantwortlich [Nishimura *et al.*, 2008] und könnten insbesondere aufgrund der Überexprimierung von Vertretern der SLC Familie und folglich einem erhöhten Import von Xenobiotika einen Beitrag zur erhöhten Sensitivität von HT29 Zellen gegenüber AA leisten. Nach Puppel (2006) ist weiterhin aufgrund der Bindung von AA an GSH mit einem erhöhten oxidativen Stress für die Zelle durch AA im millimolaren Konzentrationsbereich zu rechnen, der nach Schädigung an Makromolekülen sehr wahrscheinlich ebenso einen Beitrag zur Zytotoxizität leisten wird.

Das B-Vitamin Niacin erwies sich im Resazurin-Reduktionstest in HT29 Zellen als nicht zytotoxisch. Ebenso führten die Kaffeeinhaltsstoffe NMP und Trigonellin zu keinem Rückgang der Zellvitalität in HT29 Zellen in Konzentration bis $1000 \mu\text{M}$. Die Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Boettler (2009). Die Inkubation von $500 \mu\text{M}$ NMP führte nur zu einer marginalen Verminderung des Zellproteins nach einer Inkubationszeit von 24 h gemessen im SRB-Test. Auch die Ergebnisse dieser Untersuchung zu Trigonellin bestätigen die Datenlage aus der Literatur, in der keine zytotoxischen Wirkungen von Trigonellin beschrieben wurden. Lediglich die höchste Konzentration von $500 \mu\text{M}$ zeigte nach einer 24 h Inkubation mit Trigonellin im SRB Test einen leichten Rückgang des Wachstums von HT29 Zellen auf etwa 85 % [Volz, 2010]. Somit scheinen die unterschiedlichen Substitutionen am Pyridinium-Grundgerüst, sowohl am Stickstoff als auch an der Position C3 des Aromaten, der untersuchten Verbindungen im Rahmen dieser Arbeit im Hinblick auf die untersuchte Zytotoxizität mittels Resazurin-Reduktionstest keine Rolle zu spielen.

Prooxidatives Potential

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu NMP, welches von Boettler *et al* (2011) als Aktivator des Nrf2-Signalwegs charakterisiert wurde, stellte sich die Frage ob auch ANA und PAP den Nrf2-Signalweg sowie die ARE-vermittelte Gentranskription modulieren und inwieweit eine Substanz-bedingte Induktion von ROS dazu beiträgt. NMP, Trigonellin, AA und Niacin sowie die Relevanz des zellulären GSH-Status wurden in die Untersuchungen miteinbezogen.

AA und NMP induzierten in der höchsten getesteten Konzentration von 1000 μM nach einer Inkubationszeit von 3 h den Gehalt an intrazellulärer ROS in GSH-depletierten HT29 Zellen. Weitere Untersuchungen mittels DCF-Test zeigten ebenfalls nach 3 h Inkubation mit NMP an HT29 Zellen lediglich in der höchsten Konzentration von 500 μM einen marginalen Anstieg des ROS-Gehalts [Boettler, 2009]. In Untersuchungen von Puppel (2006) verursachte AA selbst eine Depletion des GSH-Spiegels in Konzentrationen $\geq 3000 \mu\text{M}$. Somit konnte AA in GSH-depletierten HT29 Zellen durch GSH nicht mehr entgiftet werden, was in der höchsten getesteten Konzentration von 1000 μM aufgrund der Reaktivität von AA zur Induktion von ROS führte. Die Modellverbindung PAP zeigte im Rahmen dieser Untersuchungen das stärkste prooxidative Potential und erhöhte signifikant den ROS-Status in HT29 Zellen, wobei sich dieser Effekt durch Reduktion des GSH-Status noch weiter verstärkte.

Das Fehlen der Carboxygruppe an der Position C3 des Pyridinium-Grundgerüsts scheint für die Induktion von oxidativem Stress relevant zu sein, da nach Inkubation mit NMP und PAP der intrazelluläre ROS-Spiegel im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle anstieg, wobei die Testsubstanzen mit Carboxygruppe -ANA und Trigonellin- keine prooxidativen Effekte ausübten. Weiterhin scheint das Ausmaß der ROS-Induktion von der am Stickstoff substituierten Seitenkette abhängig zu sein, da nach Inkubation mit NMP (1000 μM) lediglich in GSH-depletierten HT29 Zellen der ROS-Spiegel erhöht wurde. Nach Inkubation mit PAP war hingegen die Induktion von ROS wesentlich stärker und konnte zusätzlich auch in nicht GSH-depletierten HT29 Zellen beobachtet werden.

Gentoxizität

Durch Untersuchungen von AA bzw. GA in unterschiedlichen Zellmodellen (primäre Rattenhepatozyten, V79) konnte bereits eine DNA-schädigende Wirkung im Comet Assay nachgewiesen werden [Puppel *et al.*, 2005; Thielen *et al.*, 2006]. Somit stellte sich die Frage nach der Wirkung von AA im Comet Assay unter Verwendung des Zellmodells HT29. Wie bereits zuvor erwähnt, verfügen HT29 Zellen im Gegensatz zu V79 Zellen zwar über einige Phase I bzw. II Enzyme, haben allerdings im Gegensatz zu primären Rattenhepatozyten kein

CYP2E1 [Bourgine *et al.*, 2012; Glatt *et al.*, 1987; Puppel, 2007]. Darüber hinaus wird durch die Abfangreaktion mit Niacin ein Produkt (ANA) generiert, welches möglicherweise geringere DNA-Schäden als AA hervorruft. Dies sollte im Comet Assay ebenfalls überprüft werden. Miteinbezogen in die Untersuchungen wurden PAP, NMP und Trigonellin. Da AA, PAP und NMP im DCF Test leichte prooxidative Effekte zeigten, wurde der Test zusätzlich in Anwesenheit von FPG durchgeführt, um oxidative DNA-Schäden u. a. in Form von 8-Oxoguanin als Folgereaktion von ROS, detektieren zu können.

Alle Testsubstanzen wiesen nach Kurzzeitinkubation von 1 h keine DNA-schädigende Wirkung an HT29 Zellen sowohl mit als auch ohne FPG-Behandlung auf. Trotz verlängerter Inkubationszeit auf 24 h erhöhten Niacin und Trigonellin die DNA-Strangbruchrate nicht. Sowohl eine verminderte Entgiftungskapazität durch GSH-Depletion als auch eine zusätzliche FPG-Behandlung führten zu keiner Induktion von DNA-Schäden durch Inkubation mit Niacin oder Trigonellin. Fehlte jedoch die Carboxygruppe wie bei NMP kam es zu einer Erhöhung der DNA-Strangbruchrate in der höchsten getesteten NMP-Konzentration von 1000 μM , die durch die Depletion des intrazellulären GSH-Spiegels weiter verstärkt wurde. Korrelierend zu den Ergebnissen des DCF Tests wurde ein Anstieg von oxidativen DNA-Schäden nach Inkubation sowohl in GSH-depletierten als auch in nicht depletierten HT29 Zellen beobachtet. Im Gegensatz zu der DNA-schädigenden Wirkung, die jedoch nur in einer sehr hohen Konzentration von 1000 μM NMP beobachtet werden konnte, belegen zahlreiche Untersuchungen, auf die in Kapitel 2.4 und Kapitel 2.5.2.2 bereits ausführlich eingegangen wurde, eine antioxidative Wirkung von Kaffee bzw. stark geröstetem Kaffeeextrakt mit hohem NMP-Gehalt sowie von der Einzelsubstanz NMP selbst [Bakuradze *et al.*, 2010, 2015 2016; Boettler *et al.*, 2011a, 2011b; Somoza *et al.*, 2003; Volz *et al.*, 2012].

Auch AA (500 μM) induzierte DNA-Strangbrüche in HT29 Zellen, eine Depletion des intrazellulären GSH-Spiegels erhöhte allerdings die DNA-schädigende Wirkung von AA nicht. Ein signifikant erhöhtes Level an FPG-sensitiven DNA-Schäden im Vergleich zur FPG-unbehandelten AA Inkubation wurde in der höchsten getesteten AA-Inkubation von 500 μM beobachtet. Von AA wäre zu erwarten, dass es nach der Inkubation unter GSH-Depletion auch zu einer stärkeren Induktion von DNA-Schäden kommt. Diese Annahme hat sich jedoch nicht bestätigt, weshalb die Ergebnisse des Resazurin-Reduktionstests bei der Bewertung der Ergebnisse des Comet Assays berücksichtigt werden müssen. Die beobachtete Zytotoxizität könnte zu einem falsch-negativen Ergebnis im Comet Assay führen, so dass es zur Entstehung von potentiellen DNA-Schäden womöglich nicht mehr kam. Puppel *et al.* (2005) konnten eine DNA-schädigende Wirkung mittels Comet Assay in

V79 bzw. Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation erst ab einer AA-Konzentration von 6 mM feststellen. Im Vergleich dazu blieb die Behandlung primärer Rattenhepatozyten bis zu einer Konzentration von 6 mM auf dem Niveau der Negativkontrolle, obwohl diese als einzige der drei verwendeten Zellsysteme ein hohes Level an CYP2E1 exprimieren und die Zellen somit in der Lage sind AA zum reaktiveren Epoxid GA zu metabolisieren. Die Autoren konnten auch nachweisen, dass eine hohe Aktivität von CYP2E1 in primären Rattenhepatozyten unter Kulturbedingungen vorlag, die erst ab dem dritten Tag in Kultur nachließ. Aufgrund des elektrophilen Charakters von AA und der Bindung an GSH wurde im weiteren Verlauf der Untersuchungen AA in GSH-depletierten V79 und primären Rattenhepatozyten untersucht. Unter GSH-Verarmung wurde in den primären Rattenhepatozyten bereits ab einer Konzentration von 1000 μM AA eine DNA-schädigende Wirkung mittels Comet Assay beobachtet. Auffallend war, dass die Effekte in GSH-depletierten V79 Zellen vergleichbar waren. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass aufgrund der fehlenden CYP-Aktivität in V79 Zellen die ausgelösten Effekte durch AA selbst verursacht zu sein scheinen und AA aufgrund der fehlenden Entgiftungsmöglichkeit durch GSH-Verarmung nicht detoxifiziert werden konnte. Als weitere Punkte werden jedoch noch die Möglichkeit einer Apoptoseinduktion sowie eines erhöhten oxidativen Stresses durch die GSH-Depletion diskutiert [Puppel *et al.*, 2005].

Die Adduktbildung zu ANA führte zu einer Aufhebung der DNA-schädigenden Wirkung von AA in HT29 Zellen, lediglich in GSH-depletierten HT29 Zellen erhöhte ANA die Anzahl der DNA-Schäden ($\geq 500 \mu\text{M}$) und verstärkte das Ausmaß oxidativer DNA-Schäden (1000 μM), allerdings ohne statistische Signifikanz. Zusätzlich konnte jedoch ein signifikanter Anstieg oxidativer DNA-Schäden in GSH-depletierten Zellen im Vergleich zu HT29 Zellen mit normalem GSH-Status in Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{M}$ detektiert werden. Ähnlich zu den Ergebnissen des SRB Tests traten die Effekte jedoch nur in sehr hohen Konzentrationen auf, die durch eine Aufnahme über Kaffee vermutlich nicht zu erreichen sind. Trotz der Induktion von oxidativen DNA-Schäden unter GSH-Depletion induzierte ANA den Spiegel an intrazellulärem ROS nach 3 h Inkubationszeit in HT29 Zellen und unter GSH-Depletion nicht. Dies deutet darauf hin, dass ANA in Zellen mit normalem GSH-Status möglicherweise über GSH entgiftet wird, es folglich zu keiner Induktion von ROS und zu keiner Erhöhung von oxidativen DNA-Schäden in HT29 Zellen kommen könnte. Sobald diese Entgiftungsmöglichkeit fehlte, waren zumindest DNA-Schäden sowie oxidative DNA-Schäden als Maß für oxidativen Stress die Folge. Die fehlende Induktion von ROS im DCF Test könnte mit dem Inkubationszeitpunkt zusammenhängen, so dass eine potentielle Erhöhung von ROS durch ANA nach einer Inkubationszeit von 3 h noch nicht induziert

wurde. Auch die Ergebnisse der 24 h Inkubation aus dem Comet Assay entkräften zumindest teilweise die Ergebnisse des SRB Tests, da im Zuge des Comet Assays die Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Ausschlusstest nach Substanzinkubation bestimmt wurde und eine Viabilität $\geq 80\%$ nach 24 h Inkubation mit ANA (10-1000 μM) festgestellt werden konnte.

Im Gegensatz zu ANA induzierte PAP im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle oxidative DNA-Schäden in der höchsten getesteten Konzentration von 500 μM unabhängig vom GSH-Status der Zellen. Die höchste Konzentration von 1000 μM PAP wurde aufgrund der starken zytotoxischen Wirkung nicht mehr untersucht, da sowohl im SRB Test als auch im Trypanblau-Ausschlusstest die Zellviabilität nach 24 h Inkubationszeit unter 80 % lag. Somit korrelieren die Ergebnisse des Comet Assays mit den Ergebnissen des DCF Tests und zeigen, dass der Verlust der Carboxygruppe mit einer Verstärkung oxidativer Wirkungen im Zusammenhang steht. PAP zeigte nach 3 h Inkubationszeit im DCF Test eine deutliche prooxidative Wirkung in HT29 Zellen mit physiologischem GSH-Status sowie unter GSH-Depletion. In Korrelation zu diesen Ergebnissen konnte auch mittels Comet Assay in GSH-depletierten HT29 Zellen eine signifikante Erhöhung oxidativer DNA-Schäden im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle detektiert werden, welche insgesamt jedoch schwächer als nach Inkubation mit ANA ausfiel. Somit scheint die fehlende Carboxy-Funktion bei PAP zwar bereits nach 3 h Inkubationszeit für die Erhöhung des ROS-Spiegels, allerdings auch für das geringere Ausmaß an oxidativen DNA-Schäden verantwortlich zu sein. Eine Übersicht der Ergebnisse zur Zytotoxizität, Genotoxizität und zur Induktion von ROS ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Zytotoxizität, Gentoxizität und Induktion von ROS durch ANA, PAP, AA, Niacin, NMP bzw. Trigonellin (Trig) in HT29 Zellen.

Endpunkt	Inkubationszeit	ANA	PAP	AA	Niacin	NMP	Trig
Metabolische Aktivität	24 h	-	-	500 µM *	-	-	-
	24 h, GSH-depletiert	-	-	100 µM ***	-	-	-
Lebendzellzahl	24 h	a)400 µM *	100 µM *	Im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht			
	72 h	a)1000 µM *	50 µM *				
ROS-Induktion	3 h	-	1000 µM M *	-	-	-	-
	3 h, GSH-depletiert	-	500 µM µM *	1000 µM *	-	1000 µM M	-
DNA-Schäden	24 h	-	-	500 µM +++	-	1000 µM M +	-
	24 h, GSH-depletiert	500 µM +++	-	500 µM +	-	500 µM +++	-
Oxidative DNA-Schäden	24 h	-	500 µM +	500 µM +++	-	500 µM ++	-
	24 h, GSH-depletiert	500 µM ++	500 µM +	500 µM +	-	500 µM ++	-

Anova: * $f < 0,05$; ** $f < 0,01$; *** $f < 0,001$; * statistisch signifikanter Unterschied zur geringsten Substanzkonzentration; + statistisch signifikanter Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle.

a) Daten aus Diplomarbeit von Carolin Haushofer

Nrf2-Signalweg

Wie bereits in der Literatur ausführlich beschrieben ist der Nrf2 Signalweg einer der Hauptmechanismen der Zelle, um oxidativem Stress entgegenzuwirken. Nach Aktivierung transloziert Nrf2 aus dem Zytosol in den Zellkern, um dort als Heterodimer mit weiteren Cofaktoren an das ARE in der Promotorregion bestimmter Zielgene zu binden (Kapitel 2.5.2.1). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse von PAP und NMP, die insbesondere unter

GSH-Depletion in HT29 Zellen ROS und oxidative DNA-Schäden induziert haben, sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit überprüft werden, ob es nach Substanzinkubation zu einer vermehrten Translokation von Nrf2 in den Zellkern mittels Western Blot-Analyse und folglich zu einer Aktivierung der ARE-vermittelten Gentranskription in GSH-depletierten HT29 kommt. ANA als strukturverwandte Pyridinium-Verbindung zu PAP bzw. NMP sowie AA, welches eine marginale prooxidierende Wirkung im DCF Test gezeigt hatte, wurden in die Untersuchungen miteinbezogen.

Korrelierend zu den Ergebnissen des DCF Tests führte die Behandlung mit PAP und mit NMP zu einer signifikanten Modulierung der Translokation von Nrf2 in den Zellkern. PAP zeigte einen Anstieg des Nrf2 Proteinspiegels im Zellkern ab einer Konzentration von 100 μM , die sich in der höchsten getesteten Konzentration von 1000 μM (densitometrische Auswertung: $152 \pm 17\%$) als statistisch signifikant erwies ($f < 0,01$). Durch die Behandlung mit NMP konnte eine starke Induktion des nukleären Nrf2-Proteinlevels in der niedrigsten getesteten Konzentration von 10 μM (densitometrische Auswertung: $204 \pm 15\%$) beobachtet werden. Wie bereits Boettler *et al.* (2011) berichteten, erhöhte NMP (100-500 μM ; 3 h Inkubationszeit) in HT29 Zellen in einem U-förmigen Kurvenverlauf die Nrf2-Translokation in den Zellkern. Eine NMP-Konzentration von 100 μM zeigte während dieser Untersuchung die potenteste Induktion des Nrf2-Proteinstatus im Nukleus. Somit kam es durch die GSH-Depletion von HT29 Zellen in der vorliegenden Studie zu einer um Faktor 10 verringerten Effektkonzentration in der NMP in HT29 Zellen einen Einfluss auf die Nrf2-Translokation zur Folge hatte. Zudem formulierten Boettler *et al.* (2011) die Hypothese, dass NMP-Konzentrationen ($\geq 100 \mu\text{M}$) trotz der nicht signifikanten Abnahme des Nrf2-Gehalts im Zytoplasma bei gleichzeitiger Zunahme des Nrf2-Gehalts im Kern zu einer reinen Translokation von Nrf2 in den Zellkern führten. Aufgrund der fehlenden ROS-Induktion durch ANA würde eine Erhöhung des Nrf2-Proteinlevels im Zellkern den ersten möglichen Schritt eines antioxidativen Wirkmechanismus darstellen. Nach Inkubation mit ANA könnte eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Proteinmenge von Nrf2 im Zellkern zumindest in Konzentrationen $\geq 100 \mu\text{M}$ vermutet werden. Die Menge an Nrf2 im Nukleus scheint in der niedrigsten Konzentration (10 μM) nach densitometrischer Auswertung aufgrund der hohen Standardabweichungen biologisch nicht relevant zu sein. Nach Inkubation mit AA kam es zu keiner Erhöhung des Nrf2-Proteingehalts im Zellkern. Dies hängt sehr wahrscheinlich mit den beobachteten zytotoxischen und DNA-schädigenden Effekten zusammen, die insbesondere nach einer verlängerten Inkubationszeit von 24 h beobachtet werden konnten.

Aufgrund des deutlichen Anstiegs der Nrf2-Translokation nach Behandlung mit PAP sowie des nicht eindeutigen Einflusses von ANA auf den Nrf2-Proteinspiegel im Zellkern wurde im Rahmen einer Diplomarbeit im Arbeitskreis die Modulation der redoxsensitiven Gene GSTA1, GSTT1, γ -GCL, UGT1A1 und Nrf2 sowohl nach 3 als auch nach 24 h Inkubationszeit zunächst in HT29 Zellen mit physiologischem GSH-Spiegel untersucht [Diplomarbeit Kathrin Kunz]. Die 500 μ M Inkubation mit ANA führte nach 3 h Inkubationszeit zu einem signifikanten Abfall ($f < 0,05$) der GSTT1-Transkription, die sich aber im weiteren Verlauf bis 1000 μ M auf das Niveau der Lösungsmittelkontrolle wieder erhöhte, so dass ein biologischer Effekt ausgeschlossen werden kann. Nach einer verlängerten Inkubationszeit von 24 h scheint sich die relative Transkription der γ -GCL zwar im untersuchten Konzentrationsbereich von 1-1000 μ M minimal aktivieren zu lassen, allerdings ohne statistische Signifikanz im Vergleich zur PBS-Kontrolle, so dass eine biologische Relevanz fraglich bleibt. Auch die Transkription der UGT1A1 wurde nach 24 h Inkubation leicht bis zu einer Konzentration von 100 μ M erhöht und fiel in den beiden höchsten Konzentrationen von 500 μ M und 1000 μ M wieder auf das Niveau der Kontrolle ab. Dieser Trend wurde ebenfalls bei der Transkription der GSTA1 beobachtet. Die relative Transkription der Gene UGT1A1, γ -GCL und GSTA1 wurde kaum durch ANA moduliert. Nach 3 h Inkubation mit 10 μ M PAP konnte eine signifikante Erhöhung ($f < 0,05$) der GSTA1-Genexpression beobachtet werden, die sich nach einer Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 h erst ab einer PAP-Konzentration von 100 μ M beobachten ließ. Allerdings blieb nach 24 h Inkubationszeit die Menge an Transkripten bis zu der höchsten Konzentration von 1000 μ M auf einem ähnlichen Niveau von etwa 1,5, die jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant waren [Diplomarbeit Kathrin Kunz].

ANA und PAP modulierten in HT29 Zellen nur marginal die Genexpression der untersuchten redoxsensitiven Gene. Daher wurden im weiteren Verlauf HT29 Zellen mit verringerter antioxidativer Abwehr durch GSH-Depletion als Zellmodell gewählt und überprüft, ob es analog zu den Ergebnissen der Western Blot-Analyse zu einer verstärkten Nrf2-vermittelten Stressantwort auf mRNA-Ebene der bereits zuvor untersuchten Gene kommt. Untersucht wurden ANA, PAP, NMP sowie AA nach 3 h Inkubationszeit (Tabelle 14). Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle wurde die GSTT1-Transkription nach Inkubation mit 10 μ M ANA auf einen Wert von $1,7 \pm 0,7$ % erhöht, weiterhin wurde auch statistisch signifikant ($f < 0,05$) die GSTA1-Transkription nach Inkubation mit 100 μ M ANA auf einen Wert von $2,5 \pm 1,1$ % induziert. Deutlich schwächer fiel hingegen der Einfluss auf die GSTA1-Transkription nach Behandlung mit 100 μ M PAP aus, welches lediglich zu einer marginalen Erhöhung auf eine relative Transkription von $1,7 \pm 1,4$ % führte. Die 100 μ M Behandlung mit AA induzierte die

relative GSTT1-Transkriptionsrate nur schwach und erhöhte sie auf einen Wert von $1,9 \pm 0,6\%$ gegenüber der PBS-Kontrolle. Die größten Effekte auf die Transkription der untersuchten Gene wies NMP auf. So führte die Inkubation mit NMP (100 μM) zu einer rund 3-fachen Erhöhung der Transkriptionsrate von GSTA1. Darüber hinaus wurde in der höchsten Konzentration von 1000 μM NMP eine Induktion aller untersuchten Gene festgestellt, die sich allerdings am stärksten auf die Gene $\gamma\text{-GCL}$ und Nrf2 ausprägte. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zur Modulation der Genexpression ist in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Erhöhung der Genexpression durch ANA, PAP, AA und NMP in HT29 Zellen.

	Inkubationszeit	$\gamma\text{-GCL}$	GSTA1	GSTT1	UGT1A1	Nrf2
ANA	a) 3 h	-	100 μM ; 1000 μM	-	-	-
	3 h, GSH-depletiert	-	100 μM^*	1 μM	-	-
	a) 24 h	-	1-100 μM	-	1-100 μM	-
PAP	a) 3 h	-	10 μM^*	-	-	-
	3 h, GSH-depletiert	-	-	-	-	-
	a) 24 h	-	100 μM^*	-	-	-
AA	3 h, GSH-depletiert	-	-	100 μM	-	-
NMP	3 h, GSH-depletiert	1000 μM	100 μM^*	1000 μM	1000 μM	1000 μM

Anova: * $f < 0,05$; * statistisch signifikanter Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle.

a) QT-PCR-Analysen von ANA und PAP nach 3 und 24 h Inkubation in HT29 Zellen aus Diplomarbeit Kathrin Kunz

Boettler *et al.* (2011) beobachteten nach 3 h Inkubationszeit deutlich stärkere Effekte auf die untersuchten Gene durch NMP in HT29 Zellen. Ab einer NMP-Konzentration von 10 μM wurde ein leichter Anstieg der Menge an GSTA1-Transkripten gegenüber der DMSO-Kontrolle beobachtet, der ab einer Konzentration von 100 μM sein Maximum erreichte. Des Weiteren wurde die relative Gentranskription von GSTT1 nach 3 h Inkubation ab einer

NMP-Konzentration von 1 μM signifikant erhöht. Die höchste Aktivierung konnte ab einer Konzentration von 10 μM durch NMP und einer relativen Transkription von $3,2 \pm 0,6\%$ gegenüber der DMSO-Kontrolle beobachtet werden. Eine 3 h Inkubation mit NMP mit einer Konzentration von 1 μM führte zu einer signifikanten Erhöhung der Transkription der $\gamma\text{-GCL}$ auf $3,7 \pm 1,2\%$ sowie in Konzentrationen $\geq 10 \mu\text{M}$ zu einer Erhöhung der Nrf2-Transkripte, welche bei einer Konzentration von 100 μM den stärksten Effekt zeigte [Boettler *et al.*, 2011]. Es gibt jedoch auch Untersuchungen, die den Effekt von NMP auf den Nrf2-Signalweg nicht bestätigen konnten. So konnte die zuvor von Boettler *et al.* (2011) beobachtete Erhöhung der Genexpression von NQO1 und $\gamma\text{-GCL}$ mittels Western Blot-Analyse auf Proteinebene in HT29 Zellen nicht bestätigt werden [Bakuradze, 2010]. Weiterhin konnten auch im Rahmen einer Diplomarbeit im Arbeitskreis die Effekte von NMP mittels QT-PCR in HT29 Zellen nicht bestätigt werden. Die nach Boettler *et al.* (2011) potenteste NMP-Konzentration in Höhe von 10 μM nach 24 h Inkubationszeit wurde unter Verwendung der gleichen Primer (GSTA1, GSTT1, $\gamma\text{-GCL}$, UGT1A1 und Nrf2) mittels QT-PCR untersucht. Da NMP als Salz vorliegt und dieses sowohl mit Chlorid als auch mit Iodid als Gegenion käuflich zu erwerben ist, wurden beide NMP-Salze getestet, um potentielle Einflüsse des Gegenions auf die Genexpression ausschließen zu können. Die beschriebene mehrfache Erhöhung insbesondere von $\gamma\text{-GCL}$, GSTT1 und Nrf2 konnte in diesen Experimenten sowohl mit NMP-Iodid als auch NMP-Chlorid nicht bestätigt werden. Ebenso wurden NMP-Iodid sowie das stark hygroskopische NMP-Cl auf einen potentiellen Abbau mittels $^1\text{H-NMR}$ untersucht, der jedoch ausgeschlossen werden konnte [Diplomarbeit Kathrin Kunz]. Zusammenfassend aus den Ergebnissen dieser Arbeit führte NMP zu einer schwächeren Modulation der untersuchten Gene in GSH-depletierten HT29 Zellen im Vergleich zu HT29 Zellen mit physiologischem GSH-Spiegel. Betrachtet man jedoch die Zusammenfassung der QT-PCR Ergebnisse, dargestellt in Tabelle 14, ließ sich ein klarer Trend der Pyridinium-Verbindungen NMP, ANA bzw. PAP unabhängig von ihrer Substitution am Stickstoff bzw. an Position C3 des Aromaten erkennen. Die Behandlung mit ANA, PAP bzw. NMP führte in HT29 Zellen zu einer ähnlich starken Aktivierung der GSTA1-Transkription im gleichen Konzentrationsbereich. Eine Modulierung der anderen Gene fiel dagegen weniger deutlich aus. Zusammenfassend wurde maximal eine 3-fache Steigerung der Genexpressionen durch die Substanzen bewirkt, so dass die Effekte insgesamt eher als gering eingestuft werden können.

Basierend auf den Daten dieser Arbeit lässt sich für NMP folgendes Wirkprofil postulieren. Zum einen wäre im niedrigen Konzentrationsbereich bis 100 μM eine minimale, antioxidative Schutzwirkung denkbar, da es zu einer gesteigerten Menge an Transkripten

redoxsensitiver Gene kam, die allerdings in GSH-depletierten HT29 Zellen deutlich schwächer ausfiel. Darüber hinaus führte eine NMP-Behandlung sowohl in GSH-depletierten HT29 Zellen als auch in Zellen mit physiologischem GSH-Status zu einer starken Erhöhung des Nrf2-Proteingehaltes im Zellkern. Diese These würde auch durch die Untersuchungen im DCF Test und Comet Assay bestätigt werden, da es in diesem Konzentrationsbereich zu keiner Erhöhung des intrazellulären ROS-Gehalts sowie zu keiner Induktion von (oxidativen) DNA-Schäden nach Behandlung mit NMP kam. Ein zytotoxischer Einfluss sowie eine Beeinflussung durch den GSH-Status konnten ebenfalls ausgeschlossen werden. In hohen Konzentrationen überwiegte jedoch die schädigende Wirkung von NMP, da im DCF Test eine Induktion von ROS ($\geq 1000 \mu\text{M}$) und folglich im Comet Assay oxidative DNA-Schäden ($\geq 500 \mu\text{M}$) beobachtet werden konnten. Zusammengefasst scheint somit im niedrigen μM Konzentrationsbereich die antioxidative Schutzwirkung und im hohen μM Konzentrationsbereich die schädigende Wirkung von NMP zu überwiegen.

Die Inkubation mit PAP führte zu einem Anstieg der Menge an Nrf2 im Zellkern ab einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$, die in der höchsten getesteten Konzentration von $1000 \mu\text{M}$ mit einer relativen Proteinmenge von $152,63 \pm 17,89 \%$ signifikant war ($f < 0,01$). Somit liegt die Vermutung nahe, dass HT29 Zellen als Antwort auf die ROS-induzierende Wirkung von PAP mit einer erhöhten Nrf2-Translokation in den Zellkern reagieren, um dem entstandenen Schaden durch ROS entgegenzuwirken. ANA beeinflusste die Nrf2 Translokation in den Zellkern nach 3 h Inkubationszeit in HT29 Zellen nicht. Da auch eine Wirkung auf die untersuchten redoxsensitiven Gene durch ANA sowie keine Schutzwirkung durch eine ANA-Vorbehandlung gegenüber Menadion-induziertem ROS nachzuweisen war, kann eine antioxidative Wirkweise von ANA ausgeschlossen werden. Allerdings führte die Adduktbildung zwischen Niacin und AA zu einer Aufhebung der Toxizität im Hinblick auf Zytotoxizität und Genotoxizität, die im Zellmodell HT29 Zellen durch AA induziert wurden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Doktorarbeit entstand im Rahmen eines Förderprojektes des Deutsch-Chinesischen Zentrums für Wissenschaftsförderung in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Zhou (School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology). Das Ziel dieser Arbeit war es zum einen zwei wässrige Gesamtextrakte sowie deren Unterfraktionen aus den traditionellen chinesischen Lebensmitteln JS und PE auf ihre zelluläre Wirkungen in HT29 Zellen zu untersuchen.

Im Hinblick auf potentielle, negative Eigenschaften wurden neben der potentiellen Zytotoxizität, die ROS-induzierende Wirkung sowie mögliche genotoxische und mutagene Effekte bestimmt. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass insbesondere der Gesamtextrakt aus PE Verbindungen enthält, die im verwendeten Zellmodell ROS induzieren und diese nachfolgend mit einer direkten DNA-schädigenden Wirkung sowie einer Erhöhung von oxidativen DNA-Schäden einhergehen. Die Erhöhung des zellulären ROS-Status könnte mit der gezeigten Induktion der Transkriptionsrate des Phase II Enzyms UGT1A1 im Zusammenhang stehen. Insgesamt tragen sowohl die Beeinflussung des zellulären Redoxstatus sowie die DNA-schädigende Wirkung von PE zur Hemmung der Proliferation nach 72 h bei. Inwieweit apoptotische Prozesse als DNA-Schadensantwort eine Rolle spielen, müsste in weiterführenden Untersuchungen näher charakterisiert werden. Insgesamt könnte jedoch ein Beitrag proliferationshemmender Effekte zur fehlenden Mutagenität von PE postuliert werden. Der Extrakt JS zeigte in den untersuchten Testsystemen kaum zelluläre Wirkungen, mit Ausnahme einer marginalen DNA-Schädigung in der höchsten getesteten Konzentration von (1 mg/ml), sowie einer Erhöhung der UGT1A1-Genexpression ($\geq 50 \mu\text{g/ml}$). Allerdings wurde nach 1 bzw. 24 h Vorinkubation keine Schutzwirkung gegenüber des Menadion-induzierten oxidativen Stresses im antioxidativen DCF Test beobachtet, so dass eine antioxidative Wirkung des Extrakts JS ausgeschlossen werden kann. Die beobachtete ROS-Induktion konnte auf artifizielle H_2O_2 -Entstehung im Zellkulturmedium zurückgeführt werden, da diese in Anwesenheit von Katalase komplett aufgehoben wurde.

Zeng *et al.* (2009) untersuchte die Möglichkeit durch Vitamin-Anreicherung die Konzentration der Lebensmittelkontaminante AA in Lebensmitteln während der Zubereitung zu minimieren, wobei das B-Vitamin Niacin als der potenteste Vertreter der getesteten Vitamine identifiziert werden konnte. Da die beiden Reaktionspartner AA und

Niacin während der Kaffeeröstung entstehen, wurde die Hypothese formuliert, dass dies ebenso für ANA zutreffen könnte. Von der Pyridinium-Verbindung NMP wurde ein Einfluss auf den Nrf2/ARE-Signalweg in der Literatur berichtet, so dass aufgrund der ähnlichen Struktur zu ANA die Hypothese einer Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalwegs durch ANA überprüft werden sollte. Aufgrund der Decarboxylierung des Kaffeealkaloids Trigonellin zu NMP während der Kaffeeröstung wurde auch PAP als decarboxyliertes Analogon zu ANA getestet. Analog zu den Untersuchungen der Extrakte wurden die zellulären Wirkungen von AA, ANA, PAP, NMP, Trigonellin und Niacin bestimmt. Die Abfangreaktion von AA an GSH und anschließende Ausscheidung als Mercaptursäure stellt den wichtigsten Detoxifizierungsweg dar. Daher wurden zusätzlich zu den Untersuchungen in HT29 Zellen mit physiologischem GSH-Spiegel die Testsubstanzen auf potentielle Effekte in GSH-depletierten HT29 Zellen untersucht.

Von den untersuchten Pyridinium-Verbindungen konnten unterschiedliche zelluläre Wirkungen in Abhängigkeit ihrer Substitution beobachtet werden. NMP scheint im niedrigen Konzentrationsbereich bis 100 μM eine antioxidative Schutzwirkung im untersuchten Zellmodell HT29 zu haben. Unter GSH-Depletion fielen die Effekte auf die Aktivierung redoxsensitiver Gene deutlich schwächer aus, lediglich die Transkription von GSTA1 wurde bei einer Konzentration von 100 μM nach 3 h leicht erhöht. Der stärkste Anstieg des nukleären Nrf2-Proteinlevels wurde bereits bei einer Konzentration von 10 μM gemessen. In Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{M}$ scheinen adverse Effekte durch NMP hervorgerufen zu werden, die mit einer Induktion von oxidativen und primären DNA-Schäden unabhängig vom zellulären Redoxstatus einhergehen. In GSH-depletierten HT29 Zellen wurde eine erhöhte ROS-Akkumulation festgestellt, die möglicherweise mit der leichten Hochregulierung der Gentranskripte für die detoxifizierenden Proteine GSTT1, γ -GCL, UGT1A1 und Nrf2 im Zusammenhang stehen.

PAP wies nach 24 h Inkubationszeit zytotoxische sowie nach 72 h Inkubationszeit wachstumshemmende (50 μM) Eigenschaften auf. In Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{M}$ wurden zusätzlich ROS-induzierende sowie DNA-schädigende Wirkungen, insbesondere oxidative DNA-Schäden, beobachtet. PAP führte in Zellen mit erniedrigter antioxidativen Kapazität zu einer Erhöhung von DNA-Schäden. Zusätzlich wurde jedoch eine Aktivierung und Translokation des Nrf2-Proteins detektiert, welche mit einer ARE-vermittelten Transkription von GSTA1 einhergeht. Zusammenfassend scheint das oxidative Potential von PAP eine Nrf2-vermittelte Signalantwort zur Folge zu haben.

Im Rahmen der Sicherheitsbewertung ist anzumerken, dass ANA im Vergleich zu AA *in vitro* keine bzw. nur marginale zytotoxische und genotoxische Wirkungen aufweist. ANA zeigte

zwar nach einer Inkubationszeit von 24 h ($\geq 400 \mu\text{M}$) bzw. 72 h ($1000 \mu\text{M}$) eine Hemmung des Zellwachstums von HT29 Zellen, allerdings konnte die Wirkung der 24 h Inkubation durch den Trypanblau-Ausschlusstest im Comet Assay sowie den Resazurin-Reduktionstest nicht bestätigt werden. Eine DNA-schädigende Wirkung wurde nur in hohen Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{M}$ und in Zellen mit reduziertem GSH-Status beobachtet. Inwiefern diese hohen Konzentrationen für den Menschen von Relevanz sind, bedarf es weiterer Untersuchungen. Ohnehin müsste das Extraktionsvermögen von ANA während der Zubereitung von Kaffee sowie ANA selbst im Hinblick auf das ADME (*absorption, distribution, metabolism, excretion*; Absorption, Verteilung, Metabolismus, Ausscheidung)-Prinzip weitreichend untersucht werden. Außerdem sollte geklärt werden, welche weiteren Produkte durch die Niacin-Supplementierung entstehen könnten und welche Effekte diese haben könnten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Bindung von AA an das B-Vitamin Niacin zu einem Addukt mit verminderten DNA-schädigenden Eigenschaften führt, wie sie von der gentoxischen Verbindung AA sowie seines reaktiven Metaboliten GA *in vitro* sowie *in vivo* bereits beobachtet werden konnten. Die Adduktbildung mit Niacin könnte somit eine Möglichkeit darstellen, den AA-Gehalt in Lebensmitteln zu reduzieren. Dabei muss jedoch beachtet werden, in welchem Umfang Niacin den Lebensmitteln zum Abfangen von AA zugesetzt werden müsste und ob es durch diese Anreicherung zu keiner Überschreitung der tolerierbaren Höchstmengen von Niacin kommt.

Während der thermischen Herstellung von Lebensmitteln entsteht eine Vielzahl an Verbindungen, die einen Beitrag zum Aroma aber auch zur biologischen Aktivität leisten. Das Wissen der Modifizierung von Nahrungsbestandteilen durch die Verarbeitung und den Wirkmechanismus der wichtigsten bioaktiven Verbindungen ist für das Prozessmanagement nützlich. Toxikologisch relevante Kontaminanten können minimiert und die Anzahl präventiver Verbindungen erhöht werden, um Lebensmittel mit positiven Auswirkungen auf die Gesundheit zu erhalten.

5 Material und Methoden

5.1 Synthesen

Die Synthesen von ANA, PAP und ANA-d3 sind in Kapitel 3.2.1 beschrieben.

5.2 LC/MS-Analyse

Die LC/MS-Methodenentwicklung und -etablierung zur Messung von ANA in Kaffeebohnen sowie die Aufbereitung der Proben sind in Kapitel 3.2.2 beschrieben.

5.3 Zellkultivierung

5.3.1 HT29 Zelllinie

Bei HT29 Zellen handelt es sich um eine humane Zelllinie eines Kolonadenomakarzinoms, die im Jahre 1964 aus einem Kolonkarzinom einer 44 Jahre alten, kaukasischen Frau isoliert und etabliert wurde [DSMZ, 2004]. HT29 Zellen wachsen adhärent mit einer Verdopplungszeit von 40 bis 60 h. Werden die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert, so formen sie einen Multilayer undifferenzierter Zellen, welche einen hohen Glukoseverbrauch aufweisen [Cohen *et al.*, 1999]. Die Kultivierung der Zelllinie erfolgt in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 5 ml Penicillin/Streptomycin (P/S) und Phenolrot (Nährmedium; N-Medium). Die Zellen werden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in Kulturflaschen mit einer Fläche von 175 cm² kultiviert.

5.3.2 Mediumwechsel

Um das Wachstum unter optimalen Bedingungen zu gewährleisten und die Viabilität der Zellen zu erhalten, ist in regelmäßigen Abständen ein Wechsel des Nährmediums erforderlich. Der Mediumwechsel dient der Zufuhr neuer Nährstoffe sowie der Entfernung von Stoffwechselprodukten. Der Zeitpunkt wird durch den Farbumschlag von rot nach gelb des im Medium enthaltenen Phenolrots festgelegt (Umschlagsbereich bei pH 6,4 bis 8,2) und findet in der Regel alle 2 bis 3 Tage statt.

5.3.3 Subkultivierung (Passagieren)

Um einen Wachstumsstillstand oder ein Absterben der Kultur zu vermeiden, wird bei ca. 80 % Konfluenz eine Subkultivierung vorgenommen.

Durchführung

- Das Medium wird entfernt und die am Flaschenboden haftenden Zellen mit vorgewärmten PBS gewaschen.
- Anschließend werden 4 ml Trypsin-EDTA zugegeben und die Zellen im Brutschrank für ca. 5 min bei 37 °C inkubiert.
- Das zusätzliche Klopfen am Flaschenboden erleichtert die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden.
- Danach wird der Trypsin-Verdau mit 10 ml N-Medium abgestoppt und eine definierte Menge an Zellsuspension mit 40 ml N-Medium weiterkultiviert.

Diese Subkultivierung wird max. 30-mal durchgeführt, da sich die physiologischen Eigenschaften von Zellen verändern können.

5.3.4 Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren von Zellen werden 500 µl einer Mischung aus 2,8 ml FKS und 1,2 ml DMSO (DMSO Endkonzentration entspricht 10 %) als Frostschutz in ein 2 ml Kryoröhrchen vorgelegt. Anschließend wird 1 ml (ca. 1 Mio. Zellen) Zellsuspension hinzugegeben. Die Suspension wird zuerst 24 h bei -20 °C und danach bei -80 °C gelagert.

5.3.5 Auftauen der Zellen

Die gefrorene Zellsuspension wird im Wasserbad zügig bei 37 °C aufgetaut, danach in einer 15 ml Probenröhre mit 10 ml N-Medium versetzt, um den DMSO Anteil aufgrund seiner Zytotoxizität zu verdünnen. Nach 5 min Zentrifugation bei 800 g und RT wird der Überstand vorsichtig abdekantiert. Das Zellpellet wird in 1 ml N-Medium resuspendiert und anschließend in eine 25 cm²-Kulturflasche überführt. Nach Zugabe von ca. 10 ml Nährmedium (mit 20 % FKS) wird die Kulturflasche im Brutschrank kultiviert.

5.3.6 Bestimmung der Zellzahl und Viabilität mittels Trypanblau-Ausschlusstest

Zur Bestimmung von Zellzahl und Viabilität werden die Zellen mit Trypanblau angefärbt. Der Farbstoff durchdringt geschädigte Zellmembranen toter Zellen und färbt diese blau. Eine intakte Zellmembran kann der Farbstoff aufgrund seiner Größe nicht passieren, daher erscheinen diese Zellen unter dem Lichtmikroskop hell. Mit Hilfe einer Neubauer-

Zählkammer kann somit die Zahl der lebenden und toten Zellen mikroskopisch bestimmt werden.

Die Zählkammer besteht aus neun großen Quadraten. Jedes große Quadrat hat eine Fläche von $1000 \mu\text{M}^2$ und eine Tiefe von $0,1000 \mu\text{M}$; dies ergibt ein Volumen von $0,1 \mu\text{l}$. Es werden mindestens vier große Quadrate ausgezählt. Damit eine Mehrfachzählung der Zellen vermieden wird, werden nur die Zellen berücksichtigt, die auf den oberen und auf den linken Rand fallen (Abbildung 42).

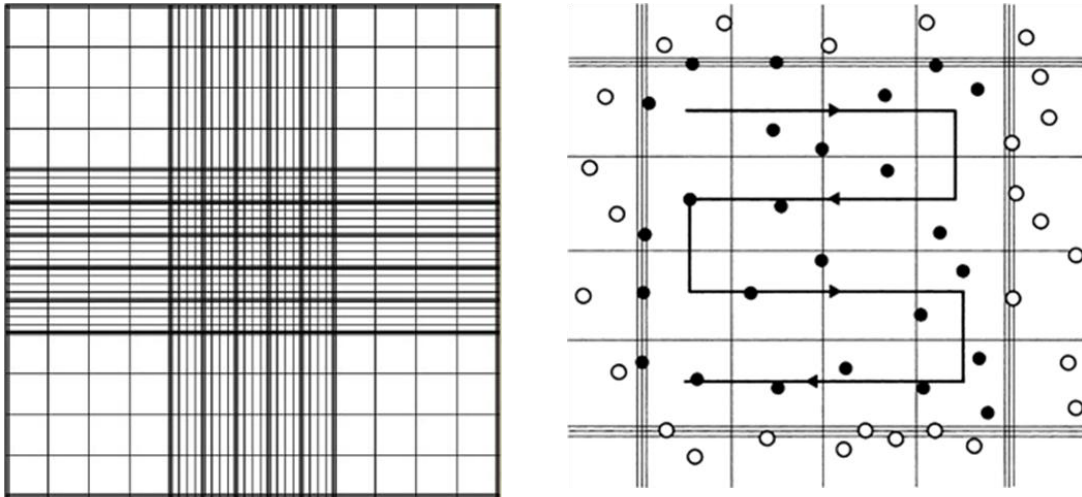


Abbildung 42 Aufbau (links) und Zählweise (rechts) der Neubauer-Zählkammer [Sabine Schmitz, Der Experimentator, 2011]

Durchführung

- Vor dem Gebrauch werden das Hämocytometer und das Deckglas mit 70 % EtOH gereinigt. Dann wird die Zählkammer durch Anhauchen befeuchtet und das Deckglas mit leichtem Druck darauf angebracht. Nur wenn die sogenannten Newtonschen Ringe erscheinen, sitzt das Deckglas korrekt.
- $20 \mu\text{l}$ der Zellsuspension werden mit $180 \mu\text{l}$ Trypanblau verdünnt (Verdünnung 1:10) und gut durchmischt. Mit Hilfe einer Mikroliterpipette wird die Kammer mit der Suspension so befüllt, dass sie vollständig mit Flüssigkeit angefüllt ist, ohne dass sie überfüllt wird.

Berechnung der Viabilität

Die Viabilität wird gemäß folgender Formel berechnet:

$$\text{Viabilität} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{(\text{Anzahl lebender Zellen} + \text{Anzahl toter Zellen})} \cdot 100$$

Berechnung der Zellzahl

Die Zellzahl pro ml wird gemäß folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{4} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Kammerfaktor}$$

Verdünnungsfaktor: 10

Kammerfaktor: 10^4

5.4 Verwendete *in vitro* Testsysteme

5.4.1 Aussaat von Zellen

Eine definierte Anzahl an Zellen wurde in Abhängigkeit der Untersuchungsmethode in unterschiedlichen Zellkulturgefäßen ausgesät (

Tabelle 15).

Tabelle 15 Schema Zellzahlen und Zellkulturgefäße der unterschiedlichen Tests

	Resazurin- Reduktionstest	DCF Assay (prooxidativ)	DCF Assay (antioxidativ)	Comet Assay	Western Blot	PCR	HPRT
Zelllinie	HT29						V79
1 h Inkubation	13.000 Zellen/well	-	32.000 Zellen/well	300.000 Zellen/Schale	-	-	-
3 h Inkubation	-	32.000 Zellen/well	-	-	5 Mio Zellen/Schale	220.000 Zelle/well	-
24 h Inkubation	10.500 Zellen/well	-	40.000 Zellen/well	200.000 Zellen/Schale	4,5 Mio Zellen/Schale	200.000 Zelle/well	1 Mio. Zellen/Flasche
Material	96 well Platte			Petrischale (Ø 6 cm)	Petrischale (Ø 15 cm)	6 well Platte	75 cm ² Flasche
Volumen	100 µl			5 ml	20 ml	5 ml	10 ml
Medium	N-Medium (DMEM high glucose, 10 % FKS, 1 % P/S) (DCF Assay: Verwendung von phenolrotfreiem Medium)						N-Medium (DMEM low glucose, 10 % FKS, 1 % P/S)

5.4.2 Inkubationslösungen von Inhaltsstoffen und Lebensmittelmodellverbindungen

Von den zu testenden Substanzen ANA, PAP, NMP, AA, Niacin und Trigonellin wurden 100 mM Stammlösungen in PBS angesetzt und bei -20 °C gelagert. Menadion wurde vor jedem Versuch frisch als 100 mM Stammlösung in DMSO angesetzt.

Aus den 100 mM Stammlösungen der jeweiligen Testsubstanz wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, bei der die eingesetzte Endkonzentration des Lösungsmittels für PBS bei 1 % (Verdünnung 1:100) und für DMSO bei 0,5 % (Verdünnung 1:200) lag:

Inkubationslösungen für ANA, PAP, NMP, AA, Niacin und Trigonellin

Endkonzentration im Medium: 1 µM, 10 µM, 100 µM, 500 µM, 1000 µM

- 100 mM Stammlösung in PBS herstellen
- Aus der Stammlösung werden Zwischenverdünnungen hergestellt: 100 µM, 1000 µM, 10 mM, 50 mM
- Zwischenverdünnungen 1:100 mit N-Medium verdünnen (1 % PBS)

Inkubationslösungen für Menadion

Endkonzentration im Medium: 20 µM

- 100 mM Stammlösung in DMSO herstellen
- Aus der Stammlösung eine 4 mM Zwischenverdünnung in DMSO herstellen
- Zwischenverdünnung 1:200 mit N-Medium verdünnen (0,5 % DMSO)

5.4.3 Inkubationslösungen der Extrakte aus Peking Ente und Jinhua Schinken

Die Stammlösungen der wässrigen Gesamtextrakte aus JS bzw. PE sowie die verschiedenen Einzelfractionen beider Extrakte, die von der chinesischen Kooperationsgruppe isoliert und zur Verfügung gestellt wurden, wurden bei -20 °C gelagert und vor jedem Versuchsbeginn frisch angesetzt. Hierzu wurde eine Stammlösung des jeweiligen Extrakts von 1 mg/ml direkt in N-Medium hergestellt, aus dieser wurden die weiteren Konzentrationen (1, 5, 10, 50, 100, 175, 250, 325, 400, 500 und 750 µg/ml) mit N-Medium dementsprechend verdünnt.

5.4.4 Untersuchungen zur Zytotoxizität mittels Resazurin-Reduktionstest

Zytotoxische Effekte der Testsubstanzen werden durch Messung der metabolischen Aktivität mittels Resazurin-Reduktionstest bestimmt. Intakte, vitale Zellen reduzieren den tiefblauen Farbstoff Resazurin zu seiner fluoreszierenden, pinkfarbenen Form Resorufin (Abbildung 43). Metabolische Intermediate wie NADPH, NADH, FADH und FMNH stehen in direktem Verhältnis zur Reduktion von Resazurin zu Resorufin [O'Brien *et al.*, 2000].

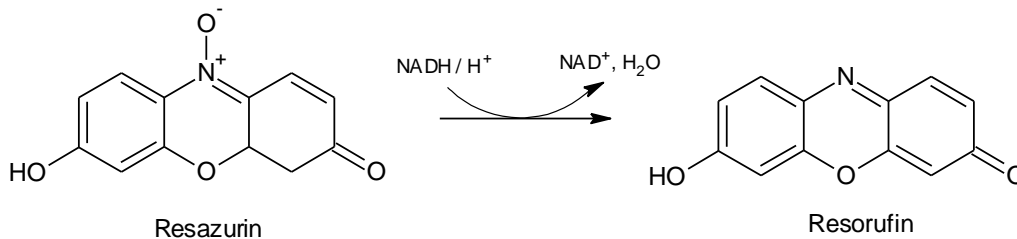


Abbildung 43 Reduktion von Resazurin zu Resorufin

Durchführung

HT29 Zellen werden wie in Kap. 5.4.1 beschrieben ausgesät und für 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit anwachsen gelassen. Danach erfolgt die Substanzinkubation in einer 6-fach Bestimmung für jeweils 1 bzw. 24 h (Kap. 5.4.2 bzw. 5.4.3). Eine Lösungsmittelkontrolle (1 % PBS), eine Positivkontrolle (0,1 % Saponin) sowie mehrere Leerwerte (well ohne Zellen, nur Resazurin-Arbeitslösung) werden auf jeder Platte mitgeführt.

Nach der 1 bzw. 24 h Inkubation wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 100 µl PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen pro well mit 200 µl Resazurin-Arbeitslösung inkubiert. Nach 1 h Inkubation im Brutschrank wird die 96 well Platte am Plattenlesegerät bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm bei einer Temperatur von 37 °C vermessen.

Auswertung

Von den gemessenen Rohwerten wird der gemittelte Leerwert abgezogen und die zusammengehörenden Werte der 6-fachen Bestimmung mit dem Ausreißertest nach Nalimov überprüft. Ausreißer werden eliminiert und anschließend die übrigen Werte gemittelt. Die Mittelwerte werden auf die normierte Lösungsmittelkontrolle (100 %) bezogen, um die relative Vitalität [%] zu erhalten.

Reagenzien und Lösungen

Resazurin-Stammlösung	110.5 mg Resazurin in 1 ml DMSO Lagerung bei 4 °C
Resazurin-Arbeitslösung	100 µl Resazurin-Stammlösung 14.4 mg KH ₂ PO ₄ 900 mg NaCl 52.8 mg Na ₂ HPO ₄ ad H ₂ O bidest. auf 100 ml Lagerung bei 4 °C
Resazurin-Inkubationslösung	Resazurin-Arbeitslösung 1:10 mit serumfreiem DMEM high glucose Medium verdünnen, vor jedem Versuch frisch ansetzen

5.4.5 Untersuchungen zur Zytotoxizität mittels SRB Test

Bei Sulforhodamin B (SRB) handelt es sich um einen wasserlöslichen, pinken Aminoxanthenfarbstoff, der unter leicht sauren Bedingungen an basische Aminosäuren bindet (Abbildung 44). Da Zellzahl und Proteingehalt in einem konstanten Verhältnis miteinander stehen, können zytotoxische bzw. wachstumshemmende Eigenschaften einer Substanz in Relation zur Mediumkontrolle bestimmt werden [Skehan *et al.*, 1990].

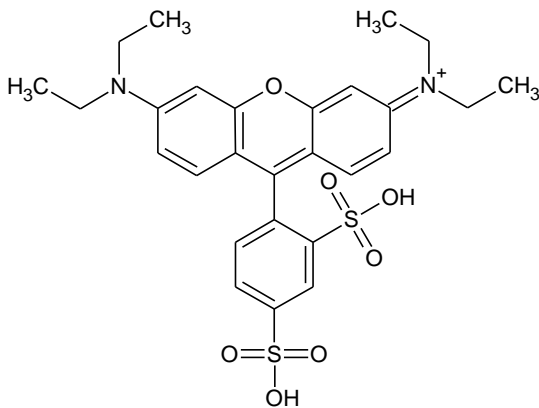


Abbildung 44 Strukturformel Sulforhodamin B

Durchführung

HT29 Zellen werden wie in Kap. 5.4.1 beschrieben ausgesät und für 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit anwachsen gelassen. Danach erfolgt die Substanzinkubation in einer 4-fach Bestimmung für jeweils 1 bzw. 24 h (Kap. 5.4.2 bzw. 5.4.3). Eine Lösungsmittelkontrolle (1 % PBS) sowie zwei Leerwerte (ohne Zellen, nur Resazurin-Arbeitslösung) werden auf jeder Platte mitgeführt.

Nach der Inkubation wird die Substanzreaktion mit 100 µl kalter 50 % TCA (Trichloressigsäure) abgestoppt und die Zellen für 1 h bei 4 °C gekühlt, um die zu diesem Zeitpunkt noch lebenden Zellen am Plattenboden zu fixieren. Danach werden durch viermaliges vorsichtiges Waschen unter schwach fließendem Leitungswasser Zellreste und überschüssiges Medium entfernt und die Platten für 1 h bei 60 °C getrocknet. Die Zellen werden nun mit 250 µl 0,4 % SRB-Lösung für 1 h im Dunkeln angefärbt. Anschließend wird der nicht an das Zellprotein gebundene Farbstoff zweimal mit schwach fließendem Leitungswasser sowie zweimal mit 1 % Essigsäure abgespült. Die Platten werden wieder für 1 h bei 60 °C getrocknet und der Farbstoff schließlich mit 500 µl Tris-Base (pH 10) gelöst. Die Absorption wird daraufhin mit einem Mikrotiterplattenlesegerät bei 570 nm vermessen.

Auswertung

Von den gemessenen Extinktionswerten wurde jeweils der Leerwert abgezogen. Danach wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der Testsubstanzkonzentrationen gebildet und auf die Mittelwerte der Mediumkontrolle bezogen (= T/C).

Reagenzien und Lösungen

Trichloressigsäure	50 % in ddH ₂ O
Essigsäure-Lösung	1 % iEssigsäure in ddH ₂ O
SRB-Lösung	0,4 % SRB in 1 % Essigsäure-Lösung
Tris-Base	10 mM Tris-Base in ddH ₂ O

5.4.6 ROS-Induktion mittels Dichlorfluorescein (DCF) Test

Zur Untersuchung des oxidativen Potentials einer Testsubstanz wird mit Hilfe des DCF Tests die Entstehung von oxidativem Stress, in Form von intrazellulär gebildeten ROS, bestimmt. Hierzu werden die Zellen mit dem unpolaren 2',7'-Dichlorfluorescindiacetat (DCFH-DA) vorinkubiert, welches durch intrazellulär vorliegende Esterasen in seine polare, jedoch nicht fluoreszierende Form 2',7'-Dichlorfluorescin (DCFH) umgewandelt wird. In Anwesenheit von ROS wird diese dann zur fluoreszierenden Form 2',7'-Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert (Abbildung 45). Diese Fluoreszenzänderung wird bei einer Anregungswelle von 495 nm und einer Emissionswellenlänge von 529 nm gemessen und in Relation zur Lösungsmittelekontrolle (1 % PBS; normiert auf 100 %) gesetzt [Wang *et al.*, 1999]. Unter Verwendung eines zweistufigen Inkubationsprotokolls kann auch die antioxidative Wirkung von Substanzen gegenüber einer ROS-induzierenden Positivkontrolle untersucht werden.

Um diese präventive Schutzwirkung zu untersuchen, erfolgt zunächst eine 1 bzw. 24 h Vorinkubation mit den zu untersuchenden Testsubstanzen, danach erst erfolgt die Inkubation mit DCFH-DA und im Anschluss die Inkubation mit dem ROS-Initiator Menadion (20 μM). Bei dieser Variante wird die Fluoreszenzänderung in Relation zur Menadion-behandelten Kontrolle (normiert auf 100 %) gesetzt.

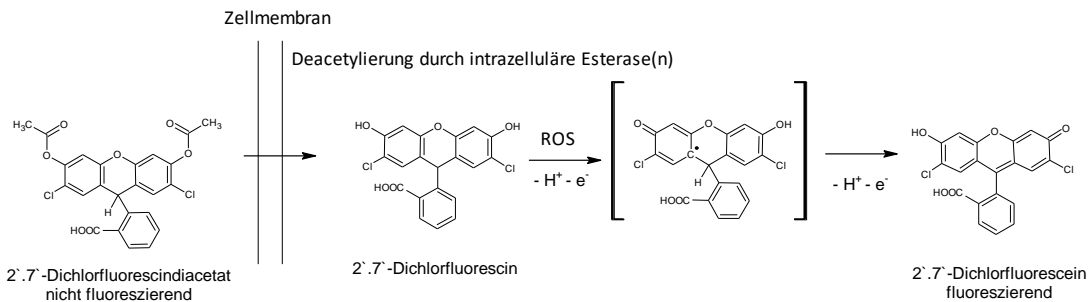


Abbildung 45 Schema DCF

Durchführung antioxidativer DCF

HT29 Zellen werden wie in Kap. 5.4.1 beschrieben ausgesät und für 48 h bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit anwachsen gelassen. Danach erfolgt die Substanzinkubation in einer 6-fach Bestimmung für jeweils 1 bzw. 24 h (Kap. 5.4.2 bzw. 5.4.3). Die Lösungsmittelkontrollen (1 % PBS; 0,5 % DMSO), Menadion (20 μM in DMSO) als Positivkontrolle sowie mehrere Leerwerte werden auf jeder Platte mitgeführt.

Nach der 1 bzw. 24 h Vorinkubation der Testsubstanzen wird das Inkubationsmedium abgesaugt und die Zellen mit 100 μl PBS gewaschen. Danach werden aufgrund der Lichtempfindlichkeit von DCFH-DA alle weiteren Arbeitsschritte im Dunklen durchgeführt. Die Zellen werden mit 100 μl frisch hergestellter DCFH-DA Inkubationslösung (50 μM) für 30 min im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wird die DCFH-DA Inkubationslösung abgesaugt und die Zellen erneut mit 100 μl PBS gewaschen. Anschließend werden pro well 100 μl Menadion-Lösung (20 μM) in DMEM high glucose ohne Phenolrot zugegeben. Die 96 Well-Platte wird sofort nach Menadionzugabe sowie nach drei Stunden bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm bei einer Temperatur von 37 °C vermessen.

Durchführung prooxidativer DCF

HT29 Zellen werden gemäß Kap. 5.4.1 ausgesät und für 48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit anwachsen gelassen. Nach der Anwachszeit von 48 h wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 100 µl PBS gewaschen. Danach werden alle weiteren Arbeitsschritte aufgrund der Lichtempfindlichkeit von DCFH-DA im Dunklen durchgeführt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit 100 µl frisch hergestellter DCFH-DA Inkubationslösung (Endkonzentration 50 µM) für 30 min im Brutschrank. Nach erneutem Waschen mit 100 µl PBS werden die Zellen mit der Testsubstanz in DMEM high glucose ohne Phenolrot, den Lösungsmittelkontrollen (1 % PBS; 0,5 % DMSO) sowie Menadion (20 µM in DMSO) als Positivkontrolle inkubiert (Kap. 5.4.2 bzw. 5.4.3). Ein Blank wird auf jeder Platte mitgeführt.

Die 96 Well-Platte wird sofort nach Substanzzugabe sowie nach drei Stunden bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm bei einer Temperatur von 37 °C vermessen.

Auswertung

Von den Messwerten werden die gemittelten Leerwerte abgezogen und anschließend gemäß folgender Formel die Zunahme der Fluoreszenzintensität (FI) pro well berechnet:

$$FI [\%] = \frac{F(180 \text{ min}) - F(0 \text{ min})}{F(0 \text{ min})}$$

F(0 min): Fluoreszenzintensität bei Inkubationsbeginn

F(180 min): Fluoreszenzintensität nach 180 min Inkubation

Die Werte aus der 6-fachen Bestimmung werden mit dem Ausreißertest nach Nalimov überprüft. Ausreißer werden eliminiert und anschließend die übrigen Werte gemittelt. Der Mittelwert der Testsubstanzen wird auf den Mittelwert der Menadionkontrolle (100 %) beim antioxidativen DCF Assay bzw. auf die Lösungsmittelkontrolle (100 %) beim prooxidativen DCF Assay bezogen, wodurch man den relativen Fluoreszenzanstieg (T/C) erhält.

Reagenzien und Lösungen

DCFH-DA Stammlösung	4.89 mg DCFH-DA in 1 ml DMSO lösen (unter Lichtausschluss in einem schwarzen Reaktionsgefäß) Lagerung bei -20 °C
---------------------	---

DCFH-DA Arbeitslösung DCFH-DA Stammlösung 1:200 mit PBS verdünnen,
 vor jedem Versuch frisch ansetzen

5.4.7 Untersuchungen zur DNA-Schädigung mittels Comet Assay

Die Einzelzellelektrophorese, auch Comet Assay genannt, dient der Untersuchung von zellulären DNA-Schäden. Diese können entweder direkt an der DNA entstehen, wie beispielsweise durch Strahlung oder Xenobiotika-bedingte Modifikationen, oder indirekt, z. B. durch Topoisomerasegifte, gebildet werden.

Die DNA ungeschädigter Zellkerne erscheint als rund, geschädigte DNA bildet charakteristische Formen, die Kometen ähneln und dem Test seinen Namen gaben (Abbildung 46).

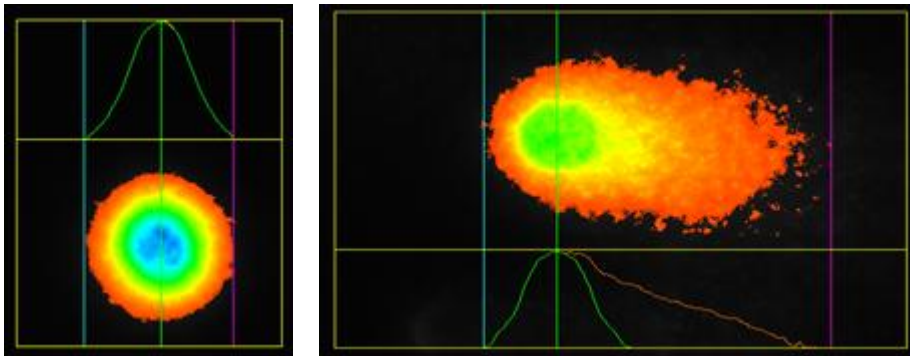


Abbildung 46 Beispiel einer ungeschädigten Zelle (links) und einer stark geschädigten Zelle (rechts).

Als Maß für die DNA-Strangbrüche wird die Fluoreszenzintensität im Schweif (Maß für den prozentualen Anteil an DNA im Kometen Schweif, *tail intensity*, TI %) verwendet.

Um zusätzlich eine Aussage über das Ausmaß oxidativer DNA-Schäden zu erhalten, wurde ein Teil der Zellen mit dem Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) behandelt. Bei FPG handelt es sich um ein bifunktionelles Enzym, das aus *E.coli* isoliert wird. Durch Glykosylaseaktivität ist es in der Lage, oxidative DNA-Modifikationen zu erkennen und zu entfernen, wobei eine Lücke verbleibt. Mit Hilfe der AP-Lyaseaktivität wird diese Lücke erkannt und das Desoxyribosephosphat entfernt, woraus ein zusätzlicher Strangbruch resultiert und die Anzahl nachweisbarer DNA-Schäden erhöht wird.

Durchführung

- **Vorbereiten der Objektträger (OT)**

40 µl 0,5 % NMA (*normal melting agarose*) werden auf die angeraute Seite eines OT pipettiert und mit einem Spatel gleichmäßig verteilt. Nachdem die NMA-Schicht

getrocknet ist, werden die OT mit einem Diamantschneider beschriftet. Danach wird mit jeweils 65 µl NMA pro OT ein Gelkissen gegossen, indem die NMA sofort mit je einem 24 x 24 cm Deckglas bedeckt wird.

▪ **Aussaat und Inkubation**

HT29 Zellen werden wie in Kap. 5.4.1 ausgesät und für 72 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit anwachsen gelassen. Danach erfolgt die Substanzinkubation für jeweils 1 bzw. 24 h (Kap. 5.4.2 bzw. 5.4.3). Eine Lösungsmittelkontrolle (1 % PBS), UV-Licht (0,05 J/cm²) als Positivkontrolle für eine DNA-schädigende Wirkung sowie als FPG-Positivkontrolle für den Nachweis von oxidativen DNA-Schäden werden bei jedem Versuch mitgeführt.

▪ **Zellernte**

Nach Inkubationsende wird der Zellrasen mit 1 ml vorgewärmten PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl Trypsin für 2 min inkubiert. Danach wird die Reaktion mit 1 ml N-Medium abgestoppt und gut resuspendiert. Die gesamte Zellsuspension wird in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen auf Eis gesammelt.

▪ **Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung**

Mittels Trypanblaufärbung wird die Zellzahl und die Viabilität bestimmt. Dazu werden 90 µl Trypanblau vorgelegt und 10 µl der Zellsuspension zugegeben. Das Auszählen erfolgt mit einer Neubauer-Zählkammer. Die Viabilität errechnet sich aus der Anzahl der lebenden Zellen geteilt durch die Gesamtzahl der Zellen. Die Viabilität sollte dabei den Wert von 80 % nicht unterschreiten. Pro Inkubationsansatz werden 70.000 Zellen in vier Reaktionsgefäße gegeben und bei 4 °C und 2000 rpm zehn Minuten zentrifugiert.

▪ **Einbetten der Zellen in Agarose und Lyse**

Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 65 µl 0,7 % LMA (*low melting agarose*) aufgenommen. Von den vorbereiteten OT werden die Deckgläser entfernt und die Zellsuspensionen auf die Gelkissen pipettiert, die sofort mit einem Deckglas abgedeckt und auf einer eisgekühlten Unterlage aushärten gelassen werden (~ 20 min). Danach werden die Deckgläser entfernt und die OT bei 4 °C über Nacht Rücken an Rücken in einer Färbekammer mit eiskaltem Lysepuffer gelagert.

▪ **Enzyminkubation und Elektrophorese**

Nach der Lyse über Nacht werden die OT dreimal für jeweils 5 min mit etwa 100 ml Enzympuffer in der Färbekammer bei 4 °C gewaschen. Anschließend werden pro Gelkissen entweder 50 µl Enzympuffer mit FPG oder ohne FPG pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt. Die Inkubation erfolgt für 30 min bei 37 °C im Brutschrank. Danach werden die OT mit der Gelschicht nach oben in eine mit eiskaltem Elektrophoresepuffer

befüllte Elektrophoresekammer gelegt und die DNA für 20 min im Dunklen denaturiert. Nach der Denaturierung wird die Elektrophorese für 20 min bei einer konstant angelegten Spannung von 30 V (0,8 V/cm) und einer Stromstärke von 300 mA, die durch Zugabe und Entnahme des Elektrophoresepuffers eingestellt wird, gestartet.

▪ **Neutralisation und Anfärbung**

Nach der Elektrophorese werden die OT wieder Rücken an Rücken in die Lysekammer gestellt und dreimal für 5 min mit Neutralisationspuffer übergossen und bei 4 °C gelagert. Danach werden die OT werden aus der Lysekammer genommen und auf Papier kurz abtropfen gelassen. Pro Gelkissen werden 40 µl Ethidiumbromid-Lösung aufgetragen und die Zellen anschließend mit einem Deckglas bedeckt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Ethidiumbromids findet der Färbeporgang möglichst unter Lichtausschluss statt. Die OT werden dann bis zum Auszählen in einer lichtundurchlässigen Kammer gelagert.

▪ **Auswertung**

Pro Gelkissen werden 50 Zellen gezählt. Hierzu wird ein Fluoreszenzmikroskop mit Quecksilberdampflampe verwendet, dessen Bilder auf einen PC übertragen und die mit der Software „Perceptive Instruments Comet Assay IV“ ausgewertet werden. Anschließend wird die von der Software für jede Zelle berechnete *Tail Intensity* in % gemittelt. Die Stärke der *Tail Intensity* dient als Maß für die DNA-schädigende Wirkung der Testsubstanzen.

Reagenzien und Lösungen

NMA	0.5 % in PBS
LMA	0.7 % in PBS
Elektrophorespuffer Stammlösungen	200 g NaOH mit ddH ₂ O ad 500 ml 14.9 g EDTA mit ddH ₂ O ad 200 ml
Elektrophorespuffer Gebrauchslösung	30 ml NaOH Stammlösung 5 ml EDTA Stammlösung ad 1 l ddH ₂ O Lagerung bei 4 °C
Enzympuffer Stammlösung (10x)	9.5 g HEPES 7.46 g KCl 0.146 g EDTA 0.2 g BSA

	ad 1 l ddH ₂ O, pH 8,0 (KOH)
	Aliquotieren auf 35 ml,
	Lagerung bei -20 °C
Enzympuffer Gebrauchslösung	35 ml Enzympuffer Stammlösung
	315 ml ddH ₂ O
Ethidiumbromid Stammlösung	10 mg Ethidiumbromid in 50 ml ddH ₂ O
Ethidiumbromid Gebrauchslösung	Stammlösung 1:10 (v/v) in ddH ₂ O
FPG-Enzym Stammlösung	200 µl Enzympuffer
	200 µl Glycerin
	ad 2 ml ddH ₂ O
	FPG-Enzym 1:1000 verdünnen
	Aliquotieren auf 30 µl,
	Lagerung bei -80 °C
FPG-Enzym Gebrauchslösung	30 µl FPG-Enzym Stammlösung
	870 µl Enzympuffer
Lysepuffer Stammlösung	146.1 g NaCl
	37.2 g Na ₂ -EDTA
	1.2 g Tris
	ad 1 l ddH ₂ O, pH 10 (NaOH)
	10 g N-Laurylsarcosin-Na-Salz zugeben
Lysepuffer Gebrauchslösung	89 ml Lysepuffer Stammlösung
	10 ml DMSO
	1 ml Triton X-100
Neutralisationspuffer	48.5 g Tris
	ad 1 l ddH ₂ O, pH 7.5 (HCl)
	Lagerung bei 4 °C

5.4.8 Untersuchungen zur Mutagenität mittels HPRT Test

Der HPRT Test basiert auf der Inaktivierung des Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (*hprt*)-Gens, die von mutagenen Agentien durch eine Vorwärtsmutation im X-chromosomal vorliegenden *hprt*-Gen hervorgerufen wird. HPRT ist für die Herstellung von Guanin-Nukleotiden notwendig, die zur DNA-Synthese benötigt werden. Dabei werden freie Guanin- und Hypoxanthinbasen in die entsprechenden Nucleosidmonophosphate umgesetzt, die anschließend in die DNA eingebaut werden können. Das Prinzip des Tests basiert auf der Selektion von mutierten Zellen durch Zugabe eines Selektionsmediums,

welches 6-Thioguanin (6-TG) enthält. 6-TG ist beim Einbau in die DNA zytotoxisch und führt zum Zelltod. Daher ist gewährleistet, dass nur die Zellen in Anwesenheit von 6-TG überleben können, deren HPRT-Funktion aufgrund einer Mutation verloren ging (Abbildung 47) [Stryer, 2003].

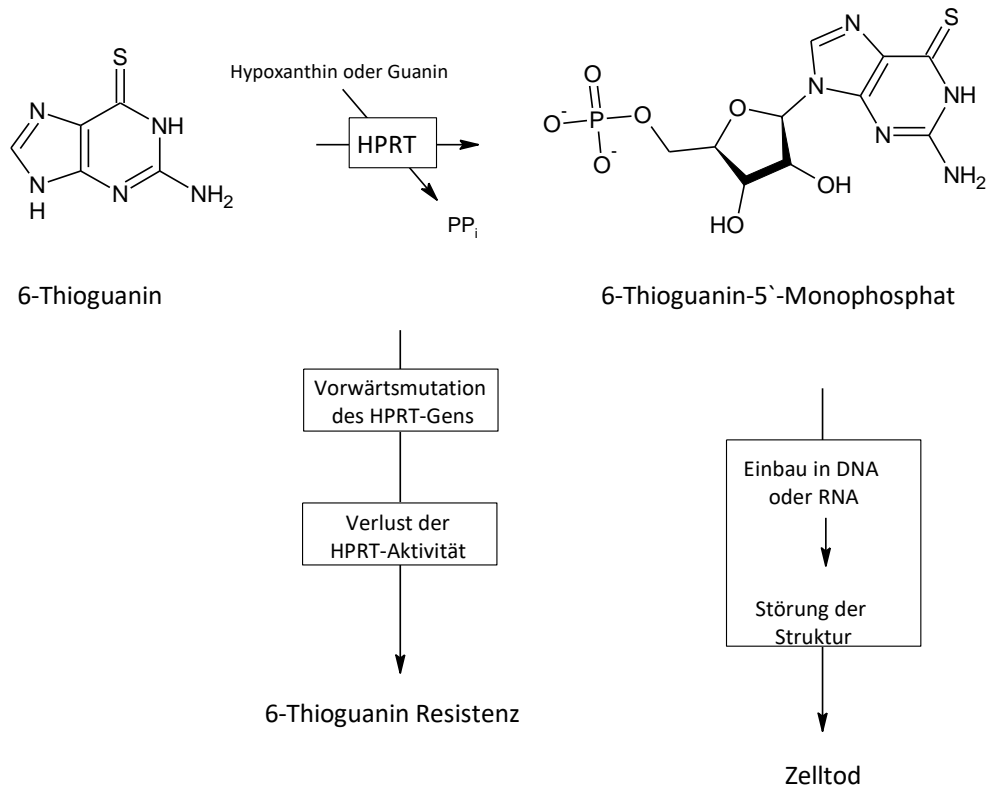


Abbildung 47 Prinzip des HPRT Assays

Durchführung

▪ Tag 0 Aussaat:

V79 Zellen werden pro Testsubstanz und Konzentration gemäß Kap. 5.4.1 ausgesät und für 24 h im Brutschrank kultiviert.

▪ Tag 1: Inkubationsstart

Die Inkubationslösungen werden in 10 ml N-Medium angesetzt (Kap. 5.4.2). Eine Negativkontrolle (N-Medium) sowie eine Positivkontrolle (MNNG) werden bei jedem Versuch mitgeführt.

▪ Tag 2: Inkubationsende

Nach 24 h wird das Inkubationsmedium entfernt und die Zellen in 10 ml N-Medium für weitere 24 h im Brutschrank kultiviert.

▪ **Tag 3 und Tag 5: Passage/Zellzahl**

Die Zellzahl und Viabilität werden pro Ansatz ermittelt und anschließend erneut 1 Mio. Zellen in 10 ml N-Medium pro Flasche ausgesät und für 24 h kultiviert.

▪ **Tag 7: Passage/Selektion/Cloning-Efficiency (CE)**

Die Zellzahl und Viabilität werden pro Ansatz ermittelt und anschließend wie folgt ausgesät: Für jede Konzentration werden 1 Mio. Zellen pro Flasche in 15 ml S-Medium sowie 240 Zellen in jeweils zwei 90 mm Petrischalen mit je 10 ml N-Medium ausgesät.

▪ **Tag 16: Färben der Kolonien**

Das Medium wird entfernt und die Zellen zweimal mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Die Zellen werden mit je 4 ml vorgekühltem (-20 °C) EtOH bzw. mit 3 ml EtOH pro Platte für wenigstens 15 min bei -20 °C fixiert. EtOH wird verworfen, anschließend werden die Zellen mindestens 30 min mit ethanolischer Methylblau-Lösung bei -20 °C gefärbt. Der ungebundene Farbstoff wird entfernt, die Zellen vorsichtig mit Leitungswasser gespült und anschließend trocknen gelassen.

Auswertung

Für die Auswertung des Tests werden für die jeweiligen Konzentrationen alle erkennbaren Kolonien in den Kulturflaschen und Petrischalen gezählt und deren Mittelwert bestimmt. Die Mutationsfrequenz (MF) für eine Testsubstanzkonzentration gibt die Anzahl der HPRT-defizienten Mutanten pro 1 Mio. Zellen an:

$$MF = MZ \cdot F$$

MZ: ermittelte Kolonienzahl (bzw. Mutantenzahl) einer Testsubstanzkonzentration

F: Korrekturfaktor

Den Korrekturfaktor F erhält man aus folgender Gleichung:

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

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 in Bezug auf die zugehörige Konzentration angegeben.

Reagenzien und Lösungen

MNNG:	4,41 mg (20 mM) in 1 ml DMSO Endkonzentration in Medium: 20 µM
6-Thioguanin Stammlösung:	6 mg TG (54 mmol) in 1 ml DMSO Lagerung RT
Selektionsmedium:	500 ml DMEM low glucose 25 ml FKS 5 ml P/S 5 ml Natriumpyruvat-Lsg (100 mmol) 500 µl TG-Stammlsg
0,9 % NaCl-Lösung:	9 g NaCl ad 1 l ddH ₂ O
Methylenblau-Färbelösung:	2 g Methylenblau (0,5 %) in 500 ml EtOH

5.4.9 Western Blot-Analyse

5.4.9.1 Proteingewinnung

HT29 Zellen werden gemäß Kap. 5.4.1 ausgesät und für 3 bzw. 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert (Kap. 5.4.2). Anschließend wird das Medium entfernt und die Platten mit eiskühlem PBS gewaschen. Danach werden 700 µl zuvor gekühltes PBS in jede Kulturschale pipettiert. Die Zellen werden abgeschabt und in einem 2 ml Reaktionsgefäß auf Eis gesammelt. Die erhaltene Zellsuspension wird für 3 min bei 800 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in ml Puffer A aufgenommen und mehrfach resuspendiert. Anschließend wird die Zellsuspension für 15 min auf Eis inkubiert und 17 µl Nonidet-P40 (10 %) pro Probe zugegeben. Das Lysat wird für 15 s gevortext und erneut für 3 min bei 800 g und 4 °C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand (Zytosol) wird in Reaktionsgefäßen auf Eis gelagert. Das Pellet wird in 65 µl Puffer B aufgenommen und ein weiteres Mal für 15 min auf Eis inkubiert, wobei die Proben alle zwei Minuten für 15 s gevortext werden. Abschließend werden die Lysate für 5 min bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand (Zellkern) wird auf Eis gelagert.

Reagenzien und Lösungen

Puffer A:	238 mg HEPES (10 mM)
	75 mg KCl (10 mM)
	2,9 mg EDTA (0,1000 μ M)
	3,8 mg EGTA (0,1000 μ M)
	ad 100 ml dd H ₂ O
	DTT und Protease-Inhibitor immer frisch zugeben
Puffer B:	477 mg HEPES (20 mM)
	2,3 g NaCl (0,4 mM)
	29,2 mg EDTA (1000 μ M)
	38 mg EGTA (1000 μ M)
	ad 100 ml dd H ₂ O
	DTT und Protease-Inhibitor immer frisch zugeben

5.4.9.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zum Nachweis von Proteinen nach Bradford wird Coomassie Brilliantblau G-250 verwendet, welches in saurer Lösung unspezifisch an basische und kationische Aminosäurereste bindet. Durch Komplexbildung mit Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm [Bradford, 1976].

Durchführung

Die Quantifizierung erfolgt über eine externe Kalibriergerade mit Rinder-Serum-Albumin (BSA). In einer 96 well-Platte wird die Standardreihe mit 0,1 mg/ml bis 1,2 mg/ml BSA/well sowie die Proben jeweils als Duplikat pipettiert. Pro well werden 200 μ l zuvor 1:5 mit ddH₂O verdünntem Bio-Rad Protein Dye zupipettiert. Dann wird die Extinktion der wells bei 595 nm photometrisch in einem Plate Reader vermessen. Mit Hilfe der Geradengleichung der Standardreihe lässt sich der Proteingehalt der Proben errechnen.

Die Proteinproben werden auf eine Endkonzentration von 6 mg Protein pro ml mit ddH₂O verdünnt. Dann werden zu 5 μ l Probe (entspricht 30 μ g Protein) 1 μ l 6x-Ladepuffer hinzupipettiert und die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert und kurz abzentrifugiert.

5.4.9.3 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Die Proteinproben wurden anschließend mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. In dem verwendeten Ladepuffer zur Denaturierung sind Reagenzien enthalten, die die Disulfidbindungen spalten (β -Mercaptoethanol) sowie die Eigenladung der Proteine

maskieren (SDS). Somit erhält man ein konstantes Masse-Ladungsverhältnis, was eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht ermöglicht. Beim Western Blot werden die aufgetrennten Proteine elektrophoretisch aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen, wo sie zur qualitativen und quantitativen Untersuchung mit Antikörpern angefärbt werden. Die Banden werden im Anschluss densitometrisch mittels Lumi Imager (BioRad) ausgewertet.

- Gießen des Trenn- und Sammelgels

Die Lösung für das 12 % Trenngel wird zwischen zwei Glasplatten in einem vertikalen Gießstand pipettiert. Das Trenngel wird mit einigen Tropfen n-Butanol überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu erhalten. Dann lässt man das Gel auspolymerisieren und das n-Butanol wird mit einem Streifen Filterpapier entfernt. Auf das Trenngel wird nun die Lösung für das 4 % Sammelgel pipettiert und ein Probenkamm zum Formen der Geltaschen ohne Luftblasen eingefügt (Tabelle 16).

Tabelle 16 Rezept für Sammel- bzw. Trenngel

	12 % Trenngel	4 % Sammelgel
dd H₂O	1,72 ml	1,2 ml
Tris/HCl (1,5 M)	1,23 ml	0,5 ml
AA (30 % in H₂O)	1,97 ml	0,25 ml
SDS (10 %)	49,2 µl	20 µl
APS	24,6 µl	20 µl
TEMED	2,46 µl	2 µl

- Elektrophorese:

Sobald das Sammelgel auspolymerisiert ist, wird das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer gestellt und mit 1x Elektrophorese-Puffer überschichtet. Der Probenkamm wird vorsichtig aus dem Gel gezogen und jeweils 30 µg zuvor denaturierte Proteinprobe sowie 2 µl Molekulargewichtsmarker in die Taschen pipettiert. Es wird eine konstante Spannung von 120 V eingestellt. Wenn die Lauffront das Trenngel erreicht hat, wird die Spannung auf 140 V erhöht.

- Western Blot:

Der Transfer der Proteine erfolgt in einer Nass-Blott-Apparatur, die aus zwei Gel-Membran-Kassetten, sowie einer Kühleinheit besteht. Wie die Gelelektrophorese-Apparatur werden die Elemente in die dafür vorgesehene Wanne gehängt und diese mit Blotting-Puffer (1x) gefüllt. Um die Überhitzung der Kammer zu vermeiden, werden ein Magnetrührstab und

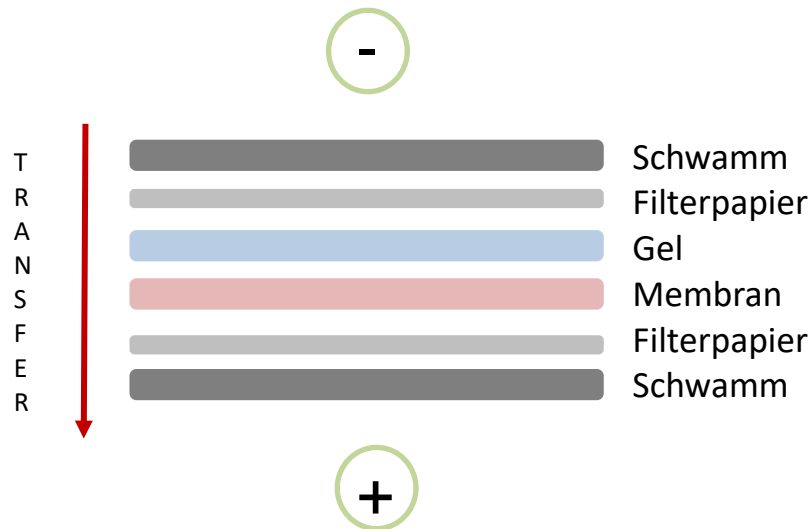


Abbildung 48 Aufbau einer Gel-Membran-Kassette

ein Kühlaggregat in die Kammer eingesetzt. Nach dem Zusammenbau des „*blotting-sandwich*“ (Abbildung 48) werden die Proteine für 1 h bei einer Spannung von 100 V (350 mA) auf die Membran übertragen.

- Blocken

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu besetzen, wird diese nach dem Blotvorgang mit 5 % Milchpulver-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt.

- Immunoblot

Die Membranen werden knapp unterhalb der Molekulargewichtsbande von 50 kD auseinander geschnitten, in jeweils zwei 50 ml Schraubrohren mit 4 ml Primärantikörperlösung [Nrf2 (67 kD), β -Actin (42 kD); 1:1000 in Blocking-Puffer] überführt und auf einem Schüttler über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Danach werden die Membranen dreimal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Der Sekundärantikörper wird 1 h bei Raumtemperatur (goat-anti-mouse-HRP; 1:2500 in Blocking-Puffer) inkubiert und ist gegen die Spezies gerichtet, aus der der Primärantikörper stammt. Anschließend werden die Membranen erneut dreimal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen und können in diesem bis zur Chemolumineszenz-Detektion aufbewahrt werden.

▪ Chemilumineszenz Detektion

An den Sekundärantikörper ist eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welche die Chemilumineszenz-Detektion ermöglicht. Das Enzym katalysiert die Reaktion von Luminol und Wasserstoffperoxid zu angeregtem 3-Aminophthalat, welches unter Licht-Emission (428 nm) wieder in den Grundzustand übergeht (Abbildung 49). Es werden 2 ml Reagenz A mit 2 ml Reagenz B vermischt und die Membran für ca. 1 min im Luminolreagenz im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird die Membran am ChemiDoc (BioRad) detektiert.

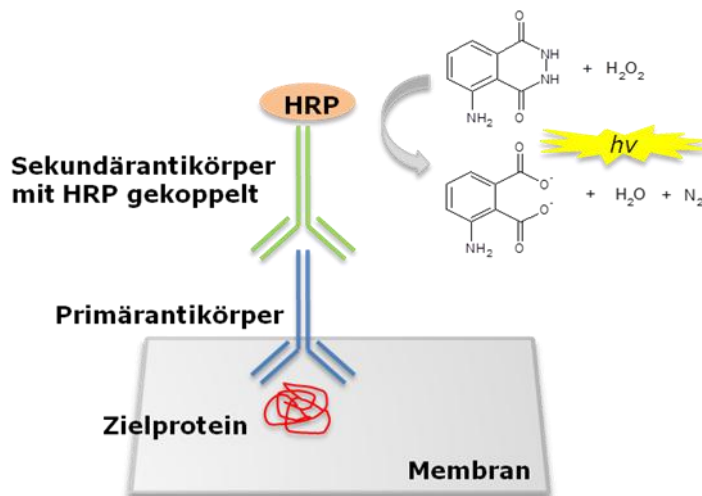


Abbildung 49 Luminol Reaktion

Reagenzien und Lösungen

TBS (20x):	303,9 g NaCl
	96,9 g Tris/HCl
	Ad 2 l dd H_2O , pH 7,6
Waschpuffer:	250 ml TBS (20x)
	15 ml Tween-20
	Ad 5 l dd H_2O
Elektrophoresepuffer (10x):	300 g Glycin
	60,57 g Tris/HCl
	20 g SDS
	Ad 2 l dd H_2O , pH 8,3
Elektrophoresepuffer (1x):	200 ml Elektrophorese (10x)
	800 ml dd H_2O

Blottingpuffer (2x):	11,7 g Glycin
	23,3 g Tris/HCl
	1,48 g SDS
	800 ml Methanol
	Ad 2 l dd H ₂ O
Blocking-Puffer:	10 ml TBS (1x)
	200 µl Tween-20
	10 g Milchpulver
	Ad 200 ml dd H ₂ O
SDS-Probenpuffer (6x):	50 ml 0,5 M Tris
	40 ml Glycerin
	1,24 g SDS
	0,16 g Bromphenolblau
	Ad 100 ml dd H ₂ O, pH 6,8
	Zu jeweils 1 ml aliquotieren
	52,5 µl β-Mercaptoethanol frisch zugeben

5.4.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine einfache und schnelle Methode, um geringste Mengen an DNA zu vervielfältigen. So können z. B. Veränderungen der Gentranskription detektiert werden. Ausgangsmaterial für eine PCR ist die komplementäre DNA (cDNA), die mit Hilfe des Enzyms Reverser Transkriptase aus RNA erhalten wird. Die RNA wurde aus zuvor mit der Testsubstanz behandelten HT29 Zellen isoliert.

5.4.10.1 Zellaussaat und Inkubation

HT29 Zellen werden gemäß

Tabelle 15 ausgesät und für 72 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit anwachsen gelassen. Danach erfolgt die Substanzinkubation für jeweils 3 bzw. 24 h (Kap. 5.4.2; 5.4.3). Eine Lösungsmittelkontrolle (1 % PBS) wird bei jedem Versuch mitgeführt.

5.4.10.2 RNA Isolation

Die RNA wurde mit dem *peqGOLD Total RNA KIT (C-Line)* von *peqlab* isoliert, nach dessen Anleitung auch verfahren wurde:

- Das Inkubationsmedium wird entfernt. Anschließend erfolgt die **Lyse**: 600 µl Lysepuffer zu jedem Well hinzugeben und in das Röhrchen mit aufgesetzter Säule zur DNA-Entfernung füllen, 1 min bei 12.000 g zentrifugieren.
- Den Durchfluss in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen, mit 600 µl Ethanol (70 %) versetzen und gründlich mischen.
- **Laden und Binden**: Neues Röhrchen mit RNA bindender Säule versehen und 600 µl des Lysats damit beladen, 1 min bei 10.000 g zentrifugieren; Durchfluss verwerfen und mit den restlichen 600 µl beladen, 1 min bei 10.000 g zentrifugieren.
- **Waschen I**: Geladene Säule in eine frische Röhre stecken und 500 µl Waschpuffer I zugeben, 15 s bei 10.000 g zentrifugieren, den Durchfluss verwerfen.
- **Waschen II**: 600 µl Waschpuffer II hinzufügen, 15 s bei 10.000 g zentrifugieren, den Durchfluss verwerfen und Waschschrift II wiederholen.
- **Trocknen**: Den Durchfluss verwerfen und 2 min bei 10.000 g trocken zentrifugieren, so dass alle Rest der Waschpuffer vollständig entfernt sind.
- **Elution**: Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß stecken, 50 µl RNase freies Wasser auf die Matrix geben und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren, 1 min bei 5000 g zentrifugieren.
- Lagerung der eluierten RNA auf Eis bis zur Messung und Reinheitsüberprüfung der RNA.

Die Reinheit und der Gehalt der RNA wurden mittels Nanodrop UV-Vis Spektralphotometer bestimmt. Das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten bei 260 nm und 280 nm wird dazu verwendet, um den Reinheitsgrad zu bestimmen. Liegt dieser Quotient zwischen 1,9 und 2,1, so handelt es sich um reine RNA. Zur Messung wurde zuerst ein Leerwert mit 1 µl RNase freiem Wasser und anschließend je 1 µl von jeder Probe gemessen. Die Angabe des Gehaltes erfolgte in ng/µl.

5.4.10.3 cDNA Synthese

Die isolierte RNA wird in diesem Schritt zu cDNA umgeschrieben. Dies geschieht durch die reverse Transkriptase, auch RNA-abhängige DNA Polymerase genannt. Das hierfür verwendete Enzym ist von einem murinen Leukämievirus abgeleitet und wurde für eine verlässliche cDNA Synthese optimiert. Neben dem Zusatz von -RNase Inhibitoren sind im Reaktionsmix Oligo (dT)- und Hexamer-Primer enthalten. Oligo (dT)-Primer bestehen aus 16-20 Thymidinen und binden an den Poly-A-Schwanz der RNA, die *random* Hexamer-Primer können an einer beliebigen Stelle der RNA angreifen. Durch die Zugabe von Primern, reverser Transkriptase und Nukleotiden zur RNA kann nun die Umschreibung zur cDNA bei

entsprechender Temperatur erfolgen. Das Temperaturmaximum liegt beim hier verwendeten Enzym bei 42 °C. Die weiteren Arbeitsschritte der cDNA Synthese werden nach Anleitung des cDNA Synthese Kits von Biorad durchgeführt:

- Entsprechend der gemessenen Gehalte wird die RNA mit RNase freiem Wasser auf einen Gehalt von 1000 ng in einem Endvolumen von 15 µl verdünnt.
- Der Mastermix wird aus 4 µl Reaktionsmix (5x) und 1 µl reverser Transkriptase pro Reaktion angesetzt.
- Zu jedem RNA-Ansatz werden 5 µl Mastermix gegeben und das Gemisch mittels Tischzentrifuge im Reaktionsgefäß vereint.
- Anschließend werden die Proben im Thermocycler mit folgendem Programm umgeschrieben: 5 min bei 25 °C, 30 min bei 42 °C und 5 min bei 85 °C.
- Danach wurde die cDNA bei -80 °C gelagert oder mit der PCR begonnen.

5.4.10.4 QT-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR bietet zusätzlich zur normalen PCR noch die Möglichkeit, die vervielfältigte DNA schon während der Messung zu quantifizieren. Die Quantifizierung der amplifizierten DNA gelingt mittels Fluoreszenzdetektion von SYBR Green. Dies ist ein spezieller Farbstoff, der unspezifisch in die doppelsträngige DNA eingebaut wird. Zwar bindet er auch an Einzelstrang-DNA oder RNA, jedoch ist das dabei emittierte Signal sehr viel schwächer.

Damit die Amplifikation der DNA-Template gelingt, werden verschiedene Primer sowie ein Enzymmix benötigt, der Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) als Bausteine für die neu synthetisierte DNA enthält. Die Taq Polymerase, die aus dem hitzestabilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus* isoliert wird, katalysiert diese Reaktion. Das Aktivitätsmaximum dieses Enzyms liegt bei 74 °C und das pH-Optimum bei über 8, dementsprechend sind die Bedingungen während der QT-PCR angepasst. Neben einem Magnesiumchloridpuffer sind im Enzymmix noch verschiedene Stabilisatoren und Referenzfarbstoffe enthalten. Bei den Primern handelt es sich um Oligonukleotide, die als Startfragmente für die DNA Synthese dienen. Sie binden an den vorhandenen DNA-Einzelstrang und stellen der Taq Polymerase so ein freies 3'-OH-Ende als Startpunkt zur Verfügung. Ohne diesen kann die Reaktion nicht beginnen.

Um die DNA zu vervielfältigen, müssen drei verschiedene Temperaturphasen eingehalten werden:

- **Denaturierung:** 15 s bei 94 °C: Trennung der DNA in Einzelstränge und dadurch Anlagerung der Primer möglich.

- **Annealing:** 30 s bei 55 °C: Primer binden an DNA.
- **Extension:** 30 s bei 72 °C: Verlängerung der DNA durch Taq Polymerase.

Diese drei Phasen werden 39 Mal wiederholt, um eine ausreichende Menge an DNA zu generieren. Im Anschluss wird noch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, wodurch sichergestellt werden kann, dass nur ein spezifisches Produkt entstanden ist. Für einen PCR Ansatz werden laut Hersteller folgende Reagenzien benötigt:

- 12,5 µl SYBR Green Super Mix
- 9,5 µl RNase freies Wasser
- 2,5 µl Primer Mix (enthält Forward und Reverse Primer)
- 0,5 µl cDNA (\cong 500 ng)

5.5 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien & Geräte

Chemikalien:

Acrylamid/Bis –Lösung (30 % in H ₂ O)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	„low melting agarose“ (LMA), Schmelzpunkt 37 °C, BioRad, München, Deutschland „normal meltingagarose“ (NMA), Schmelzpunkt 42 °C, BioRad, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acetonitril (HPLC Grade)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, München, Deutschland
BSA	Sigma Aldrich, München, Deutschland
DMEM	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Germany
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, München, Deutschland
1,4-Dithiothretiol (DTT)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Essigsäure	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Ethanol	Sigma Aldrich, München, Deutschland

Ethanol p.A.	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, München, Deutschland
FKS	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Germany
FKS-freies Medium (S-Medium)	500 mL DMEM, 1 % PenStrep
Glyzin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Glyzerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Roth, Karlsruhe, Deutschland
IGEPAL	CA-630, Sigma Aldrich, München, Deutschland
Immersionsöl	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kupfersulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Luminol-Reagenz	Santa Cruz Biotechnologies, Deutschland
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Menadion	Menadion
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Methanol	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nährmedium (N-Medium)	500 mL DMEM, 10 % FKS, 1 % PenStrep
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Niacin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
NMP	TCI Chemicals, Deutschland
PenStrep	Penicillin/ Streptomycin (1:1) Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Germany
Protease-Inhibitorcocktail	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Mark, Bicolor, Proteinmarker	Roth, Karlsruhe, Deutschland

TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trigonellin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Trypsin	0,05 % EDTA Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Germany
Tween-20	Sigma Aldrich, München, Deutschland

Verbrauchsmaterialien:

Bechergläser	Schott, Mainz, Deutschland
Deckgläser für Hämocytometer	24 x 24 mm, LOT 004711080, Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Duranflasche	Schott, Mainz, Deutschland
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz, Deutschland
Glaspipetten	5 mL Brand, Wertheim, Deutschland 10 mL Brand, Wertheim, Deutschland 20 mL Brand, Wertheim, Deutschland
Kryoröhrchen	2 mL Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Kulturflaschen	25 cm ² Sarstedt, Nürnberg, Deutschland 75 cm ² Nunc, Roskilde, Dänemark 175 cm ² Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Messzylinder	VWR, Darmstadt, Deutschland
Multiwellplatten	TC Platte 24 well Sarstedt, Nürnberg, Deutschland TC Platte 96 well Sarstedt, Nürnberg, Deutschland Mikrotestplatte 96 well Sarstedt, Nürnberg, Deutschland 96 Well µClear black Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Multipettenaufsätze	Eppendorf, Combitips advanced, Hamburg, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger	einseitig mattiert, 26 x 76 x 10 mm Menzel, Kuchen, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Petrischalen	Ø 60 mm Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

	Ø 90 mm Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen	weiß Sarstedt, Nürnberg, Deutschland gelb Sarstedt, Nürnberg, Deutschland blau Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Reaktionsgefäße	1,5 mL Sarstedt, Nürnberg, Deutschland 2 mL Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Röhren	13 mL Sarstedt, Nürnberg, Deutschland 15 mL Sarstedt, Nürnberg, Deutschland 50 mL Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Whatmanpapiere	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellschaber	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<u>Geräte:</u>	
Autoklav	Tuttmauersystem, 5075 EL, Wettenberg, Deutschland
Biofreezer	SanyoVIPseries, EettenLeur, Niederlande
Blotter	BioRad Blotting Modul Tetra Cell
Brenner	Gasprofi 1, WLD-TEC, Typ 0313209 Göttingen, Deutschland
Brutschrank	Binder GmbH, Typ 9040-0013 Tuttlingen, Deutschland
Elektrophoresekammer	BioRad Tetra Cell
Gefrierschrank	Liebherr Premium, Ochsenhausen, Deutschland
HPLC	1260 Infinity HPLC Anlage (Agilent, Waldbronn, Deutschland)
Kühlschrank	Liebherr Premium, Ochsenhausen, Deutschland
Massenspektrometer	QTRAP 6500 MS system (SCIEX, Darmstadt, Deutschland)
Mikroskope	Lichtmikroskop: Zeiss Axiovert 25 Göttingen, Deutschland Fluoreszenzmikroskop: Zeiss Axioskop 50/AC Heidelberg, Deutschland
Mikrowelle	Sharp, Deutschland
Minishaker	Bio Vortex V1, peqlab, Typ V-1+ Deutschland IKA Vortex, Genius 3, Laboratory Equipment, VG3, Deutschland
Multipette	M4, Eppendorf Plus, Hamburg, Deutschland

Material und Methoden

Neubauer-Zählkammer	Neubauer Improved, Superior Marienfeld, Deutschland
pH-Meter	Calimetric, Knick
Pipetten	Eppendorf Research Hamburg, Deutschland (10/20/100/200/1000 µL; 5/10 mL)
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG Eberstadt, Deutschland
Plattenlesegerät Fluoroskan Ascent FL	Labsystems, Dreieich, Deutschland
Pumpe	KNF Neuberger Laboport, Typ N86KT18 Freiburg, Deutschland
Schüttler	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Software	Comet IV Perceptive Instruments, Suffolk, England Geno5, Bio Tek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland Analyst 3.1 Software, Boehringer, Deutschland Analyst 1.6.2 Software, Abiscix
Sterilbank	Biowizard, KojairTyp KR-130BW Vilppula, Finnland
Thermoshaker	TS 100, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trockenschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland Heraeus, Hanau, Deutschland
Waage	Sartorius, CP 64-OCE, Göttingen Deutschland
Wasserbad	Julabo Modell EC, Seelbach, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg, Deutschland 5804R Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Literaturverzeichnis

Aigner A., (2006): *Toxikologie für Naturwissenschaftler: Karzinogene* Teubner Studienbücher Chemie. 365 pp.

Bakuradze T., Lang R., Hofmann T., Stiebitz H., Bytof G., Lantz I., Baum M., Eisenbrand G., Janzowski C. (2010): Antioxidant effectiveness of coffee extracts and selected constituents in cell-free systems and human colon cell lines. *Mol. Nutr. Food Res.*, 54 (12), 1734-1743.

Bakuradze T., Lang R., Hofmann T., Schipp D., Galan J., Eisenbrand G., Richling E.. (2016): Coffee consumption rapidly reduces background DNA strand breaks in healthy humans: Results of a short-term repeated uptake intervention study. *Mol. Nutr. Food Res.*, 60, 682-686.

Bakuradze T., Lang R., Hofmann T., Eisenbrand G Schipp D., Galan J., Richling E.. (2015): Consumption of a dark roast coffee decreases the level of spontaneous DNA strand breaks: a randomized controlled trial. *Eur J Nutr.*, 54, 149-156.

Bagdonaite K., Derler K., Murkovic M. (2008): Determination of Acrylamide during Roasting of Coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (15), 6081-6086.

Baum M., Fauth E., Fritzen S., Herrmann A., Mertes P., Merz K., Rudolphi M., Zankl H., Eisenbrand G. (2005): Acrylamide and glycidamide: genotoxic effects in V79-cells and human blood. *Mutat. Res.*, 580 (1-2), 61-69.

Becalski, A., Lau, B. P., Lewis, D. & Seaman, S. W. (2003) Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. *J Agric Food Chem.*, 51, 802-808.

Bellion P., Olk M., Will F., Dietrich H., Baum M., Eisenbrand G., Janzowski C. (2009): Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29. *Mol. Nutr. Food Res.*, 53 (10), 1226-1236.

Berger F. I., Feld J., Bertow D., Eisenbrand G., Fricker G., Gerhardt N., Merz K. H., Richling E., Baum M. (2005): Biological effects of acrylamide after daily ingestion of various foods in comparison to water: A study in rats. *Mol. Nutr. Food Res.*, 55, 3, 387-399.

BfR (2005): Risikobewertung genotoxischer und kanzerogener Stoffe soll in der EU harmonisiert werden. Stellungnahme Nr. 029/2005 des BfR vom 18. Mai 2005. Bundesinstitut für Risikobewertung. www.bfr.bund.de.

BfR (2011): Acrylamid in Lebensmitteln. Stellungnahme Nr. 043/2011 des BfR vom 29. Juni 2011. Bundesinstitut für Risikobewertung. www.bfr.bund.de.

BfR (2012): Die Einnahme von Nicotinsäure in überhöhter Dosierung kann die Gesundheit schädigen. Stellungnahme Nr. 018/2012 des BfR vom 06. Februar 2012. www.bfr.bund.de.

Boettcher M. I., Angerer J. (2005): 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.*, 824 (1-2), 283-294.

- Boettler U., Sommerfeld K., Volz N., Pahlke G., Teller N., Somoza V., Lang R., Hofmann T., Marko D. (2011):** Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression, *J. Nutr. Biochem.*, 22 (5), 426-440.
- Boettler U., Sommerfeld K., Volz N., Pahlke G., Teller N., Kotyczka C., Somoza V., Stiebitz H., Bytof G., Lantz I., Lang R., Hofmann T., Marko D. (2011):** Coffees rich in chlorogenic acid or N-methylpyridinium induce chemopreventive phase II-enzymes via the Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo, *Mol. Nutr. Food Res.*, 55 (5), 798-802.
- Boutten A., Goven D., Artaud-Macari E., Boczkowski J., Bonay M. (2011):** NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Mol. Med.*, 17 (7), 363-371.
- BVL.de: EU-Richtwerte**, Stand: 26.02.2016
www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/02_UnerwunschteStoffeOrganismen/04_Acrylamid/03_EU_Richtwerte/richtwerte_node.html.
- BVL (2010 a):** Ergebnisse der 8. Signalwert-Berechnung mit statistischen Kennzahlen. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. www.bvl.bund.de.
- BVL (2010 b):** Übersicht über die Signalwerte von der 1. bis 8. Berechnung. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. www.bvl.bund.de.
- BVL (2011):** Berichte zur Lebensmittelsicherheit 2011. Bundesweiter Überwachungsplan. www.bvl.bund.de.
- Casal S., Oliveira M.B., Ferreira A.M. (2000):** HPLC/diode-array applied to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid and caffeine in coffee. *Food Chem.*, 68 (4), 481-485.
- Chen G., Song H., Ma C. (2009):** Aroma-active compounds of Beijing roast duck. *Flavour Fragr. J.*, 24 (4), 186-191.
- Clements C.M., McNally R.S., Conti B.J., Mak T.W., Ting J.P.-Y. (2006):** DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator NRF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103 (41), 15091–15096.
- Cohen E., Ophir I., Shaul Y. B. (1999):** Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *J. Cell. Sci.*, 112, 2657-2666.
- Collins A.R. (2004):** The comet assay for DNA damage and repair. *Molec. Biotech.*, 26, 249-261.
- Collins A. R. (2013):** Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1840 (2), 794-800.
- Decker, T., Lohmann-Matthes, M. (1988):** A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Meth.*, 15 (1), 61-69.
- del Castillo, M. D., Ames, J. M., Gordon, M. H. (2002):** Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *J Agric Food Chem.* 2002, 50, 3698-703.
- Diplomarbeit** Carolin Haushofer (2013): *Technische Universität Kaiserslautern, AG Prof. Melanie Esselen.*
- Diplomarbeit** Kathrin Kunz (2014): *Technische Universität Kaiserslautern, AG Prof. Melanie Esselen.*

- Dissertation** Tamara Bakuradze (2010): Untersuchungen zur antioxidativen Wirksamkeit von Koffeinhaltstoffen/-extrakten und Kaffeegetränken *in vitro* und bei Probanden. *Universität Kaiserslautern, AG Prof. Gerhard Eisenbrand.*
- Dissertation** Ute Boettler (2009): Kaffee und ausgewählte Inhaltsstoffe als Aktivoren des Nrf2/ARE (EpRE)-Signalweg. *Universität Wien, AG Prof. Doris Marko.*
- Dissertation** Julia Feld (2010): Charakterisierung der DNA-schädigenden Wirkung von Acrylamid in Lebensmitteln am Modell der Ratte. *Universität Kaiserslautern, AG Prof. Gerhard Eisenbrand.*
- Dissertation** Nicole Puppel (2007): Untersuchungen zur Genotoxizität von Acrylamid und Glycidamid an Säugerzellen. *Universität Karlsruhe (TH), AG Prof. Doris Marko.*
- Dissertation** Nadine Volz (2010): Beeinflussung ARE-regulierter Phase-II-Enzyme durch Kaffee und ausgewählte Inhaltsstoffe. *Universität Wien, AG Prof. Doris Marko.*
- Dissertation** Nico Watzek (2010): Acrylamid und Acrolein: Toxikokinetik hitzeinduzierter Kontaminanten in Lebensmitteln. *Universität Kaiserslautern, AG Prof. Elke Richling.*
- Dinkova-Kostova** A. T., Massiah A. M., R. E., Hicks R. J., Talalay P. (2001): Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *PNAS, 98, 6, 3404-3409.*
- DSMZ:** Human and animal cell line. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. *www.dmsz.de.*
- EFSA (2005):** Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a Harmonised Approach for Risk Assessment of Substances which are both Genotoxic and Carcinogenic. *EFSA J., 282, 1-31. www.efsa.eu.int.*
- EFSA (2011):** Results on acrylamide levels in food from monitoring years 2007-2009 and exposure assessment. *EFSA J., 9 (4): 2133. www.efsa.europa.eu/efsajournal.*
- EFSA (2012):** Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007-2010. *EFSA J., 10 (10), 2938. www.efsa.europa.eu/efsajournal.*
- EFSA (2015):** Scientific Opinion on acrylamide in food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA J., 13 (6), 4104.*
- Eisenbrand** G., Metzler M., (2005): Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner. Thieme-Verlag; 1. Auflage, 2005.
- EU (2000):** European Union Risk Assessment Report. Acrylamide. CAS No: 79-06- 1. EINECS No: 201-173-7. *European Chemicals Bureau. Volume 24.*
- Esselen** M., Fritz J., Hutter M., Teller N., Baechler S., Boettler U., Marczylo T.H., Gescher A.J., Marko D. (2011): Anthocyanin-rich extracts suppress the DNA-damaging effects of topoisomerase poisons in human colon cancer cells, *Mol. Nutr. Food Res., 55 (1), S143-S153.*
- Europäische Kommission (2011):** Empfehlung der Kommission vom 10.01.2011 zur Untersuchung des Acrylamidgehalts von Lebensmitteln.

- Faist V.**, Lindenmeier M., Geisler C., Erbersdobler H.F., Hofmann T. (2002): Influence of Molecular Weight Fractions Isolated from Roasted Malt on the Enzyme Activities of NADPH-Cytochrome c-Reductase and Glutathione-S-transferase in Caco-2 Cells. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 602-606.
- Fennell T.R.**, Friedman M.A. (2005): Comparison of acrylamide metabolism in humans and rodents. *Adv Exp Med Biol.* 561, 109-116.
- Fennell T.R.**, Sumner S.C., Snyder R.W., Burgess J., Spicer R., Bridson W.E., Friedman M.A. (2005): Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol Sci.*, 85 (1), 447-459.
- FoodDrinkEurope (2011)**: Acrylamide Toolbox 2011. Confederation of the Food and Drink Industries of the EU.
- Frank J.**, Biesalski H.K., Dominici S., Pompella A. (2000): The visualization of oxidant stress in tissues and isolated cells. *Histol. Histopathol.*, 15 (1), 173-184.
- Friedman M.** (2003): Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (16), 4504-4526.
- Friedman M.A.**, Dulak L.H., Stedham M.A. (1995) A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Toxicol. Sci.*, 27 (1), 95-105.
- 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. (2006): 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.*, 15 (2), 266-271.
- Fuhrmann A.**, (2006) *Toxikologie für Naturwissenschaftler* Teubner Studienbücher Chemie.
- Gamboa da Costa G.**, Churchwell M.I., Hamilton L.P., Von Tungeln L.S., Beland F.A., Marques M.M., Doerge D.R. (2003): DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chem. Res. Toxicol.*, 16 (10), 1328-1337.
- Gertz C.S.K.** (2002): Analysis of acrylamide und mechanisms of its formation in deep-fried products. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 104 (11), 762-771.
- Ghanayem B.I.**, McDaniel L.P., Churchwell M.I., Twaddle N.C., Snyder R., Fennell T.R., Doerge, D.R. (2005): Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicol. Sci.*, 88 (2), 311-318.
- Glatt H.**, Gemperlein I., Turchi G., Heinritz H., Doehmer J., Oesch F. (1987): Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolizing activities and their use in toxicological studies. *Mol Toxicol.*, 1 (4), 313-334.
- Goya L.**, Delgado-Andrade C., Rufián-Henares J.A., Bravo L., Morales F.J. (2007): Effect of coffee Melanoidin on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51 (5), 536-545.
- Granvogl M.**, Koehler P, Latzer L and Schieberle P, (2008): Development of a Stable Isotope Dilution Assay for the Quantitation of Glycidamide and Its Application to Foods and Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6087–6092.

- Guengerich** F. P., Wu Z., Bartleson C. J., (2005): Function of human cytochrome P450s: Characterization of the orphans. *Biochem and Biophys Res. Com.*, 338, 465-469.
- Halliwell** B., Gutteridge, J.M.C. (1999): Free Radicals in Biology and Medicine, *Oxford University Press*, New York (NY), 3. Auflage.
- Halliwell** B., Clement M.V., Ramalingam J., Long L.H. (2000): Hydrogen Peroxide. Ubiquitous in Cell Culture and In vivo?. *IUBMB Life*, 50 (4-5), 251-257.
- Halliwell** B., (2007): Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.*, 35 (5), 1147-1150.
- Higgins** L.G., Cavin C., Itoh K., Yamamoto M., Hayes J.D. (2008): Induction of cancer chemopreventive enzymes by coffee is mediated by transcription factor Nrf2. Evidence that the coffee-specific diterpenes cafestol and kahweol confer protection against acrolein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 226 (3), 328-337.
- Hodge** J.E. (1953): Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.*, 1 (15), 928-943.
- Huan** Y., Zhou G., Zhao G., Xu X., Peng Z. (2005): Changes in flavor compounds of dry-cured Chinese Jinhua ham during processing. *Meat Sci.*, 71 (2), 291-299.
- Itoh** K., Chiba T., Takahashi S., Ishii T., Igarashi K., Katoh Y., Oyake T., Hayashi N., Satoh K., Hatayama I., Yamamoto M., Nabeshima Y. (1997): An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236 (2), 313-322.
- Itoh** K., Wakabayashi N., Katoh Y., Ishii T., Igarashi K., Engel J.D., Yamamoto M. (1999): Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.*, 13, 76-86.
- Itoh** K., Wakabayashi N., Katoh Y., Ishii T., O'Connor T., Yamamoto M. (2003): Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells*, 8 (4), 379-391.
- Itoh**, K., Tong K.I., Yamamoto M. (2004): Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic. Biol. Med.*, 36 (10), 1208-1213.
- IARC** (1994): IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Industrial Chemicals, In IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, 568, www.monographs.iarc.fr.
- Jain**, A.K., Bloom, D.A., Jaiswal, A.K. (2005): Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *The J. Biol. Chem.*, 280, 29158-29168.
- Janzowski** C., Glaab V., Samimi E., Schlatter J., Eisenbrand G. (2000): 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food Chem. Toxicol.*, 38 (9), 801-809.
- JECFA** (2010): Summary report of the seventy-second meeting of JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. JECFA/72/SC, 2.

- Kansanen E.**, Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2012): The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer", *Redox Biol.*, 1 (1), 45-49.
- Karp G.** (2005): Molekulare Zellbiologie. Springer Verlag.
- Kelly W.**, Pagano G., Korkina L.G., Brunk U.T., Chessa L., Degan P., Del Principe D., Malorni F.J., Pallardo F., Pasquier C., Scovassi I., Zatterale A., Franceschi C. (1999): Congenital disorders sharing oxidative stress and cancer proneness as phenotypic hallmarks: prospects for joint research in pharmacology. *Med. Hypotheses*, 51 (3), 253-266.
- Kensler T.W.**, Curphey T.J., Maxiutenko Y., Roebuck B.D. (2000): Chemoprotection by organosulfur inducers of phase 2 enzymes: dithiolethiones and dithiols. *Drug Metabol. Drug Interact.*, 17 (1-4), 3-22.
- Kobayashi A.**, Kang M.I., Watai Y., Tong K.I., Shibata T., Uchida K., Yamamoto M. (2006): Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1. *Mol. Cell. Biol.*, 26 (1), 221-229.
- Kusano Y.**, Horie S, Shibata T, Satsu H, Shimizu M, Hitomi E, Nishida M, Kurose H, Itoh K, Kobayashi A, Yamamoto M, Uchida K. (2008) Keap1 regulates the constitutive expression of GSTA1 during differentiation of Caco-2 cells. *Biochemistry*. 47, 6169-6177.
- Lang R.**, Yagar E.F., Wahl A., Beusch A., Dunkel A., Dieminger N., Eggers R., Bytof G., Stiebitz H., Lantz I., Hofmann T. (2013): Quantitative Studies on Roast Kinetics for Bioactives in Coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 61, 12123-12128.
- Lantz I.**, Ternit R., Wilkens J., Hoenicke K., Guenther H., Van der Stegen G.H.D. (2006): Studies on acrylamide levels in roasting, storage and brewing of coffee. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2006, 50 (11), 1039-1046.
- Lee J.M.**, Calkins M.J., Chan K., Kan Y.W., Johnson J.A. (2003): Identification of the NF-E2-related Factor-2-dependent Genes Conferring Protection against Oxidative Stress in Primary Cortical Astrocytes Using Oligonucleotide Microarray Analysis. *J. Biol. Chem.*, 278, 12029-12038.
- Lee O.-H.**, Jain A.K., Papusha V., Jaiswal A.K. (2007): An auto-regulatory loop between stress sensors INRF2 and NRF2 controls their cellular abundance. *J. Biol. Chem.*, 282, 36412-36420.
- Li W.**, Liu H., Li X., Wu J., Xu G., Teng Y., Ding S., Yu C. (2009): The Effect of Tetramethylpyrazine on Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 106, 45-52.
- Lindl T.** (2002): Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. *Spektrum Akademischer Verlag*. 5. Auflage.
- LoPachin R. M.**, Gavin T., (2014): Molecular Mechanisms of Aldehyde Toxicity: A Chemical Perspective. *Chem. Res. Toxicol.*, 27, 1081-1091.
- Lushchak V.** (2012): Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *J. Amino. Acids.*, 2012, Article ID 736837.
- Ma, Q., He, X.** (2012): „Molecular Basis of Electrophilic and Oxidative Defense: Promises and Perils of Nrf2", *Pharmacological Reviews*, 64, 1055-1081.

- Madle S.**, Broschinski L., Mosback-Schulz O., Schöning G., Schulte A. (2003): Zur aktuellen Risikobewertung von Acrylamid in Lebensmitteln. Bundesinstitut für Risikobewertung 2003, 405-415.
- Manière I.**, Godard T., Doerge D.R., Churchwell M.I., Guffroy M., Laurentie M., Poul J (2005): DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide. *Mutation Research* 580, 119-129.
- Marko, D.**; Habermeyer, M.; Kemény, M.; Weyand, U.; Niederberger, E.; Frank, O.; Hofmann, T. (2003): Maillard reaction products modulating the growth of human tumor cells in vitro. *Chem Res Toxicol.* 2003, 16, 48-55.
- Marko, D.**; Kemény, M.; Bernady, E.; Habermeyer, M.; Weyand, U.; Meiers, S.; Frank, O.; Hofmann, T. (2002): Studies on the inhibition of tumor cell growth and microtubule assembly by 3-hydroxy-4-[(E)-(2-furyl)methylidene]methyl-3-cyclopentene-1,2-dione, an intensively coloured Maillard reaction product. *Food Chem Toxicol.* 2002, 40, 9-18.
- Masterarbeit** Sara Lehr (2014) *Technische Universität Kaiserslautern, AG Prof. Melanie Esselen.*
- Miller M. J.**, Carter D. E., Sipes I. G. (1982): Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-344 rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 63, 36-44.
- Moldoveanu S.C.** and Gerardi A.R. (2011): Acrylamide analysis in tobacco, alternative tobacco products, and cigarette smoke. *Journal of Chromatographic Science*, 49, 234–242.
- Mottram D.S.**, Wedzicha B.L., Dodson A.T. (2002): Food chemistry: Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419, 448–449.
- Mottram D.S.** (2007): The Maillard Reaction: Source of Flavour in Thermally Processed Foods. *Flavours and Fragrances.* Springer Verlag 269-283 pp.
- Nguyen, T.**, Huang, H. C., Pickett, C. B. (2000): "Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 12475-12480.
- Niture, S.K.** et al. (2010): NRF2 signaling and cell survival. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244, 37-42.
- NTP (2012)**: NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Acrylamide (CAS No. 79-06-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed and drinking water studies). NTP TR 575. NIH Publication No. 12-5917. National Institutes of Health. Public Health Service. U.S. Department of Health and Human Services. July 2012.
- NVS II (2008)**: Nationale Verzehrsstudie II. Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel. Ergebnisbericht Teil 2, 117-118.
- O'Brien J.**, Wilson I., Orton T., Pognan F. (2000): Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European journal of biochemistry.* 267, 5421-5426.
- O'Brien J. P.**, Siraki A. G., Shangari N., (2008): Aldehyde Sources, Metabolism, Molecular Toxicity Mechanisms, and Possible Effects on Human Health. *Critical Reviews in Toxicology*, 35:7, 609-662.
- OECD (1997)**, Test No. 476: In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, Section 4, OECD Publishing, Paris.

- Perry R. R., Greaves B. R., Rasberry U., Barranco S. C. (1992):**Effect of treatment duration and glutathione depletion on mitomycin C cytotoxicity in vitro. *Cancer Res.*, 52(17), 4608-12.
- Pickard S., Becker I., Merz K.H., Richling E. (2013):** Determination of the alkylpyrazine composition of coffee using stable isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry (SIDA-GC-MS). *J Agric Food Chem.*, 3;61(26):6274-81.
- Pino-García R., González-SanJosé M.L., Rivero-Pérez M.D., Muñiz P. (2012):** Influence of the Degree of Roasting on the Antioxidant Capacity and Genoprotective Effect of Instant Coffee: Contribution of the Melanoidin Fraction. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 10530-10539.
- Puppel N., Tjaden Z., Fueller F., Marko D. (2005):** DNA strand breaking capacity of acrylamide and glycidamide in mammalian cells. *Mutat Res.* 580 (1-2), 71-80.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999):** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26, 1231-1237.
- Römpf Online.** Thieme Chemistry. <http://www.roempp.com/prod/>
- Satoh T, Okamoto SI, Watanabe Y, Furuta K, Suzuki M, Tohyama K, Lipton SA. (2005)** Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic phase II inducers. *PNAS.* 103(3), 768-773.
- SCF (2002)** Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Intake Levels of Nicotinic Acid and Nicotinamide (Niacin).
- Shringarpure, R., Grune, T., and Davies, K.J. (2001).** Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. *Cell Mol. Life Sci.* 58(10):1442-1450.
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J. T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. R. (1990):** New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 82(13), 1107-12.
- Somoza V., Lindenmeier, M., Wenzel, E., Frank, O., Ebersdobler, H. F., Hofmann, T (2003):** "Activity-Guided Identification of a Chemopreventive Compound in Coffee Beverage Using in Vitro and in Vivo Techniques", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6861-6869.
- Somoza V., (2005):** Five years of research on health risks and benefits of Maillard reaction products: An update. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 663- 672.
- Smith C.J., Perfetti T.R., Rumble M.A., Rodgman A., Doolittle D.J. (2000):** "IARC Group 2A carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 371-383.
- Stadler R. H., Varga N., Hau J., Vera F. A., Welti D. H. (2002):** Alkylpyridiniums. 1. Formation in Model Systems via Thermal Degradation of Trigonelline; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1192-1199.
- Stadler R. H., Varga N., Milo C., Schilter B., Vera F. A. et al. (2002):** Alkylpyridiniums. 2. Isolation and Quantification in Roasted and Ground Coffees; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1200-1206

- Stennert A., Maier H.G. (1994):** Trigonelline in Coffee. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 199, 198–200.
- Stryer L. (2003):** *Biochemie*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 779-802.
- Sykiotis, G.P., Bohmann, D. (2010):** Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci. Signal.* 3, 1-45.
- Taeymans D', Andersson A., Ashby P., Blank I., Gondé P., van Eijck P., Faivre V., Lalljie S. P., Lingnert H., Lindblom M., Matissek R., Müller D., Stadler R. H., Studer A., Silvani D., Tallmadge D., Thompson G., Whitmore T., Wood J., Zyzak D. (2005):** Acrylamide: update on selected research activities conducted by the European food and drink industry. *J AOAC Int.*, 88(1):234-41.
- Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S., Tornqvist, M. (2002):** Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem.* 50, 4998-5006.
- Temple M. D., Perrone, G. G., Dawes, I. W. (2005):** Complex cellular responses to reactive oxygen species, *Cell Biology*, 15, 319-326.
- Teply L.J., Prier R.F. (1957):** Nutrients in Coffee, Nutritional Evaluation of Coffee Including Niacin Bioassay. *J. Agric. Food Chem*, 5, 375-377.
- Thielen S., Baum M., Hoffmann M., Loeppky R. N., Eisenbrand G. (2006):** Genotoxicity of glycidamide in comparison to (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and a-acetoxy-N-nitroso-diethanolamine in human blood and V79-cells. *Molecular Nutrition Food Research* 50 (4-5), 430-436.
- Toldrá F., Flores M., Sanz Y., (1997):** Dry-cured ham flavour: enzymatic generation and process influence. *Food Chemistry*. 59, No. 4., 523-530.
- Toyokuni S., Akatsuka, S. (2007):** Pathological investigation of oxidative stress in the post-genomic aera, *Pathology International*, 57, 461-473.
- Tuohy K.M., Hinton D.J.S., Davies S.J., Crabbe M.J.C., Gibson G.R., Ames J.M., (2006):** Metabolism of Maillard reaction products by the human gut microbiota – implications for health. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, 847- 857.
- Turesky R.J. (2007):** Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicology Letters* 168, 219-227.
- Tyl R. W. & Friedman M. A. (2003):** Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reprod. Toxicol.* 17, 1-13.
- Vohr H.-W. (2010) Toxikologie: Band 1: Grundlagen der Toxikologie.** WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim: 455 pp.
- Volz N., Boettler U., Winkler S., Teller S., Schwarz C., Bakuradze T., Eisenbrand G., Haupt L., Griffiths L.R., Stiebitz H., Bytof G., Lantz I., Lang R., Hofmann T., Somoza V., Marko D. (2012):** Effect of Coffee Combining Green Coffee Bean Constituents with Typical Roasting Products on the Nrf2/ARE Pathway in Vitro and in Vivo. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 9631–9641.
- Wang H., Joseph J. A. (1999):** Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free radical biology and medicine*, 27, 612-616.

- Wang, H., Qian, H. Yao W. (2011):** Melanoidins produced by Maillard reaction: Structure and biological activity, *Food Chemistry*, 128, 573-584.
- WHO (1999):** Acrylamide. International Programme on Chemical Safety. Poisons Information Monograph (PIM) 652. Acrylamide.
- WHO (2002):** Health Implications of Acrylamide in Food, In Joint FAO/WHO consultation, Geneva, Switzerland.
- Wild A., Moinova, H. R., Mulcahy, R. T. (1999):** Regulation of γ -Glutamylcysteine Synthetase Subunit Gene Expression by the Transcription Factor Nrf2, *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 33627-33636.
- Yousef M.I. & El-Demerdash F. M. (2006):** Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats, *Toxicology*. 219 (1-3), 133-41.
- Yu L., Matias J., Scudiero D.A., Hite K.M., Monks A., Sausville E.A., Waxman D.K. (2000):** P450 Enzyme Expression Patterns in the NCI Human Tumor Cell Line Panel.,29, 3, 304-312.
- Zeng X. H., Cheng K. W., Jiang Y., Lin Z. X., Shi J. J., Ou S. Y., Chen F., Wang M. (2009):** Inhibition of acrylamide formation by vitamins in model reactions and fried potato strips. *Food Chem.* 116, 34–39.
- Zeng X. H., Kong R. P. W., Cheng K. W., Du Y., Tang Y. S., Chu I. K., Lo C., Sze K. H., Chen F., Wang M. (2010):** Direct Trapping of Acrylamide as a Key Mechanism for Niacin's Inhibitory Activity in Carcinogenic Acrylamide Formation. *Chem. Res. Toxicol.* 23, 802-807.
- Zhang Z., Wei T., Hou J., Li G., Yu S., Xin W. (2003):** Iron-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: attenuation by tetramethylpyrazine and ferulic acid. *European Journal of Pharmacology*, 467, 41-47.
- Zhou G.H., Zhao G.M. (2007):** Biochemical changes during processing of traditional Jinhua ham. *Meat Science* 77, 114–120.
- 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. (2003):** Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J Agric Food Chem.* 51, 4782-4787.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Dissertation eigenständig verfasst, die für die Arbeit benutzten Hilfsmittel und Quellen genannt und die Ergebnisse beteiligter Mitarbeiter sowie anderer Autoren klar gekennzeichnet habe. Ich habe weder die Dissertation oder Teile der Dissertation als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht noch ein Promotionsverfahren bei einer anderen Hochschule beantragt.

Kaiserslautern, 08.07.2016

Carmen Melina Haben

Curriculum Vitae

Universitäre Ausbildung

- August 2012 - Juli 2015 Promotion an der Technischen Universität Kaiserslautern,
 Fachbereich Lebensmittelchemie & Toxikologie
 Thema: „Effekte von Inhaltsstoffen traditioneller chinesischer
 Lebensmittel, Koffeinhaltstoffen und -kontaminanten auf die
 DNA-Integrität und auf die Nrf2/ARE(EpRE)-vermittelte oxidative
 Stressantwort“
- Januar 2015 - Juni 2015 Aufenthalt an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster,
 Institut für Lebensmittelchemie
- März 2011 Diplom in Chemie
 Thema: „Synthese eines Fluoreszenzlabels zur intrazellulären
 Lokalisierung von Mycrocystin-LR“
- 2005 - 2011 Studium der Diplom-Chemie mit Schwerpunkt "Life Sciences in
 Chemistry" an der Technischen Universität Kaiserslautern

Schulische Ausbildung

- Juni 2005 Allgemeine Hochschulreife
- 1996 - 2005 Illtal-Gymnasium Illingen
- 1992 - 1996 Grundschule Uchtelfangen

Berufserfahrung

- November 2011 - Juli 2012 Universitätsklinikum Saarland
 Wissenschaftliche Mitarbeiterin

Praktikum

Juni 2009 - August 2009
 Forschungspraktikum TU Kaiserslautern
 Thema: „Spaltung der Caspase-3 während der UV C-Licht-,
 Ochratoxin A- und Cycloheximid- induzierten Apoptose. Welchen
 Einfluss hierauf besitzt 2,3,7,8,-Tetrachlordibenzo-p-dioxin?“

Weiterbildung

Februar 2013 - heute
„Weiterbildungsprogramm Fachtoxikologe/-in DGPT:“

November 2015
 Grundlagen der Epidemiologie
 IPA, Ruhr-Universität Bochum

Februar 2015
 Fremdstoffallergie/Immuntoxikologie
 Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie
 Charité Universitätsmedizin Berlin

Februar 2015
 Reproduktionstoxikologie
 Charité Universitätsmedizin Berlin

Juni 2014
 Versuchstierkunde II (praktischer Teil)
 Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Institut für
 Versuchstierkunde, Jena

Juni 2014
 Grundlagen der Organtoxikologie und –pathologie II
 Klinikum der FSU Jena, Bereich Erfurt
 Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Erfurt

Oktober 2013
 Lebensmitteltoxikologie
 TU Kaiserslautern

Oktober 2013
 Versuchstierkunde I und Biostatistik
 Klinikum der FSU Jena, Bereich Erfurt
 Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Erfurt

Juni 2013
 Grundlagen der Organtoxikologie und –pathologie I
 Klinikum der FSU Jena, Bereich Erfurt
 Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Erfurt

März 2013 Klinische Toxikologie
 Universität des Saarlandes, Homburg

Februar 2013 Molekulare Zelltoxikologie
 Helmholtz Zentrum München

Publikationen

Chopra M., Gährs M., Haben M., Michels C., Schrenk D. (2010)
„Inhibition of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
depends on protein biosynthesis.

**Posterbeiträge/
Vorträge**

September 2015 45. Lebensmittelchemikertag in Karlsruhe (Posterbeitrag)

März 2013 DGPT Jahrestagung in Kiel (Posterbeitrag)

September 2014 50th Congress of the European Societies of Toxicology in
Edinburgh, Schottland (Posterbeitrag)

März 2014 LChG Regionalverband Südwest: Jahrestagung in
Neustadt/Weinstraße (Posterbeitrag)

März 2012 LChG Regionalverband Südwest: Jahrestagung in Karlsruhe (Vortrag)

September 2012 42. Lebensmittelchemikertag in Braunschweig (Vortrag)

Kaiserslautern, 08.07.2016

Melina Haben