

Bestimmung von Acrylamid bzw. Glycidamid-DNA-Addukten in Humanblut und tierischen Geweben

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

DE-386



Vorgelegt von

Melanie Nicole Hemgesberg (geb. Heyer)

geboren in Heilbronn

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk

Kaiserslautern, 06.10.2020

Für meine Familie

**Der Preis des Erfolgs ist Hingabe,
harte Arbeit und unablässiger Einsatz für das,
was man erreichen will.**

Frank Lloyd Wright

Der experimentelle Teil dieser Arbeit entstand im Zeitraum von April 2015 bis Juni 2018 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 06.10.2020

Prüfungskommission:

- | | |
|----------------------|----------------------------------|
| Vorsitzender: | Prof. Dr. Werner Thiel |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk |
| 2. Berichterstatter: | Juniorprof. Dr. Alexander Cartus |

Rechtsverbindliche Erklärung

Ich, Melanie Nicole Hemgesberg, versichere hiermit, meine Dissertation mit dem Thema:

„Bestimmung von Acrylamid bzw. Glycidamid-DNA-Addukten
in humanen und tierischen Geweben“

selbstständig und ohne Zuhilfenahme anderer als der von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Bestandteile dieser Dissertation wurden bereits, während der Entstehung dieser Arbeit auf Tagungen vorgestellt, oder in Publikationen veröffentlicht (siehe Lebenslauf). Die Arbeit wurde weder im Ganzen noch in Teilen als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht noch ein anderes Promotionsverfahren bei einer anderen Hochschule beantragt oder eröffnet. Die geltende Promotionsordnung des Fachbereiches Chemie der TU Kaiserslautern (vom Stand 07.10.1999) ist mir bekannt. Die elektronische Fassung dieser Arbeit ist mit der gedruckten Ausgabe identisch. Mir ist bekannt, dass ich meine Dissertation zusammen mit dieser Erklärung in dreifacher Ausfertigung und gebunden meinen betreuenden Hochschullehrern an der TU Kaiserslautern abzugeben habe. Mindestens ein Exemplar wird dem Fonds der Chemischen Industrie zur Durchsicht und weiteren Verwendung zur Verfügung gestellt.

Melanie Nicole Hemgesberg

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die durch Ihre fachliche und/oder persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Dr. Schrenk für die Überlassung des interessanten Themas danken. Es war zwar nicht immer einfach und manchmal schwierig, am Ende haben sich jedoch die ganzen Mühen gelohnt.

Auch möchte ich Herrn Juniorprof. Dr. Cartus für die Erstellung eines Zweitgutachtens, sowie dessen Hilfe bei der Beantragung des Chemiefonds-Stipendium und der stellvertretenden Leitung der Humanstudie danken.

Danke auch an Herrn Prof. Dr. Thiel für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und der Hilfe beim „Glycidamid-Paper“.

Ein weiterer Dank gilt dem Fonds der chemischen Industrie, der die Arbeit im Rahmen des Chemiefonds-Stipendium sowie weiterer Projekte finanziell sehr stark gefördert hat. Insbesondere gilt hierbei mein Dank Frau Dr. Kiefer für die nette Betreuung.

Auch möchte ich Frau Simone Stegmüller herzlich für die ganze Arbeit und Mühe in Hinblick auf die Unterstützung bei MS-Messungen und für die große Hilfe bei der Organisation/Durchführung und Ausarbeitung der Humanstudie danken. Danke für deine Unterstützung, Gespräche, Diskussionen. Danke für deine Hilfe bei den Mäusen. Vielen Dank auch für die Unterstützung bei der Humanstudie! Einfach Danke für alles!

Danken möchte ich außerdem Frau Melanie Abel-Beckmann und Frau Janina Klingkowski für die Durchführung der Perfusionen, der Hilfe bei anderen Dingen im Labor und die netten Gespräche zwischendurch.

Des Weiteren möchte ich bei Frau Christiane Müller und Herrn Dr. Harald Kelm für die Aufnahme von NMR-Daten bedanken.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Herrn Dr. Yu Sun für die Messung der Kristallstruktur und dessen Hilfe bei der Erstellung des „Glycidamid-Papers“. Ebenso danke an Herr Thorsten Bonk und Herrn Dr. Karl-Heinz Merz für die Mitwirkung an diesem Paper. Insbesondere gilt mein Dank auch Herrn Dr. Karl-Heinz Merz, der mich bei den ganzen Arbeiten im Syntheselabor unterstützt hat. Danke für das Erlernen von Arbeiten unter Schutzgas, dem Öffnen diverser Glasgeräte und den ganzen Diskussionen zwischen durch.

Ferner möchte ich auch Frau Ruth Bergsträßer und Frau Birgit Dusch für die Aufnahme von Elementaranalysen und GC/HRMS-Analysen danken.

Danken möchte ich auch den anderen Mitarbeitern des AK Schrenk und AK Richling, die mir im Laufe der Zeit geholfen haben.

Danke auch an Herrn Dr. Nico Watzek, Frau Dr. Isabel Groh und Frau Dr. Sabrina Hauptenthal, vielen Dank für eure große Hilfe! Ihr wisst schon für was.

Danke auch an die Ethikkommission für das positive Votum der Humanstudie. Danke an alle die an dieser Studie mitgewirkt haben. Insbesondere zu nennen sind hierbei: Herr Dr. Fischer, Herr Dr. Püttmann, Frau Simone Stegmüller, Herr Juniorprof. Dr. Cartus sowie Herr Prof. Dr. Dr. Schrenk. Danke auch an alle Freiwilligen, die sich Blut im Sinne der der Wissenschaft abnehmen ließen. Ohne euch wäre die Studie nicht möglich gewesen!

Mein besonderer Dank gilt jedoch meiner Familie. Danke meinen Eltern, ohne die es mich gar nicht gäbe. Danke, dass ihr mich immer unterstützt habt und immer für mich da wart. Danke auch an meine Schwester Simone und meine Oma. Auch wenn ich immer viel zu tun gehabt habe, habe ich mich

doch gefreut euch zu sehen und bin sehr froh euch zu haben! Und natürlich auch Danke an dich Ronny. Danke auch für die Hilfe bei der Statistik, ohne euch Simone und Ronny, hätte ich es wohl immer noch nicht verstanden.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meinem Ehemann Maximilian. Danke, dass du mich in allem unterstützt! Es war nicht immer leicht, insbesondere am Ende der Arbeit...Zusammen schaffen wir jedoch alles! Am Ende wird alles gut und die ganze Mühe hat sich gelohnt. Danke, dass es dich und uns gibt!

-----DANKE 😊-----

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	v
Abstract	vii
I Abkürzungsverzeichnis	ix
II. Abbildungsverzeichnis.....	xix
III. Tabellenverzeichnis	xxii
IV. Schemaverzeichnis.....	xxvi
V. Gleichungsverzeichnis	xxvi
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Theorie	6
2.1 DNA- Träger der Erbinformation	6
2.1.1 Nukleinsäuren	6
2.1.2 Substanzinduzierte DNA-Veränderung und DNA-Reparatur	7
2.2 Biotransformation von Fremdstoffen	14
2.3 Kanzerogenese	18
2.4 Acrylamid	24
2.4.1 Allgemeines.....	24
2.4.2 Exposition des Menschen.....	24
2.4.3 Bildung und Gehalte im Lebensmittel	26
2.4.4 Endogene Bildung.....	31
2.4.5 Toxikokinetik	32
2.6.6 Toxikodynamik.....	42
2.5 Risikobewertung und Humanes Biomonitoring.....	52
2.5.1 Allgemeines.....	52

2.5.2 Risikobewertung.....	52
2.5.3 Humanes Biomonitoring.....	55
2.6 Verwendete Biomaterialien und Tiermodelle	57
2.6.1 Blut und seine Bestandteile.....	57
2.6.2 Tiermodelle.....	59
2.7 Analytik.....	61
2.7.1 Allgemeines.....	61
2.7.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	61
2.7.3 Massenspektrometrie und Kopplung mit HPLC	63
3. Ergebnisse und Diskussion	65
3.1 Synthese	65
3.1.1 Glycidamid.....	65
3.1.2 N7-GA-Gua und [¹⁵ N ₅]N7-GA-Gua	74
3.2 Bestimmung der Zytotoxizität von Acrylamid und Glycidamid mittels Resazurin-Reduktionstest	80
3.3 Entwicklung einer UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode zur Detektion von N7-GA-Gua.....	85
3.3.1 Chromatographie - Wahl der richtigen Trennsäule	85
3.3.2 Methodvalidierung.....	90
3.3.3 Optimierung der Probenaufarbeitung	95
3.4 DNA-Adduktgehalte in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit Acrylamid.....	101
3.5 Hintergrundbelastung an DNA-Addukten in Ratte und Maus	110
3.5.1 DNA-Adduktbildung in Abhängigkeit der Spezies und des untersuchten Organs	112
3.5.2 DNA-Adduktbildung der Maus in Abhängigkeit des Geschlechts und des untersuchten Gewebes.....	116
3.5.3 DNA-Adduktbildung in Abhängigkeit der Stoffwechsellage und des untersuchten Gewebes	120
3.6 Hintergrundbelastung DNA-Addukt im Blut des Menschen.....	126

3.7 Zusammenführende Diskussion aller Ergebnisse.....	139
4. Zusammenfassung und Ausblick.....	146
5. Material und Methoden	153
5.1 Synthese von Glycidamid und N7-Glycidamid-Guanin	153
5.1.1 Darstellung des Glycidamids	153
5.1.2 Darstellung des N7-GA-Gua und [¹⁵ N ₅]N7-GA-Gua	156
5.2 Isolation ausgewählter Zellen und einzelner Organe.....	160
5.2.1 Isolation von Lymphozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation.....	160
5.2.2 Isolation von primären Rattenhepatozyten	163
5.2.3 Kultivierung primären Rattenhepatozyten	166
5.2.4 Inkubation primärer Rattenhepatozyten mit AA	169
5.2.5 Isolation von Organen aus Maus und Ratte.....	170
5.3 DNA-Isolierung.....	172
5.3.1 Allgemeines Prinzip.....	172
5.3.2 DNA-Extraktion aus Lymphozyten.....	172
5.3.3 DNA-Extraktion aus primären Rattenhepatozyten	173
5.3.4 DNA-Extraktion aus den entnommenen Organen von Ratte und Maus.....	174
5.4 Neutrale thermische Hydrolyse und Aufreinigung der Hydrolysate zur Gewinnung des gesuchten DNA-Adduktes	176
5.4.1 Allgemeines Prinzip.....	176
5.4.2 Durchführung.....	176
5.5 Resazurin-Reduktionstest	178
5.5.1 Allgemeines Prinzip.....	178
5.5.2 Durchführung.....	178
5.6 UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode.....	182
5.6.1 Allgemeines.....	182

5.6.2 Kalibrierung	182
5.6.3 Tuning.....	182
5.6.4 Chromatographie.....	184
5.6.5 Quantifizierung	185
5.6.6 Nachweis und Bestimmungsgrenzen.....	185
5.6.7 Linearität.....	186
5.6.8 Lauf zu Lauf und Tag zu Tag Variabilität	188
5.6.9 Wiederfindung.....	188
5.7 Informationen zur Humanstudie.....	190
5.7.1 Rechtliche Genehmigung.....	190
5.7.2 Probanden/innen.....	190
5.7.3 Studienablauf	192
5.8 Verwendete Materialien: Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	194
5.8.1 Geräte.....	194
5.8.2 Reagenzien.....	196
5.8.3 Verbrauchsmaterialien.....	199
6. Quellenverzeichnis.....	200
7. Anhang	220
7.1 Rohdaten Kristallstrukturanalyse Glycidamid.....	220
7.2 Rohdaten Resazurin-Reduktionstest.....	226
7.3 Rohdaten zur Methodenentwicklung (U)HPLC-Methode	228
7.4 Rohdaten Inkubation pRH	241
7.5 Rohdaten Maus/Ratte.....	243
7.6 Rohdaten Humanstudie	245
8. Curriculum Vitae.....	267

Kurzzusammenfassung

Acrylamid ist eine Lebensmittelkontaminante, welche durch die sogenannte Maillard-Reaktion im Lebensmittel gebildet wird. Acrylamid entsteht insbesondere bei der Zubereitung kohlenhydratreicher hocherhitzer Lebensmittel, wie z.B. Pommes frites, Chips, Cerealien und ähnlichen Produkten. Die mittlere tägliche Exposition, durch den Verzehr von Lebensmittel liegt bei ca. 0,4–1,9 µg/kg Körpergewicht und Tag. Darüber hinaus entsteht Acrylamid in Folge von Pyrolyseprozessen, weshalb Tabakrauchen einen weiteren Expositionsweg darstellt. Die Menge des dabei entstehenden Acrylamids im Hauptstrom von Zigarettenrauch liegt bei 1,1–2,3 µg/Zigarette. In Studien erwies sich die Substanz als reproduktions- und gentoxisch, sowie kanzerogen beim Nager und zudem als neurotoxisch sowohl im Nager als auch beim Menschen. Bereits 1994 wurde Acrylamid von der *International Agency for Research on Cancer (IARC)* als wahrscheinlich krebserzeugend für den Menschen (Gruppe 2A) eingestuft. Im Zuge des Fremdstoffmetabolismus wird Acrylamid in der Leber zu Glycidamid umgesetzt. Katalysiert wird die Reaktion durch das Enzym CYP2E1. Als reaktives Epoxid kann Glycidamid an die DNA binden, wodurch das in vorliegender Arbeit behandelte *N7-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-guanin (N7-GA-Gua)*, gebildet wird. Dieses DNA-Addukt bildet das Hauptaddukt der Reaktion aus GA und DNA-Bausteinen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine hochsensitive UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode zu entwickeln, um damit anschließend eine mögliche Hintergrundbelastung mit Acrylamid anhand des *N7-GA-Gua*-Addukts sowohl im Tier als auch im Menschen nachzuweisen und damit eine bessere Datenlage über die Substanz zu erhalten.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden Synthesen der für die chromatographische Analytik benötigten Verbindungen durchgeführt. Hierbei konnten erstmals Glycidamid-Kristalle erhalten und untersucht werden. In nachfolgenden *in-vitro*-Experimenten wurden die Zytotoxizität von Acrylamid und dessen Metaboliten mittels Resazurin-Reduktionstest, sowie die Bildung von *N7-GA-Gua* in primären

Rattenhepatozyten (pRH) nach Inkubation mit Acrylamid, untersucht. Im Resazurin-Test erwies sich Acrylamid in Konzentrationen bis zu 2500 μM als nicht zytotoxisch und konnte daher zur Inkubation der Zellen mit Konzentrationen bis zu 2000 μM Acrylamid eingesetzt werden. Im anschließend durchgeführten Inkubationsversuch, bei dem die Zellen mit 2–2000 μM Acrylamid über 1, 16 oder 24 h inkubiert wurden, konnten in allen Testkonzentrationen *N7-GA-Gua*-Addukte bestimmt werden. Dank der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten sensitiven analytischen Methode, konnten *N7-GA-Gua*-Addukte auch in den Organen (Lunge, Niere und teilweise Leber) vom Nager (C57BL/6jRj- und BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Maus und Wistar-Ratte) bestimmt werden. Geschlechts- oder organabhängige Effekte konnten nicht festgestellt werden. Einzig die Anzahl an *N7-GA-Gua* lag in den C57BL/6jRj-Mäusen signifikant über denen der Wistar-Ratten. In der durchgeführten Humanstudie konnten im Blut von 48 der 60 Probanden Addukte nachgewiesen werden. Signifikante Einflüsse der Lebensführung, des Alters und der Ernährung der Probanden auf den Hintergrund-Adduktgehalte wurden nicht festgestellt; es ergab sich lediglich eine schwache Korrelation zwischen der Anzahl an *N7-GA-Gua* und dem Gewicht bzw. dem BMI der Studienteilnehmer.

Insgesamt liefert die vorliegende Arbeit wichtige Erkenntnisse über die Gehalte an *N7-GA-Gua* *in vitro* in primären Rattenhepatozyten, als auch *in vivo* in Organen von Ratte und Maus, sowie im Blut des Menschen. Die Ergebnisse tragen zur Verbesserung der Datenlage über Acrylamid bei. Insbesondere die Ergebnisse der durchgeführten Humanstudie liefern Einblicke in die Hintergrundbelastung an *N7-GA-Gua* im Querschnitt der Bevölkerung und können daher auch für die Risikobetrachtung von Acrylamid sowie zur Ableitung weiterer Forschungsarbeiten und Studien von Interesse sein.

Abstract

Acrylamide is a food contaminant, which is formed by the so-called Maillard reaction. It is produced in particular during the preparation of carbohydrate-rich, high temperature treated foods, such as French fries, crisps, cereals and similar products. The average daily exposure, through the consumption of food, is about 0.4–1.9 µg/kg body weight and day. In addition, acrylamide is formed as a result of pyrolysis processes, which is why tobacco smoking is another route of exposure. The amount of acrylamide produced in the mainstream of cigarette smoke is 1.1–2.3 µg/cigarette. Studies proved the substance to be repro- and genotoxic as well as carcinogenic in rodents and also neurotoxic in both rodents and humans. Already in 1994, acrylamide was classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as probably carcinogenic to humans (group 2A). In the course of the metabolism of foreign substances acrylamide is converted to glycidamide in the liver. The reaction is catalyzed by the enzyme CYP2E1. As a reactive epoxide, glycidamide can bind to DNA, thereby forming *N*7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanine (*N*7-GA-Gua), which is the subject of the present study. This DNA adduct forms the main adduct of the reaction of glycidamide and DNA building blocks.

The aim of the present study was to develop a highly sensitive UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS method to subsequently detect a possible background level of acrylamide using the *N*7-GA-Gua adduct in both animals and humans and thus to obtain better data on the substance.

At the beginning of this work, syntheses of the compounds required for chromatographic analysis were carried out. This was the first time that crystals of glycidamide could be obtained and examined. In subsequent *in vitro* experiments, both the cytotoxicity of acrylamide and its metabolites (by means of a resazurin test), and the formation of *N*7-GA-Gua in primary rat hepatocytes after incubation with acrylamide were investigated. In the resazurin test, acrylamide in concentrations up to 2500 µM proved to be non-cytotoxic and could therefore be used to incubate the cells with concentrations up to 2000 µM acrylamide. In the subsequent incubation experiment, in which the cells were incubated

with 2–2000 μM acrylamide for 1, 16 or 24 h, *N7-GA-Gua* adducts could be determined in all test concentrations. Thanks to the sensitive analytical method developed in this work, *N7-GA-Gua* adducts could also be determined in the organs (lung, kidney and partly liver) of rodents (C57BL/6jRj- and BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR mouse and Wistar rat). Gender or organ dependent effects could not be determined. Only the number of *N7-GA-Gua* was significantly higher in the C57BL/6jRj mice than in the Wistar rats. In the human study carried out, adducts could be detected in the blood of 48 of the 60 test persons. Significant influences of lifestyle, age and nutrition of the subjects on the background adduct level were not found; there was only a weak correlation between the number of *N7-GA-Gua* and the weight or BMI of the study participants.

Overall, the present work provides important insights into the levels of *N7-GA-Gua* *in vitro* in primary rat hepatocytes, as well as *in vivo* in organs of rats and mice, and in human blood. The results contribute to the improvement of the available data regarding acrylamide. In particular, the results of the human study carried out provide insights into the background levels of *N7-GA-Gua* in a cross-section of the population and may therefore also be of interest with respect to the risk assessment of acrylamide, and for deriving further research and study.

I. Abkürzungsverzeichnis

Symbole und Formelzeichen

Λ	Peakfläche bei gegebener Wellenlänge [mAU·s]
c	Stoffmengenkonzentration [mol/l] = [M]
c	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum (299.792 km/s)
d	Durchmesser
δ	chemische Verschiebung [ppm]
Δ	Differenz
g	Erdbeschleunigung; $\approx 9,81 \text{ m/s}^2$
${}^nJ_{X,Y}$	Kopplungskonstante über n-Bindungen zu Atom X bzw. zw. den Atomen X und Y [Hz]
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis; hier dimensionslos
m	Masse [g]; atomare Masseneinheit [u]
M	Molare Masse [g/mol]
n	Anzahl der (unabhängig) durchgeführten Experimente oder Anzahl der untersuchten Tiere /Humanproben („Stichprobenumfang“)
ρ	Massenkonzentration; Dichte in m/V
t	Zeit
T	Temperatur [K] oder [° C]
t_R	Retentionszeit; HPLC; <i>time of retention</i> [min]
V	Volumen
w	Massenanteil in m/m; auch als Gew.-%,

Einheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Da	Dalton (1 Da = 1 u)
eV	Elektronenvolt

g	Gramm
h	Stunde
Hz	Hertz (1 Hz = 1/s)
K	Kelvin
l (L)	Liter
m	Meter
M	Molarität, (1 M = 1 mol/l)
min	Minute
mol	Mol
ppb	engl. parts per billion („Teile pro Milliarde“; 1 p.p.b. = 10^{-9})
ppm	engl. parts per million („Teile pro Million“; 1 p.p.m. = 10^{-6})
ppt	engl. parts per trillion („Teile pro Billion“; 1 p.p.t. = 10^{-12})
s	Sekunde
t	Tonne (1000 kg)
u	engl. <i>unified atomic mass unit</i> , Atomare Masseneinheit, auch amu
V	Volt

SI-Präfixe

M	Mega (10^6)	Million
k	Kilo (10^3)	Tausend
c	Zenti (10^{-2})	Hundertstel (%)
m	Milli (10^{-3})	Tausendstel (‰)
μ	Mikro (10^{-6})	Millionstel (ppm)
n	Nano (10^{-9})	Milliardstel (ppb)
p	Piko (10^{-12})	Billionstel

Abkürzungen

AA	Acrylamid
AAMA	<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-Carbamoylethyl)-cystein
AAMA-Sul	<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-Carbamoylethyl)-cystein-sulfoxid
AA-Val	<i>N</i> -(2-Carbamoylethyl)-valin
ADI	engl. <i>acceptable daily intake</i> ; tolerierbare tägliche Aufnahme eines Stoffes
AGEs	engl. <i>advanced glycation end products</i>
ALARA	engl. <i>as low as reasonable achievable</i> ; Teil des Minimierungskonzeptes
AP-Stelle	apurinische bzw. apyrimidinische Stelle
BER	Basenexzisionsreparatur
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
Bidest	Bidestilliertes Wasser (aqua bidestillata)
BM	Belastungsmonitoring
BMDL10	engl. <i>benchmark dose lower confidence limit 10</i> ; Untere Grenze des Vertrauensbereichs
BP	Basenpaarung
BSA	engl. <i>Bovine Serum Albumin</i> ; Rinderserumalbumin
BSO	Buthioninsulfoximin
CA	Chromosomenabberation
CAD	engl. <i>Collision activated dissociation</i> ; Einstellung am Massenspektrometer

CAS	engl. <i>Chemical Abstracts Service</i>
CE	engl. <i>Collision energy</i> ; Einstellung am Massenspektrometer
CEP	engl. <i>Collision cell entrance potential</i> ; Einstellung am Massenspektrometer
CUR	engl. <i>Curtain gas</i> ; Einstellung am Massenspektrometer
CXP	engl. <i>Collision cell exit potential</i> ; Einstellung am Massenspektrometer
CYP	Cytochrom P450-Monooxygenasen
d	Duplett
DCF	2,7-Dichlorfluorescein
DMF	<i>N, N'</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	engl. <i>Declustering potential</i> ; Einstellung am Massenspektrometer
dG	2'-Desoxyguanosin
DHPA	Dihydroxypropanamid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> ; Deoxyribonukleinsäure
DP	engl. <i>declustering potential</i>
dR	Deoxyribose
EC₅₀	mittlere effektive Dosis (für einen genannten Effekt)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure

EM	Effektmonitoring
EMS	Ethylmethansulfonat
EP	engl. <i>Entrance potential</i> ; Einstellung am Massenspektrometer
ESI	Elektronenspray-Ionisation
Et al.	Lat. <i>Et alii</i> ; und andere
EU	Europäische Union
F334	Inzucht Albino Rattenstamm (Fischer)
FAO	engl. <i>Food and Agriculture Organization of the United Nation</i>
FAPy	Formamidopyridin
FIA	<i>Flow Injection Analyses</i>
FKS	Fötales Kälberserum
FMO	Flavin-abhängige Monooxygenasen
GA	Glycidamid
GAS	Gas
GA-Val	<i>N</i> -(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-valin
GAMA	<i>N</i> -Acetyl- <i>S</i> -(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-cystein
Gew.-%	Gewichtsprozent (w)
GGT	γ -Glutamyltranspeptidase
GSH	Glutathion
GST	Glutathion- <i>S</i> -Transferasen

HB	Hämoglobin
HBM	Humanes Biomonitoring
HEPES	2- (4-(2- Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HILIC	engl. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i> ; hydrophile Interaktionschromatographie
HPLC	engl. <i>high performance liquid chromatography</i> ; Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Assay
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
IARC	engl. <i>International Agency for Research on Cancer</i> ; Internationale Agentur für Krebsforschung
<i>i. p.</i>	<i>lat., intra peritoneum</i> ; intraperitoneal, in die Bauchhöhle
<i>i. v.</i>	<i>lat. intra vena</i> ; intravenös, in die Vene
IS	Interner Standard
iso-GA-Hb	<i>N</i> -(2-Carbamoyl-1-hydroxyethyl)-valin
iso-GAMA	<i>N</i> -Acetyl-S-(1-carbamoylethyl-2-hydroxyethyl)-cystein
KG	Körpergewicht
LC-MS/MS	HPLC mit (Tandem-)Massenspektrometrie-Kopplung
LD₅₀	mittlere letale Dosis, an welcher 50% der Tiere versterben
LM	Lebensmittel
LOD	<i>Limit of detection</i> , Nachweis-oder Detektionsgrenze

LOQ	<i>Limit of quantification</i> , Bestimmungs-oderQuantifizierungsgrenze
METH	Methamphetamin
MK	Mikrokerne
MMS	Methylmethansulfonat
MoE	<i>Margin of Exposoure</i> ; Sicherheitsabstand
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin-Salzsäure
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i> ; Messmodus der Tandem-MS
MS	Massenspektrometrie bzw. Massenspektrom
MW	arithmetischer Mittelwert
NADP	β -Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, oxidierte Form
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
NAT	Acetyltransferasen
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NK	Negativkontrolle
NMR	engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> ; Kernresonanzspektroskopie
NOAEL	engl. <i>no observed adverse effekt level</i> ; Geringste Konzentration im Tierversuch, die keine adversen Effekte verursacht
N1-GA-dA	N1-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-2'-deoxyadenosin
N3-GA-Ade	N3-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-2-hydroxyethyl-adenin
N7-GA-Gua	N7-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-guanin

OP	Optische Dichte
p.a.	lat., <i>pro analysi</i> (als Reinheitsstufe für Chemikalien)
PBS	engl. phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferter Lösung, Calcium- und Magnesium-frei)
PBMCs	engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> ; periphere mononukleären Blutzellen
PES	Polyethersulfon
PK	Positivkontrolle
pRH	primäre Rattenhepatozyten
Q	Quadrupole
REACH	engl. <i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i> Registrierung, Evaluation, Authorisierung und Beschränkung von Chemikalien
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> ; Reaktive Sauerstoffspezies
RP	engl. <i>reversed phase chromatography</i> ; Umkehrphasen-Chromatographie
RR	relatives Risiko
RNA	engl. <i>Ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
PPG	Polypropylenglycol
RT-PCR	engl. <i>real time polymerase chain reaction</i> ; Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
S	<i>Singulett</i>
SB	Strangbruch

SCE	eng. <i>sister chromatid exchange</i> ; Schwesterchromatidaustausch-Test
SDS	sodium dodecyl sulfate
SIM	eng. <i>Selected ion monitoring</i> ; Messmodus der Tandem-MS
Stabw	Standardabweichung
SULT	Sulfotransferasen
T	Triplett
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TE	TRIS-EDTA-Puffer
TEM	Temperatur
TDI	eng. <i>tolerable daily intake</i> ; gibt die dulbare tägliche Aufnahmemenge eines Stoffes an
TG	Triglyceride
THF	Tetrahydrofuran
UBM	Umweltbiomonitoring
UDS	eng. <i>unscheduled DNA synthesis</i> ; Unplanmäßige (außerplanmäßige) DNA-Synthese
UHPLC	eng. <i>ultra high performance liquid chromatographie</i> ; Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
UGT	UDP-Glucuronosyltransferasen
WBB	Wasserstoffbrückenbindungen
WHO	eng. <i>World Health Organisation</i> ; Welt-Gesundheits-Organisation

3-Apa 3-Aminopropionamid

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 01: Basenpaarung der DNA	7
Abbildung 02: Angriffspunkte von Alkylanzien in DNA-Basen	8
Abbildung 03: Überblick über mögliche Arten von DNA-Schäden.....	11
Abbildung 04: Fließschema des Drei-Stufen-Modellsystems.	19
Abbildung 05: Zusammenhang zwischen Initiatoren und Promotoren	21
Abbildung 06: Transformation einer normalen Zelle in eine maligne Zelle im Verlauf der Kancerogenese, basierend auf dem Drei-Stufen-Modellsystem	22
Abbildung 07: Charakteristika von Krebszellen entsprechend dem Modell nach Hanahan und Weinberg.....	23
Abbildung 08: Ablauf der Risikobewertung	52
Abbildung 09: Übersicht über alle drei Klassen von Blutzellen.....	57
Abbildung 10: Veranschaulichung des MRM-Modus	64
Abbildung 11: Vereinfachte Synthesevorschrift zur Herstellung von GA durch Zugabe von Natronlauge zu einer Mischung aus Acrylnitril und Wasserstoffperoxid.....	66
Abbildung 12: ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR der Verbindung GA (600,13 MHz; 295,15K, ppm, D_2O).	67
Abbildung 13: ^1H -NMR der Verbindung GA (100,66 MHz; 294,05 K; ppm; DMSO-d_6).....	67
Abbildung 14: Strukturen der bei der Synthese des GA gebildeten Enantiomeren A und B, inklusive der Benennung der einzelnen Atome.	70
Abbildung 15: Festkörper Struktur der Verbindung GA. Mittels starker intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen ergibt sich eine β -Faltblattstruktur.	71
Abbildung 16: Anordnung der β -Faltblattstruktur aufgrund schwacher Intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen.	71
Abbildung 17: Blick entlang der b-Achse mit Anordnung der β -Faltblätter in Folge starker N-H...O und C-H...O H Wasserstoffbrückenbindungen	72
Abbildung 18: Überprüfung der Stabilität von GA in D_2O mittels ^1H -NMR.....	73
Abbildung 19: Synthesevorschrift (stark vereinfacht) zur Herstellung von N7-GA-Gua.....	75

Abbildung 20:	^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR der Verbindung <i>N7</i> -GA-Gua (600,13 MHz; 295,15 K; ppm; DMSO- d_6)	76
Abbildung 21:	^1H -NMR der Verbindung <i>N7</i> -GA-Gua (600,13 MHz; 295,15 K; ppm, DMSO- d_6)	76
Abbildung 22:	Fragmentierungsmuster der Verbindung <i>N7</i> -GA-Gua	78
Abbildung 23:	Fragmentierungsmuster der Verbindung [$^{15}\text{N}_5$] <i>N7</i> -GA-Gua	79
Abbildung 24:	Zytotoxizität von AA und GA (jeweils 0,01–10 mM) in pRH nach 24h-Inkubation	81
Abbildung 25:	Ermittlung des IC_{50} -Wertes über die Konzentrations-Wirkungskurve (sigmoidaler Fit) nach Inkubation pRH mit AA (0,01–10 mM) bzw. GA (0,01–10 mM) für 24 h	82
Abbildung 26:	Repräsentatives UHPLC-ESI $_{\text{pos}}$ -MS/MS-Chromatogramm	89
Abbildung 27:	Repräsentatives UHPLC-ESI $_{\text{pos}}$ -MS/MS-Chromatogramm eines 0,01 nM Standards	92
Abbildung 28:	Repräsentatives UHPLC-ESI $_{\text{pos}}$ -MS/MS-Chromatogramm eines 0,025 nM Standards	92
Abbildung 29:	Kalibriergeraden zur Quantifizierung von <i>N7</i> -GA-Gua in Humanproben	93
Abbildung 30:	Repräsentatives UHPLC-ESI $_{\text{pos}}$ -MS/MS-Chromatogramm eines 1 nM Standards	97
Abbildung 31:	Repräsentatives UHPLC-ESI $_{\text{pos}}$ -MS/MS-Chromatogramm einer Realprobe, bei welcher Ratten-DNA thermisch hydrolysiert wurde und mittels Zentrifugalfiltereinheiten aufgereinigt wurde	98
Abbildung 32:	Repräsentatives UHPLC-ESI $_{\text{pos}}$ -MS/MS-Chromatogramm einer Realprobe, bei welcher Ratten-DNA thermisch hydrolysiert wurde und mittels Zentrifugalfiltereinheiten aufgereinigt und anschließend eine Butanol-Extraktion durchgeführt wurde	99
Abbildung 33:	Ergebnisse der Inkubation pRH mit AA (2–2000 μM) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1; 16 oder 24 h) in Form unterschiedlicher Plot- Varianten	101
Abbildung 34:	<i>N7</i> -GA-Gua-Gehalte in Leber und Niere in Abhängigkeit der Spezies	112
Abbildung 35:	Anzahl an <i>N7</i> -GA-Gua in Leber, Lunge und Nieren von männlichen und weiblichen C57BL/6jRj-Mäusen	117
Abbildung 36:	Anzahl an <i>N7</i> -GA-Gua in Leber, Lunge und Nieren von männlichen C57BL/6jRj-Mäusen und männlicher BKS(D)-Lepr $^{\text{db}}$ /JOrLR- Mäuse	122
Abbildung 37:	Ergebnis der durchgeführten Humanstudie als Anzahl an <i>N7</i> -GA-Gua jedes einzelnen Probanden	129
Abbildung 38:	Glycidamid-Kristalle im Syntheskolben	154

Abbildung 39: Fotoaufnahme der Substanz <i>N7-GA-Gua</i>	157
Abbildung 40: Zentrifugenröhrchen nach erfolgter Zentrifugation.....	162
Abbildung 41: Neubauer-Zählkammer	168
Abbildung 42: Reduktion von Resazurin zu Resorufin.	178
Abbildung 43: Fließschema Studienablauf Humanstudie (vereinfacht dargestellt).....	193
Abbildung 44: Ermittlung des EC ₅₀ -Wertes über die Dosis-Wirkungskurve (sigmoidaler Fit) nach Inkubation pRH mit AA (0,01–10 mM) für 24 h.	226
Abbildung 45: Ermittlung des EC ₅₀ -Wertes über die Dosis-Wirkungskurve (sigmoidaler Fit) nach Inkubation pRH mit GA (0,01–10 mM) für 24 h	227
Abbildung 46: Chromatogram eines DNA-Nukleosidmix bestehend aus dC, dA, dG und dT.	228
Abbildung 47: Chromatogram eines DNA-Basen Mixes (100 µM) in 80 % Acetonitril.....	229
Abbildung 48: Chromatogram des Analyten <i>N7-GA-Gua</i> mit VDSpher® HILIC-Z-Testsäule.	230
Abbildung 49: Chromatogram des Analyten <i>N7-GA-Gua</i> mit Fluorophenyl-Testsäule.....	231
Abbildung 50: Chromatogram des Analyten <i>N7-GA-Gua</i> mit Ultra C18-Testsäule	232
Abbildung 51: Chromatogram des Analyten <i>N7-GA-Gua</i> mit Kinetex HILIC-Testäule.....	233
Abbildung 52: Chromatogram des Analyten <i>N7-GA-Gua</i> mit VDSpher PUR C18-E-Testäule	234
Abbildung 53: Chromatogram des Analyten <i>N7-GA-Gua</i> mit Acquity UPLC BEH Amid-Testäule....	235
Abbildung 54: Chromatogram des Analyten <i>N7-GA-Gua</i> UPLC HSS T3-Testäule	236
Abbildung 55: Repräsentatives UHPLC-ESI _{pos} -MS/MS-Chromatogramm eines 0,01 nM Standards (mit 1 nM IS) bei einem Injektionsvolumen von 5 µl.	237
Abbildung 56: Repräsentatives UHPLC-ESI _{pos} -MS/MS-Chromatogramm eines 0,025 nM Standards (mit 1 nM IS) bei einem Injektionsvolumen von 5 µl.	237
Abbildung 57: Kalibriergerade zur Quantifizierung von <i>N7-GA-Gua</i> in tierischen Geweben aus Ratte und Maus.....	238
Abbildung 58: Kalibriergerade zur Quantifizierung von <i>N7-GA-Gua</i> in Humanblut. Injektionsvolumen 5 µl.....	239
Abbildung 59: Kalibriergerade zur Quantifizierung von <i>N7-GA-Gua</i> in Humanblut. Injektionsvolumen 10 µl	240

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 01:	Schätzwerte für verschiedene Beispiele endogener Schädigung humaner DNA	12
Tabelle 02:	Übersicht über verschiedene DNA-Reparatursysteme und Beispiele für Läsionen ..	13
Tabelle 03:	Beispiele für mögliche am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Phase-I- und Phase-II-Enzyme.....	16
Tabelle 04:	Dignitätsbeurteilung und Differenzierung von Tumoren.....	18
Tabelle 05:	Physikalisch-chemische Eigenschaften von AA.....	24
Tabelle 06:	Gegenüberstellung der Richtwerte aus der EU-Empfehlung und der EU-Verordnung 2017.....	29
Tabelle 07:	Ausscheidung von AA und dessen Metaboliten in unterschiedlichen Spezies über einen Zeitraum von 24 h	37
Tabelle 08:	Bedeutung des Biomonitoring für die Risikoabschätzung.....	56
Tabelle 09:	Strukturanalytische Daten von GA mittels NMR-Untersuchung.....	68
Tabelle 10:	Quantitative Untersuchung mittels Elementaranalyse von GA. Vergleich der Elementaranalyse-Daten des synthetisierten GA mit des in der Literatur von Payne und Williams (1960) beschriebenen.....	68
Tabelle 11:	Vergleich der Bindungslängen aus experimenteller Berechnung und Datenbanken Recherche.....	70
Tabelle 12:	Ergebnisse der NMR- spektroskopischen Untersuchung von <i>N7-GA-Gua</i>	77
Tabelle 13:	Ergebnisse der Elementaranalyse von <i>N7-GA-Gua</i>	77
Tabelle 14:	Verwendete Testsäulen.....	87
Tabelle 15:	Parameter und HPLC-Einstellungen zur Detektion von <i>N7-GA-Gua</i>	88
Tabelle 16:	LC-MS/MS-Bedingungen: Substanzspezifische Parameter.....	90
Tabelle 17:	LC-MS/MS-Bedingungen: Gerätespezifische Parameter.....	90
Tabelle 18:	LOD und LOQ in Abhängigkeit der DANN-Menge bei 0,01 nM und 0,025 nM.....	91
Tabelle 19:	Lauf zu Lauf (A) und Tag zu Tag Variabilität (B) [%] bei einem Injektionsvolumen von 5 µl.....	94

Tabelle 20:	Absolute Wiederfindung	94
Tabelle 21:	Benötigte Geräte und Software-Programme zur Charakterisierung der Substanzen	155
Tabelle 22:	Benötigte Chemikalien zur Synthese von Glycidamid	156
Tabelle 23:	Benötigte Chemikalien zur Synthese von <i>N7</i> -GA-Gua und [¹⁵ N ₅] <i>N7</i> -GA-Gua.....	159
Tabelle 24:	Dichtebereiche und mittlere Dichten humaner Blutkomponenten	161
Tabelle 25:	Benötigte Chemikalien zur Isolation von mononukleären Zellen.....	163
Tabelle 26:	Benötigte Chemikalien zur Perfusion.....	165
Tabelle 27:	Chemikalien, welche zur Kultivierung von primären Rattenhepatozyten benötigt werden.....	169
Tabelle 28:	Pipettierschema für Verdünnungsreihe.....	170
Tabelle 29:	Benötigte Chemikalien zur Isolation von Organen aus Maus und Ratte.....	171
Tabelle 30:	Benötigte Chemikalien für die DNA-Extraktion.....	174
Tabelle 31:	Benötigte Chemikalien für die thermische Hydrolyse und Butanol-Extraktion.....	177
Tabelle 32:	Pipettierschema für Verdünnungsreihe.....	180
Tabelle 33:	Schema zur Herstellung verschiedener Stammlösungen.....	180
Tabelle 34:	Benötigte Chemikalien für den Resazurin-Reduktionstest.....	180
Tabelle 35:	Benötigte Geräte und Software zur Bestimmung der Zytotoxizität.....	181
Tabelle 36:	Überblick über die verwendete Hardware und Software für die MS-Analytik.....	182
Tabelle 37:	Substanzabhängige Parameter beim MS-Tuning.....	183
Tabelle 38:	Quellenabhängige Parameter beim MS-Tuning.....	183
Tabelle 39:	Überblick UHPLC-Parameter.....	184
Tabelle 40:	Pipettierschema zur Herstellung von Kalibrierlösungen.....	186
Tabelle 41:	Herstellung der benötigten <i>N7</i> -GA-Gua-Lösungen.....	187
Tabelle 42:	Herstellung von Lösungen, welche für das Ansetzen der Kalibriergeraden benötigt werden.....	187
Tabelle 43:	Herstellung der benötigten <i>N7</i> -GA-Gua Lösungen.....	189
Tabelle 44:	Volumina an <i>N7</i> -GA-Gua, die den Wiederfindungsproben vor Probenaufarbeitung zugesetzt werden.....	189

Tabelle 45:	Absolute Wiederfindung.....	189
Tabelle 46:	Fragen des Fragebogens zur Humanstudie.....	191
Tabelle 47:	Studienkollektiv.....	192
Tabelle 48:	Aufführung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte.....	194
Tabelle 49:	Aufführung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Reagenzien.....	196
Tabelle 50:	Aufführung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien...199	
Tabelle 51:	Kristallstrukturdaten und strukturelle Feinparameter.....	220
Tabelle 52:	Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente, isotrope Displacement-Parameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) für GA.....	222
Tabelle 53:	Bindungslängen [\AA] und -winkel [$^\circ$] für GA.....	222
Tabelle 54:	Anisotrope Displacement-Parameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) für GA.....	224
Tabelle 55:	Wasserstoff-Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und isotrope Displacement-Parameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) für GA.....	224
Tabelle 56:	Bestimmung der Zytotoxizität mittels Resazurin-Reduktionstest nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Acrylamid.....	226
Tabelle 57:	Bestimmung der Zytotoxizität mittels Resazurin-Reduktionstest nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit Glycidamid.....	227
Tabelle 58:	Chromatographie-Bedingungen zur Trennung von dC, dA, dG und dT.....	228
Tabelle 59:	Chromatographie-Bedingungen zur Trennung von DNA-Basen VDSpher [®] HILIC-Z-Testsäule.....	229
Tabelle 60:	Chromatographie-Bedingungen zur Detektion von N7-GA-Gua auf der VDSpher [®] HILIC-Z-Testsäule.....	230
Tabelle 61:	Chromatographie-Bedingungen zur Detektion von N7-GA-Gua auf der Fluorophenyl-Testsäule.....	231
Tabelle 62:	Chromatographie-Bedingungen zur Detektion von N7-GA-Gua auf der Ultra C18 Testsäule.....	232

Tabelle 63:	Chromatographie-Bedingungen zur Detektion von <i>N7-GA-Gua</i> auf Kinetex HILIC-Testsäule.....	233
Tabelle 64:	Chromatographie-Bedingungen zur Detektion von <i>N7-GA-Gua</i> auf der VDSpher PUR C18-E-Testsäule.....	234
Tabelle 65:	Chromatographie-Bedingungen zur Detektion von <i>N7-GA-Gua</i> auf der Acquity UPLC BEH-Amide-Testsäule.....	235
Tabelle 66:	Chromatographie-Bedingungen zur Detektion von <i>N7-GA-Gua</i> auf der UPLC HSS T3 Testsäule.....	236
Tabelle 67:	Rohdaten zur Erstellung der Kalibriergeraden zur Bestimmung der Gehalte an <i>N7-GA-Gua</i> in pRH und Gewebeproben aus Ratte und Maus, bei einem Injektionsvolumen von 5 µl	238
Tabelle 68:	Rohdaten zur Erstellung der Kalibriergeraden, zur Bestimmung der Gehalte an <i>N7-GA-Gua</i> in Humanproben.....	239
Tabelle 69:	Rohdaten zur Erstellung der Kalibriergeraden zur Bestimmung der Gehalte an <i>N7-GA-Gua</i> in Humanproben.....	240
Tabelle 70:	Bestimmung der DNA-Adduktgehalte an <i>N7-GA-Gua</i> nach Inkubation pRH mit AA (0,002–2 mM) für 1, 16 oder 24h.....	241
Tabelle 71:	Bestimmung der DNA-Adduktgehalte in unterschiedlichen Geweben von Ratte und Maus.	243
Tabelle 72:	Anzahl an <i>N7-GA-Gua</i> in Humanblut.....	245
Tabelle 73:	Rohdaten Humanstudie.	248
Tabelle 74:	Statistik Humanstudie: Korrelationstest nach <i>Spearman</i>	256
Tabelle 75:	Statistik Humanstudie: Korrelationstest nach <i>Spearman</i>	258
Tabelle 76:	Statistik zur Humanstudie. Ergebnisse des <i>Wilcoxon-Mann-Whitney-Test</i> mit alpha = .5%	260
Tabelle 77:	Statistik zur Humanstudie. Ergebnisse ANOVA.....	260

IV Schemaverzeichnis

Schema 01:	Mögliche DNA-Schäden in Folge von DNA-Addukten am <i>N7</i> -Atom des 2'-Desoxyguanosins (dG).....	9
Schema 02:	Allgemeine, durch Cytochrom P450-Monooxygenasen katalysierte Reaktion.....	15
Schema 03:	Bildung der Mercaptursäure <i>N</i> -Acetyl-S-(2-Carbamoylethyl)-cystein (AAMA) aus AA und GSH.....	17
Schema 04:	Vereinfachte Darstellung der chemischen Synthese von AA.....	24
Schema 05:	Bildungsmechanismus von AA aus Asparagin und reduzierendem Zucker (Carbonylquelle).....	27
Schema 06:	Bildungsmechanismus AA aus Triglyceriden	28
Schema 07:	Metabolismus von AA	34
Schema 08:	Synthese der Verbindung GA.....	153
Schema 09:	Reaktionsgleichung zur Bestimmung des Wasserstoffperoxidgehaltes	154
Schema 10:	Reaktionsschema zur Synthese des DNA-Adduktes <i>N7</i> -GA-Gua.....	157
Schema 11:	Reaktionsschema zur Synthese des [¹⁵ N ₅] <i>N7</i> -GA-Gua	158
Schema 12:	Struktur von Trypanblau	168

V. Gleichungsverzeichnis

Gleichung 01:	Berechnung der Zellzahl pro ml.....	168
Gleichung 02:	Berechnung der Viabilität.....	169
Gleichung 03:	Berechnung der relativen Viabilität.....	179

1. Einleitung und Problemstellung

Als Industriechemikalie wird Acrylamid vielfältig eingesetzt. Eine häufige Anwendung ist die Herstellung von (Co)polymeren für die Farben-, Papier und Zementindustrie. Neben der gezielten Synthese entsteht Acrylamid jedoch auch als Lebensmittelkontaminante bei der Zubereitung kohlenhydratreicher Lebensmittel, wie z. B. Pommes frites, Chips, Knäckebrot, Cerealien und ähnlichen Produkten. Die mittlere tägliche Exposition, durch den Verzehr von Lebensmittel liegt bei ca. 0,4–1,9 µg/kg Körpergewicht und Tag [JECFA, 2011; EFSA, 2015]. Eine weitere wichtige Expositionsquelle stellt das Tabakrauchen dar, bei welchem Acrylamid in Folge von Pyrolyseprozessen gebildet wird. Die Menge des dabei entstehenden Acrylamid im Hauptstrom von Zigaretten liegt bei 1,1–2,3 µg/Zigarette [Smith *et al.*, 2000]. Für Raucher ergibt sich somit eine zusätzliche Acrylamid-Belastung von 0,5–2,0 µg/kg Körpergewicht und Tag [BGBl, 2003], vergleichbar der mittleren täglichen Exposition von 0,4–1,9 µg/kg Körpergewicht, durch den Verzehr von Lebensmittel [JECFA, 2011; EFSA, 2015].

Die Entdeckung von Acrylamid als Lebensmittelkontaminante war eher zufällig. Während der Bauarbeiten an einem schwedischen Eisenbahntunnel im Jahr 1997, kam es zu starken Wassereinbrüchen. Um weitere Einbrüche zu verhindern, wurden die betroffenen Stellen mittels eines Acrylamid-haltigem Polymers abgedichtet. Unglücklicherweise gelangte dabei unvollständig polymerisiertes Acrylamid ins Grundwasser. Ein vermehrtes Fischsterben und neurologische Störungen bei Rindern, die von diesem Wasser getrunken hatten, waren die Folge. Die Blut-Untersuchung der beteiligten Tunnelarbeiter ergab erhöhte Hämoglobin-Adduktwerte, die als Expositionsbiomarker herangezogen werden [Hagmar *et al.*, 2001]. Bereits in früheren Untersuchungen konnte eine solche Acrylamid-Belastung durch Detektion von Hämoglobin-Addukten in anderen Populationsgruppen (Raucher, Nichtraucher, Arbeiter mit berufsbedingtem Acrylamid-Umgang) nachgewiesen werden, weshalb eine alimentäre oder endogene Exposition der Substanz nicht ausgeschlossen werden konnte. 2002 wurde Acrylamid dann erstmals in verschiedenen Lebensmitteln nachgewiesen [Tareke *et al.*, 2002].

Aufgrund seiner Struktur und damit einhergehenden physikalisch-chemischen Eigenschaften (z. B. geringe Wasserlöslichkeit) und des niedrigen Molekulargewichtes, kann Acrylamid sehr leicht auf verschiedenen Pfaden (oral oder dermal) in den Körper aufgenommen werden und die Plazenta- oder Blut-Hirn-Schranke überwinden [Miller *et al.*, 1982; Sörgl *et al.*, 2002]. Des Weiteren ist eine inhalative Aufnahme des im Rauch vorkommenden Acrylamid im Hauptstrom von Zigaretten möglich [Smith *et al.*, 2000]. Neben der Toxikokinetik wurde in mehreren Studien die Toxikodynamik von Acrylamid mittels einer Reihe von *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien untersucht. Acrylamid erwies sich dabei als reproduktions- und gentoxisch, sowie kanzerogen beim Nager [JECFA, 2011]. Des Weiteren erwies sich Acrylamid als neurotoxisch sowohl im Nager als auch beim Menschen [Tyl *et al.*, 2000; Calleman *et al.*, 1994; Hagmar *et al.*, 2001]. Als Ursache für die kanzerogene und mutagene Wirkung wird die Bildung von Glycidamid, katalysiert durch das Enzym Cytochrom P450 2E1, vermutet. Als reaktives Epoxid kann Glycidamid an die Deoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*; DNA) binden, wodurch das in vorliegender Arbeit relevante *N7*-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-guanin (*N7*-GA-Gua), gebildet wird. Dieses DNA-Addukt ist das Hauptaddukt der Reaktion aus Glycidamid und DNA-Bausteinen. In geringeren Mengen werden ebenfalls *N1*-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-2'-deoxyadenosin (*N1*-GA-dA) und *N3*-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-adenin (*N3*-GA-Ade) gebildet. Während *N7*-GA-Gua und *N3*-GA-Ade bereits *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden konnten, wurde *N1*-GA-dA bisher ausschließlich im Modelversuch nach Inkubation isolierter DNA mit Glycidamid detektiert [Segeberäck *et al.*, 1995; Gamboa da Costa *et al.*, 2003; Doerge *et al.*, 2005c; Tareke *et al.*, 2006; Kotova *et al.*, 2011, Watzek *et al.*, 2012b].

DNA-Addukte nehmen eine wichtige Rolle im Prozess der chemischen Kanzerogenese ein. Werden diese im Organismus nicht erkannt und der Schaden nicht behoben, kann es zur Mutation, einem ebenfalls wichtigen Schlüsselereignisses dieses Prozesses, kommen. Nicht jedes DNA-Addukt führt somit letztlich zur Mutation und nachfolgender Manifestation des DNA-Schadens. Die Manifestation der Mutation, hängt von mehreren Faktoren ab. Zu diesen zählen neben effizienten DNA-Reparaturmechanismen auch die Stabilität des Adduktes und die Anzahl der Addukte, sowie die Position des DNA-Adduktes innerhalb des DNA-Strangs. Das zur Reparatur des Schadens nötige

Reparatursystem hängt seinerseits z. B. von der Position des Adduktes an der Base ab [Jarabek *et al.*, 2009]. *N7-Gua*-Addukte mit niedrigem Molekulargewicht werden oftmals auch als nicht promutagen und nicht zytotoxisch betrachtet [Larson *et al.*, 1985; Boysen *et al.*, 2009; Philippin *et al.*, 2014]. Bedingt durch die Instabilität von *N7-Guanin*-Addukten können jedoch weitere (promutagene) DNA-Läsionen, wie apurinische bzw. apyrimidische Stellen (AP-Stellen) und Formamidopyridin-Addukte gebildet werden [Boysen *et al.*, 2009; Gates, 2009]. Die Anzahl an AP-Stellen genomischer DNA beträgt ca. 1 Läsion pro 10^6 Nukleotide [Atamna *et al.*, 2000; Mohsin Ali *et al.*, 2004]. Ein wesentlicher Vorteil in der Untersuchung von *N7-Guanin*-Addukten liegt darin, dass, verglichen mit anderen DNA-Addukten, *N7-Guanin*-Addukte in höheren Konzentrationen in der Zelle vorliegen. Aufgrund ihrer geringeren Mutagenität können *N7-Guanin*-Addukte, wie das in vorliegender Arbeit untersuchte *N7-GA-Gua*, als Surrogatmarker für andere promutagene DNA-Addukte eingesetzt werden [Koskinen und Plná, 2000].

Als Effekt-Biomarker bzw. Biomarker der gentoxischen Wirkung spiegeln DNA-Addukte, zum einen eine individuelle Acrylamid-Belastung des einzelnen Menschen wieder, zum anderen ermöglichen sie eine Bestimmung des mit der Exposition verbundenen gentoxischen Potentials, welches möglicherweise mit dem Krebsrisiko korrelieren könnte. Andere Biomarker, die sogenannten Expositions-Biomarker, zu denen Hämoglobin-Addukte und Mercaptursäuren zuzuordnen sind, spiegeln lediglich eine vorhergegangene Acrylamid-Belastung wider. Derzeit werden vor allem Hämoglobin-Addukte und Mercaptursäuren von Acrylamid untersucht, da sich diese im Laufe der Zeit in der Forschung etabliert haben. Da Mercaptursäuren aus Urin bestimmt werden, ist das benötigte Biomaterial leicht zugänglich. Hingegen werden invasive Methoden benötigt, um Blut zu erhalten, welches dann als Biomaterial zur Bestimmung von Hämoglobin-Addukten und DNA-Addukten eingesetzt werden kann. Die benötigte Menge an Biomaterial ist bei zweiteren deutlich höher, sodass sich DNA-Addukte als Biomarker beim Menschen bisher nicht etabliert haben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine hochsensitive UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode zu entwickeln, um damit eine mögliche Hintergrundbelastung mit Acrylamid sowohl im Tier als auch im Menschen

nachzuweisen. Weder in den Tierstudien noch in der Humanstudie fand eine gezielte Exposition z. B. in Form besonders Acrylamid-haltiger Lebensmittel, wie z. B. Pommes frites, oder Ähnlichem statt. Um eine hochsensitive UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode entwickeln zu können, sollte zu Beginn das zu analysierende DNA-Addukt *N7-GA-Gua*, sowie dessen isotopenmarkiertes Analoges, welches als interner Standard verwendet werden sollte, synthetisiert werden. Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Literatur [Gamboa da Costa *et al.*, 2003]. Nachdem dann in einem weiteren Schritt eine hochsensitive analytische Methode etabliert wurde, sollte der Gehalt an *N7-GA-Gua* nach Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit unterschiedlichen AA-Konzentrationen (2–2000 µM) und nach unterschiedlichen Zeitpunkten (1; 16 und 24 h) untersucht werden. Ziel dieser Untersuchung war es, einen möglichen konzentrations-, und zeit-abhängigen Verlauf zu beobachten.

In einem weiteren Schritt sollte, neben den aus den männlichen Wistar-Ratten entnommenen primären Rattenhepatozyten, auch Lunge und Nieren entnommen und auf den Gehalt an *N7-GA-Gua* untersucht werden. Um diese Ergebnisse mit anderen Spezies zu vergleichen, wurden Leber, Lunge und Nieren männlichen und weiblichen C57BL/6JRj-Mäusen sowie männlichen BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR Mäusen untersucht. Aus in der Literatur veröffentlichten Studien zum Acrylamid-Metabolismus ist bereits bekannt, dass die Maus hinsichtlich der DNA-Adduktbildung, die sensitivere Spezies repräsentiert. Neben Speziesunterschieden sollten weitere Einflussfaktoren, wie z. B. das Geschlecht, untersucht werden. Im nächsten Schritt der Arbeit sollte die DNA-Adduktbildung in Abhängigkeit einer diabetischen Stoffwechsellage untersucht werden. Hierzu wurden die Gehalte an *N7-GA-Gua* in Leber, Nieren und Lunge von diabetischen Mäusen (BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR), mit denen aus einer nichtdiabetischen Vergleichsgruppe (C57BL/6JRj), bestimmt. Als Lebensmittelkontaminante entsteht Acrylamid in Folge der Maillard-Reaktion. Neuere Untersuchungsergebnisse deuten jedoch auch auf eine endogene Bildung hin [Tareke *et al.*, 2008; Watzek *et al.*, 2012a; Ruenz *et al.*, 2016; Goempel *et al.*, 2017]. Ein möglicher Bildungsmechanismus ist die Entstehung von Acrylamid im Rahmen der Bildung von sogenannten *advanced glycation products* (AGEs), einer Produktklasse, die durch Glykierung von Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren mit Kohlenhydraten entsteht. AGEs entstehen durch eine Art *in vivo* verlaufende Maillard-Reaktion, bei welcher im ersten Schritt durch eine

nicht-enzymatische Reaktion zwischen einer Carbonylverbindung und einer Aminverbindung stattfindet [Sharma *et al.*, 2015]. Hierbei wäre die Bildung von Acrylamid denkbar. Je nach Diabetes-Form liegt eine gestörte Insulinproduktion (Diabetes Mellitus Typ2) oder eine völlig fehlende Produktion an Insulin (Diabetes Mellitus Typ 1) vor. Als Peptidhormon wird Insulin jedoch für die Aufnahme von Glukose in die Zellen benötigt. Fehlt das Hormon bzw. ist die Produktion vermindert, liegt eine gestörte Glukose-Aufnahme in die Zellen vor. Letztlich werden dadurch die erhöhten Blutzucker-Spiegel und folglich auch die erhöhten Mengen an AGEs im Blut erklärt.

Im letzten Projekt dieser Arbeit sollte eine mögliche Hintergrundbelastung im Menschen detektiert werden. Während für die anderen Biomarker von Acrylamid eine Vielzahl an Studien existieren, gab es zum Zeitpunkt dieser Arbeit lediglich eine Humanstudie, bei welcher der Urin von 63 Probanden (30 Raucher und 33 Nichtraucher) auf den Gehalt an *N7-GA-Gua* untersucht wurde. Während bei Hämoglobin-Addukten und Mercaptursäure-Studien des Öfteren die Gehalte der untersuchten Biomarker mit dem Raucherstatus korrelieren, hatte der Raucherstatus, anders als vermutet, in einer Studie von Huang und Kollegen (2015) keinen Einfluss auf die Gehalte der einzelnen Biomarker. Bei den Nichtrauchern bzw. Rauchern lagen die Adduktgehalte bei 0,93 µg/g Kreatinin bzw. 1,41 µg/g Kreatinin [Huang *et al.*, 2015]. In eigenen Untersuchungen sollte das Blut von insgesamt 60 Probanden untersucht werden. Hierzu sollten DNA-Addukte aus den im Blut vorkommenden Lymphozyten bestimmt werden. Im Gegensatz dazu ist die Quelle der DNA-Addukte im Urin in oben genannter Studie nicht eindeutig. So kann die DNA im Urin aus Urothel und anderen Quellen stammen. Neben den Adduktgehalten sollte in der Humanstudie der vorliegenden Arbeit ferner geprüft werden, ob es einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Rauchen (Cotinin-Spiegel), Geschlecht, Body mass index (BMI), Alter, Ernährungsgewohnheiten und HbA1c-Wert gibt. Der HbA1c-Wert spiegelt den Anteil der glykosyliertem Hämoglobin am Gesamthämoglobin wider und ist somit ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der Blutzuckerwerte.

2. Theorie

2.1 DNA- Träger der Erbinformation

2.1.1 Nukleinsäuren

Nukleinsäuren sind bei der Speicherung und Expression genetischer Information von zentraler Bedeutung. Die monomeren Bausteine dieser Makromoleküle sind Nukleotide. Nukleotide bestehen aus einer organischen Base (Purin- oder Pyrimidin-Base), einer Pentose (Ribose oder Deoxyribose) und ein bis drei Phosphatresten. Die Verknüpfung des Phosphatrestes erfolgt über eine Esterbindung an das C5'-Atom der Pentose. Die Verknüpfung benachbarter Nukleotide erfolgt mittels einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-Hydroxygruppe des einen und der 3'-Hydroxygruppe des benachbarten Nukleotids. Die Einheit von organischer Base und Pentose, verknüpft über eine N-glykosidische Bindung an das C1-Atom der Pentose, wird Nukleosid genannt. Entsprechend der Art des Zuckers werden Nukleinsäuren in zwei Hauptgruppen eingeteilt. Im Falle der Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) handelt es sich bei der Pentose um eine Desoxyribose. Bei der zweiten Klasse von Nukleinsäuren, den Ribonukleinsäuren (*ribonucleic acid*, RNA), liegt die Base mit einer Ribose verknüpft vor. Zu den in den Nukleinsäuren vorkommenden Purin-Basen zählen Adenin und Guanin, zu den Pyrimidin-Basen Cytosin, und Thymin beziehungsweise Uracil (nur in der RNA statt Thymin vorkommend) [Kohlmann und Röhm, 2009; Buselmaier, 2015].

In eukaryontischen Zellen liegt die DNA im Zellkern zusammen mit Histonen in Form von Chromosomen vor. Ein bestimmter DNA-Abschnitt wird als Gen bezeichnet, der in verschlüsselter Form Informationen für den Aufbau von RNAs, welche entscheidend bei der Proteinbiosynthese beteiligt sind, enthält. Proteine bestehen aus einer Verknüpfung mehrerer, meistens 200–500, Aminosäuren. Die Reihenfolge der Aminosäuren wird durch die Nukleotid-Sequenz festgelegt, indem eine Aminosäure von einem Triplet von Nukleotiden „kodiert“ wird. Ein proteinkodierendes Gen enthält ca. 600–1500 Nukleotid- oder Basenpaare. Beim Menschen beträgt die Anzahl an

proteinkodierenden Genen im Zellkern ca. 21000. Die Größe des Genoms beträgt ca. 3000 Millionen Basenpaare [Nordheim und Knippers, 2014]. Intakte DNA setzt sich aus zwei Polydeoxyribonukleotid-Strängen zusammen. Jede Base des einen Stranges ist mit einer komplementären Base des anderen Stranges über eine nicht-glykosische Bindung verknüpft. Wie in Abbildung 01 ersichtlich ist, variiert die Anzahl der Wasserstoffbrücken. Zwei Wasserstoffbrückenbindungen tragen dabei zur Stabilisierung der Adenin-Guanin-Basenpaarung bei, während die Guanin-Cytosin-Basenpaarung durch drei Wasserstoffbrücken stabilisiert wird [Fletcher, 2013]. Des Weiteren tragen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen benachbarten aufeinander gestapelten Basenpaaren zur Stabilität der Doppelhelix bei [Buselmaier, 2015]. Die am häufigsten vorkommende Konformation der DNA bildet die sogenannte Z-Konformation. Bei dieser liegen die aromatischen Basen in einem annähernd rechten Winkel zur Helixachse im Inneren der Doppelhelix angeordnet vor, wodurch der zentrale Bereich der DNA unpolar und die Oberfläche des Rückgrats – bestehend aus hydrophilen Zuckerbausteinen und Phosphatresten – polar ist [Streyer *et al.*, 2013].

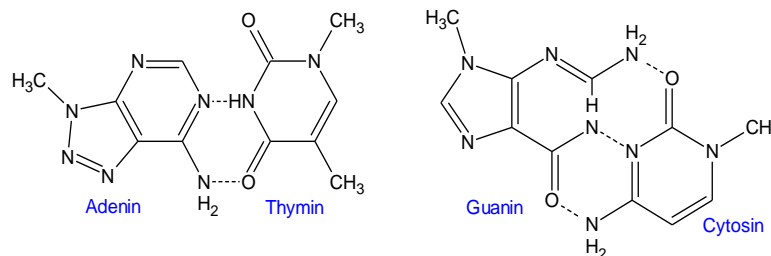


Abbildung 01: Basenpaarung (BP) der DNA [Fletcher, 2013]. Die gestrichelten Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen (WBB) dar. Zur BP zwischen Adenin und Thymin tragen zwei WBB bei (links dargestellt), während bei den DNA-Basen Guanin und Cytosin drei WBB an der BP beteiligt sind (rechts dargestellt).

2.1.2 Substanzinduzierte DNA-Veränderung und DNA-Reparatur

Chemisch reaktive Verbindungen können mit nukleophilen Zentren der DNA reagieren und kovalente Bindungen mit DNA-Basen eingehen. Der Transfer von Alkyl- und Arylamingruppen stellt wichtige chemische Reaktionen dar, welche zur Adduktbildung von chemisch reaktiven Verbindungen oder deren aktiver Metaboliten mit der DNA führen können. Alkylierende Verbindungen, zu denen sowohl das für diese Arbeit relevante Acrylamid (AA, *via* Michael-Addition), als auch dessen

Stoffwechselprodukt Glycidamid (GA, mittels direkter Alkylierung) gezählt werden, greifen bevorzugt Stickstoff und Sauerstoffatome der DNA-Basen an. Als elektrophile („Elektronen-liebende“) Verbindungen greifen diese an nukleophile Zentren der DNA an. Auch GA als elektrophile Substanz ist fähig an die DNA zu binden. Der elektrophile Charakter einer Verbindung entscheidet an welchem Atom innerhalb der einzelnen DNA-Basen die Reaktion erfolgt. Weiche Elektrophile reagieren bevorzugt mit den Stickstoffatomen des Ringsystems und den exozyklischen Aminogruppen der DNA-Basen. Harte Elektrophile bevorzugen als Angriffsorte enolisierbarer Sauerstoffatome der DNA-Basen [Greim, 2017]. Abbildung 02 enthält eine Übersicht über charakteristische Angriffspunkte von Alkylanzien an den nukleophilen Zentren einzelner DNA-Basen. Aufgrund der hohen Nucleophilie, sowie der sterisch gut zugänglichen Position des *N7*-Atoms des Guanins, greifen chemisch reaktive Verbindungen bevorzugt am *N7*-Atom dieser Purin-Base an [Gates, 2009].

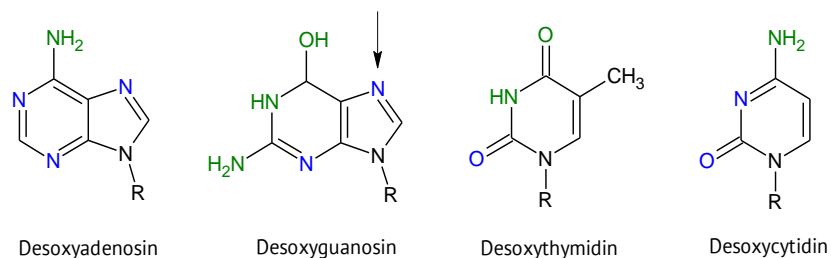
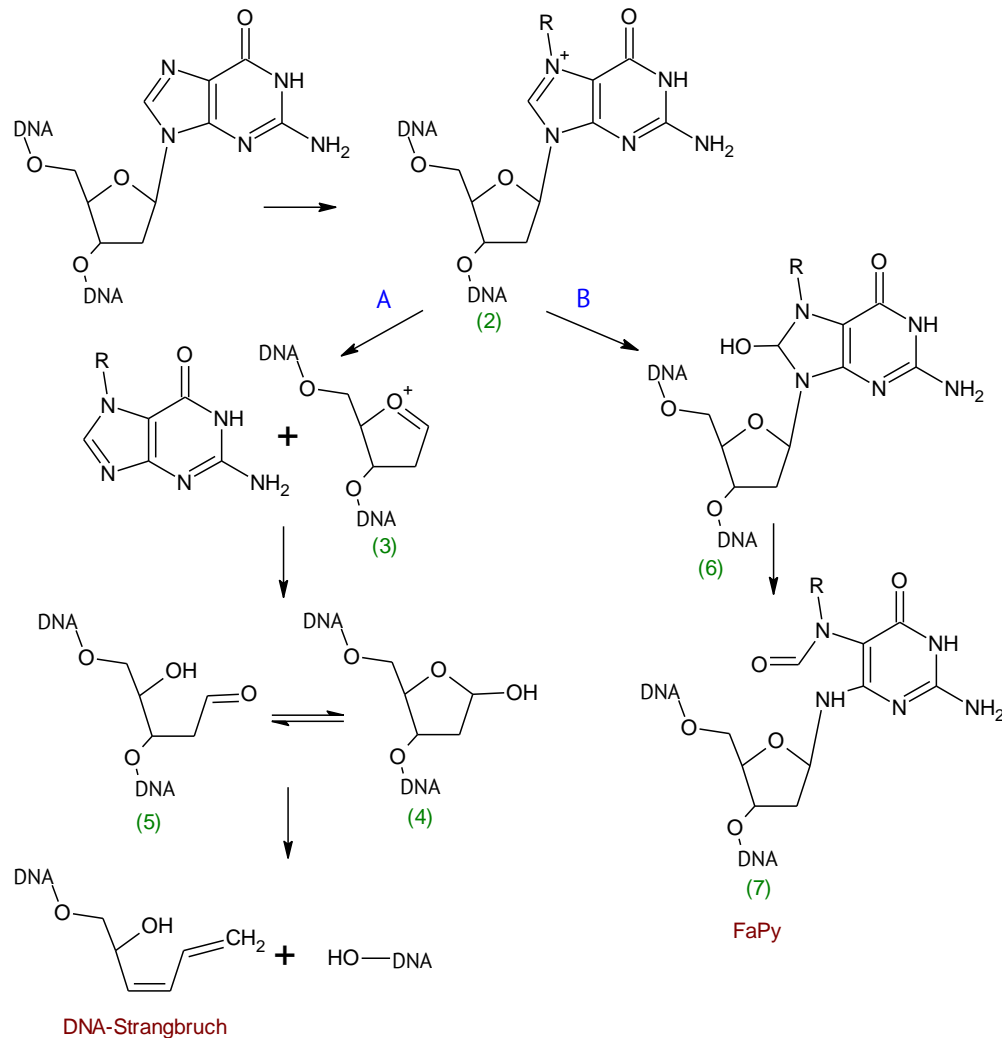


Abbildung 02: Angriffspunkte von Alkylanzien in DNA-Basen. Mit R = Desoxyribose. Ein Angriff von alkylierenden Agenzien an grün markierten Atomen führt zu stabilen DNA-Addukten, während Angriffe an blau markierten Atomen zu instabilen DNA-Addukten führen. Mit einem Pfeil gekennzeichnet: *N7*-Atom des 2'-Desoxyguanosins [mod. nach Gates, 2009].

Wie in Abbildung 02 erkenntlich ist, hängt die Stabilität der gebildeten DNA-Addukte vom Angriffspunkt des Alkylanz ab. Nicht immer werden stabile Addukte gebildet. Zu den instabilen DNA-Addukten zählen *N7*- und *N3*- Addukte der Purinbasen Guanin und Adenin. Die Untersuchung des *N7*-Glycidamid-Guanins (*N7*-GA-Gua), einem DNA-Addukt aus GA und 2'-Desoxyguanosin (dG), stand im Fokus dieser Arbeit. Die Instabilität von *N7*-Guanin-Addukten geht mit der Bildung von sogenannten apurinischen Stellen einher. Als apurinische Stellen, werden Bereiche der DNA bezeichnet, in denen Purin-Basen fehlen. Bereiche der DNA, in welcher Pyrin- und Pyrimidin-Basen fehlen, werden als apurinische bzw. apyrimidinische Stellen (AP-Läsion) bezeichnet.

DNA-Strangbrüche können in Folge von AP-Stellen auftreten. Die Bildung apurinischer Stellen und die damit möglicherweise einhergehenden Folgereaktionen sind in Schema 01 aufgezeigt.



Schema 01: Mögliche DNA-Schäden in Folge von DNA-Addukten am *N7*-Atom des 2'-Desoxyguanosins (dG). Pfad (A) führt zur Bildung von DNA-Strangbrüchen (DNA-SB), während Pfad (B) zur Entstehung von Formamidopyridin-Addukten (FAPy-Addukten) beiträgt. Mit R: elektrophiles Teilchen, welches an die DNA-Base kovalent bindet. Pfad A: Bei Reaktion von Alkylanzien mit dG entsteht eine positive Formalladung am *N7*-Atom der Base (2). Ausgehend von (2), entsteht durch spontane Depurinierung ein Oxocarbeniumion (3) und anschließend mittels Hydrolyse ein Acetal (4), welches im Gleichgewicht als Aldehyd (5) vorliegt. Ausgehend von der dabei entstehenden AP-Stelle erfolgt mittels Elimination die Bildung eines DNA-SB. Pfad B: Nach Hydroxylierung am C8-Atom (6) der *N7* alkylierten Verbindung, in einem weiteren Schritt erfolgt eine Ringöffnung, wodurch eine Formamidopyridin-Stelle (FAPy) (7) entsteht [mod. nach Gates, 2009].

Apurinische Stellen können entstehen, wenn Alkylanzien am *N7*-Atom des dG angreifen. Dabei bildet sich am *N7*-Atom der DNA-Base eine positive Formalladung, welche zur Destabilisierung der glykosidischen Bindung beiträgt. Durch darauffolgende spontane Depurinierung und Hydrolyse des gebildeten Oxocarbeniumions, kommt es zur Bildung einer apurinischen Stelle. In Folge weiterer Reaktionen können Strangbrüche auftreten. Neben der Bildung von zytotoxisch und mutagen wirkenden AP-Stellen, ist die Entstehung von sogenannten Formamidopyridin-Desoxyguanosin-Addukten möglich. Durch Hydroxylierung am *C8*-Atom und Öffnung des Imidazolrings entstehen am *N5*-Atom ringeöffnete Formamidopyridin-Addukte (FAPy). Der Bildungsmechanismus ist in Schema 01 aufgezeigt [Gates, 2009].

Während erst die aus den instabilen *N7*-Guanin-Addukten gebildeten Produkte einen DNA-Schaden induzieren können, ist dies nicht bei stabilen DNA-Addukten der Fall. Stabile DNA-Addukte, welche strukturelle Veränderungen an Wasserstoffbrücken ausbildenden Regionen aufweisen, wirken miskodierend und hochmutagen. Die Bildung von *O*⁶-Methylguanin zählt zu den DNA-Läsionen mit dem höchsten zytotoxischen und mutagenen Potential [Marquardt *et al.*, 2013]. Gemäß den Chargaff-Regeln paart Guanin mit Cytosin unter Bildung von drei Wasserstoffbrücken. Eine Methylierung am *O*⁶-Atom der Purin-Base verhindert die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke, sodass Guanin (G) nicht mehr mit Cytosin (C) stattdessen jedoch mit Thymin (T) paart. Dieser miskodierende Schaden führt zur sogenannten GC AT Transitions-Mutation, welche einen Austausch einer Purinbase gegen eine andere Purinbase zur Folge hat [Tretyakova *et al.*, 2007].

DNA-Addukte nehmen eine Schlüsselrolle im Prozess der Kanzerogenese, dem Prozess der Krebsentstehung, ein. Eine detailliertere Beschreibung der dabei ablaufenden Vorgänge erfolgt in Kapitel 2.3. Nach Bildung eines DNA-Adduktes hat die geschädigte Zelle die Möglichkeit, mittels diverser Mechanismen das Ausmaß des Schadens so gering wie möglich zu halten. Neben multiplen Kontrollmechanismen des DNA-Replikationsapparates, Mechanismen zur Regulation der Zellzyklus-Progression (*checkpoints*, Kontrollpunkte) und diversen DNA-Reparaturmechanismen, kann die Zelle bei zu massiver Schädigung den programmierten Zelltod, die sogenannte Apoptose,

einleiten. Greifen die genannten Kontrollmechanismen nicht und der Schaden bleibt bestehen, können Basenfehlpaarungen, Chromosomenbrüche und Ablesefehler während der DNA-Replikation auftreten. Als Folge einer fehlerhaften Zellteilung können durch Manifestation des Schadens mutierte Zellen entstehen [Efferth, 2006].

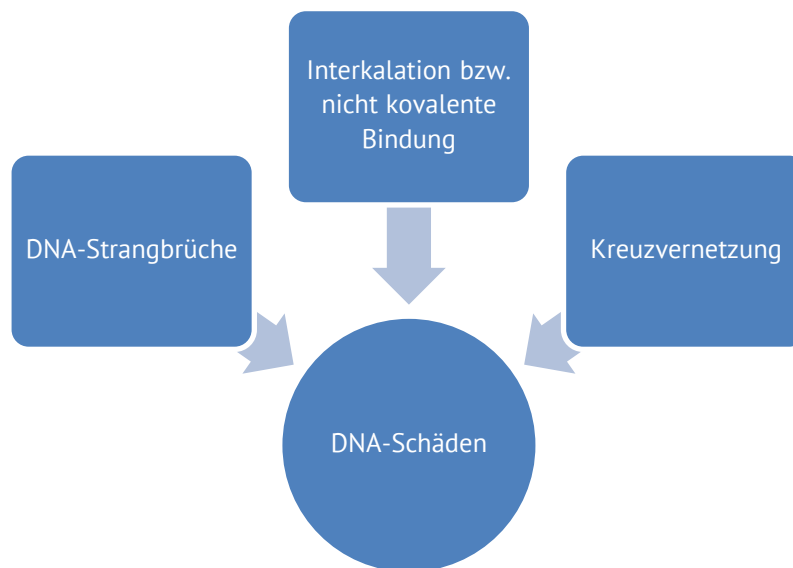


Abbildung 03: Überblick über mögliche (weitere/nicht zuvor im Text genannten) Arten von DNA-Schäden.

Neben DNA-Addukten und AP-Läsionen existieren eine ganze Reihe weiterer Arten von DNA-Schäden. In Abbildung 03 sind diese dargestellt. Während durch AP-Läsionen Einzelstrangbrüche entstehen können, können reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) Doppelstrangbrüche verursachen. Zu den ROS zählen folgende Verbindungen: Superoxidationradikale, Hydroxyradikale, Alkoxyradikale, Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff. Planar aufgebaute Substanzen, wie beispielsweise Ethidiumbromid, können mit der DNA interkalieren, indem diese zwischen DNA-Basen oder an die DNA-Helixwindungen einlagern, ohne dabei kovalent an die DNA zu binden. Die Einlagerung von Substanzen führt zur Veränderung der physikalischen Struktur der DNA, wodurch Replikationsfehler und Leserastermutationen auftreten können. Bifunktionell aufgebaute Alkylanzien können zwei kovalente Bindungen eingehen, wodurch Quervernetzungen zwischen zwei Basen desselben DNA-Stranges (DNA-Intrastrang-Kreuzvernetzung) oder Basen der komplementären Stränge

(DNA-Interstrang-Kreuzvernetzung) auftreten können. Kreuzvernetzungen stellen besonders toxische und mutagene Läsionen dar. Einzel- und Doppelstrangbrüche sind oftmals auf exogene Faktoren wie z. B. ionisierende Strahlung zurückzuführen [Marquardt *et al.*, 2013]. Eine Übersicht über die Häufigkeit verschiedener DNA-Schädigungen ist in Tabelle 01 aufgeführt.

Tabelle 01: Schätzwerte für verschiedene Beispiele endogener Schädigung humaner DNA [Marquardt *et al.*, 2013].

Typ der Schädigung	Schädigung pro Stunde/Zelle
Depyrimidierung	55
Depurinierung	1000
Einzelstrangbrüche	5000
O ⁶ -Methylguanin	130
N ⁷ -Methylguanin	3500

Ein wichtiges Reparatursystem zur Reparatur von AP-Stellen und kleiner Basenmodifikationen, die durch Desaminierung, Oxidierung oder Alkylierung entstanden sind, ist die sogenannte Basenexzisionsreparatur (BER). Auch DNA-Schäden in Form von N⁷-GA-Gua-Addukten werden durch dieses Reparatursystem erkannt und eliminiert. Im ersten Schritt des Reparaturweges erkennen Typ-1-Glykosylasen geschädigte DNA-Basen und eliminieren diese aus dem DNA-Strang mittels Spaltung der N-glykosidischen Bindung, wodurch eine AP-Stelle gebildet wird. Daraufhin schneidet eine AP-Endonuklease an der 5'-Stelle des Zucker-Phosphatrückgrats ein, woraus ein DNA-Strangbruch mit einem freien 3'-OH-Ende und einem Desoxyribose 5'-Phosphat-Ende resultiert. Im nächsten Schritt erfolgt die Entfernung des Desoxyribosephosphatrestes an der 3'-AP-Stelle, induziert durch die DNA-Polymerase β . Im Falle der *Short-Patch*-BER synthetisiert die DNA-Polymerase β das korrekte fehlende Nukleotid und fügt dieses in den DNA-Strang ein. Abschließend verknüpft die DNA-Ligase-III, durch Wiederherstellung der Phosphodiesterase-Bindungen, die einzelnen Nukleotide miteinander. Während beim *Short-Patch*-BER ein einzelnes Nukleotid eingebaut wird, werden bei der *Long-Patch*-BER zwei bis

acht Nukleotide eingebaut. Die DNA-Polymerase β oder δ synthetisiert mehrere Nukleotide über die betroffene AP-Stelle hinweg, während im Anschluss eine *Flap*-Endonuklease die überhängenden gebildeten Oligonukleotide abtrennt. Abschließend erfolgt die Schließung des Strangbruchs mittels Ligase-I [Krokan und Bjørås, 2013]. Für die unterschiedlichen Arten von DNA-Schäden existieren unterschiedliche Arten von Reparatursystemen. Tabelle 02 enthält eine Übersicht über verschiedener DNA-Läsionen und den dazugehörigen Reparaturmechanismen.

Tabelle 02: Übersicht über verschiedene DNA-Reparatursysteme und Beispiele für Läsionen [Vohr, 2010].

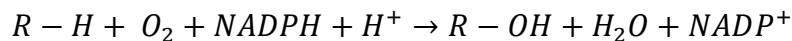
Reparatursystem	Beispiel für Läsion	Mechanismus
Basenexzisionsreparatur (BER)	Oxidierete und alkylierte Basen Einzelstrangbrüche AP-Stellen	Erkennung und Entfernung geschädigter Basen mit Neusynthese der entfernten Stelle anhand der Informationen im komplementären Strang.
Nukleotidexzisionsreparatur (NER)	Sperrige Addukte (bulky adducts) Quervernetzungen	DNA-Bereich wird entfernt (ca. 30 Nukleotide) und anhand der Informationen des komplementären Stranges der geschädigte Strang neu synthetisiert.
Mismatchreparatur	GT-Basenfehlpaarung Insertionen und Deletionen	Entfernung von Basenfehlpaarungen, ähnlich BER und NER
Rekombinationsreparatur	Doppelstrangbrüche Inter-Strang-Vernetzungen	Genetische Information des homologen Chromosoms dient als Vorlage bzw. beide Enden des DSB werden vereinigt.
Direkte Reversion	Methylierung am O ⁶ -Guanin	Methylguanin-Methyltransferase macht die Modifikation der Base rückgängig.

2.2 Biotransformation von Fremdstoffen

Fremdstoffe können über verschiedene Wege, je nach Aggregatzustand oder der chemischen Eigenschaft der Verbindung oder der Applikationsart, in den menschlichen Körper aufgenommen werden. Gase gelangen über den Atemtrakt in den Körper, feste oder flüssige Stoffe (z. B. Nahrung) über den Magen-Darmtrakt und lipophile Stoffe (z. B. Salben) *via* Diffusion durch die Haut. Durch die Haut oder den Atemtrakt resorbierte Stoffe können direkt in den Blutkreislauf übergehen, während gastrointestinal aufgenommene Stoffe der Leber zugeführt werden. In der Leber findet die Metabolisierung von Substanzen statt, sodass die Leber eine entscheidende Rolle im Fremdstoffmetabolismus einnimmt. Das Verhalten von Fremdstoffen im Organismus, beginnend mit Stoffaufnahme anschließender Metabolisierung und abschließender Ausscheidung, wird als Toxikokinetik bezeichnet. Je nach Ausscheidung der Metabolite wird in eine renalen Exkretion (über Niere), eine intestinale Exkretion (über Darm) oder eine biliäre Exkretion (über Galle) differenziert [Marquardt *et al.*, 2013; Eisenbrand und Metzler, 2005]. Die Aufnahme von Stoffen bis hin zur Ausscheidung wird als *ADME* bezeichnet. Der Buchstabe A steht dabei für *adsorption* (Aufnahme; Aufnahme des Stoffes in die Blutbahn), D für *distribution* (Verteilung; Verteilung des Stoffes in unterschiedliche Körperkompartimente), M für *metabolism* (Metabolismus; Verstoffwechslung der Substanz) und E für *elimination* (Ausscheidung; Ausscheidung aus dem Körper) [Greim und Sydner, 2008].

Die Metabolisierung von Fremdstoffen oder körpereigenen Stoffen ist immer auf ein wiederkehrendes Basisschema, bestehend aus einer Phase-I-Reaktion und einer darauffolgenden Phase-II-Reaktion, zurückzuführen. Ziel dieser Metabolisierung ist es, den hydrophilen Charakter des Moleküls zu erhöhen, um dieses über die Niere ausscheiden zu können. Hydrophobe Stoffe können schlecht von der Niere eliminiert werden. Phase-I-Reaktionen stellen sogenannte Funktionalisierungsreaktionen dar, in welchen funktionelle Gruppen in das Molekül eingebracht werden. Oftmals handelt es sich bei den stattfindenden Umwandlungsreaktionen um geringfügige Änderungen im Molekül, welche notwendig sind, um Phase-II einzuleiten. Eine wichtige

Schlüsselrolle im Phase-I-Mechanismus nehmen die Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen, kurz CYPs, genannt ein. CYPs sind ubiquitär, typischerweise in Mikrosomen lebender Organismen vorhanden [Marquardt *et al.*, 2013; Eisenbrand und Metzler, 2005; Vohr, 2010]. Die höchsten Gehalte an CYP-Enzymen sind in der Leber zu finden, welche ca. 90–95 % der gesamten CYPs enthält. Der Anteil an CYP2E1, welches für die Metabolisierung des für diese Arbeit wichtigen AA verantwortlich ist, beträgt ca. 10 % [Aktories *et al.*, 2017].



Schema 02: Allgemeine, durch Cytochrom P450-Monooxygenasen katalysierte Reaktion. Mit: R als Rest, welcher oxidiert bzw. hydroxyliert wird.

Die von den Monooxygenasen katalysierte Reaktion ist in Schema 02 dargestellt. Unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff werden aromatische oder aliphatische Verbindungen oxidiert, wobei ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen wird. Das zweite Sauerstoffatom wird zu Wasser reduziert [Aktories *et al.*, 2017]. Beispielsweise katalysieren Monooxygenasen mittels Oxidationsreaktion, die Übertragung eines Sauerstoffatoms in das Molekül. Phase-I-Reaktionen führen in der Regel zu hydrophileren Verbindungen. Zu den möglichen Reaktionen zählen: aliphatische oder aromatische Hydroxylierungen, *N*-Hydroxylierungen, *N*- und/oder *S*-Oxidationen, Epoxidierungen aromatischer oder olefinischer Doppelbindungen, sowie Desalkylierungen und Desaminierungen. Nicht immer wird durch Aktivität der CYP-Enzyme eine weniger toxische bzw. weniger reaktive Verbindung gebildet. So wird beispielsweise AA unter Beteiligung von CYP2E1 zu dem toxisch wirkenden GA umgesetzt. Als reaktives Elektrophil (ultimales Kanzerogen) kann dieses an die DNA binden, wodurch die bereits in Kapitel 2.1 beschriebenen DNA-Addukte gebildet werden können. Neben CYP-Enzymen gibt es eine ganze Reihe von weiteren Enzymen, welche an Phase-I beteiligt sind. Hierzu zählen diverse Dehydrogenasen, verschiedene Reduktasen, unterschiedliche Oxidasen, Esterasen und Epoxidhydrolasen [Marquardt *et al.*, 2013; Eisenbrand und Metzler, 2005; Vohr, 2010]. Epoxide werden mittels Epoxidhydrolase abgebaut. Diese Reaktion stellt eine besondere Art der Hydrolyse dar und ist eher als Hydratisierung zu betrachten, da es nach erfolgter Reaktion zu keiner Spaltung des Moleküls kommt [Aktories *et al.*, 2017].

2. Theorie

Im Anschluss an die Phase-I-Reaktion erfolgt die sogenannte Phase-II-Reaktion. Zu den typischen Phase-II-Reaktionen zählen Konjugationsreaktionen wie beispielsweise: Glucuronidierung, Acetylierung, Sulfatierung und Glutathion-Konjugation (GSH) [Vohr, 2010; Eisenbrand und Metzler, 2005]. Eine Übersicht möglicher Phase-I-, sowie Phase-II-Enzyme ist in Tabelle 03 aufgeführt.

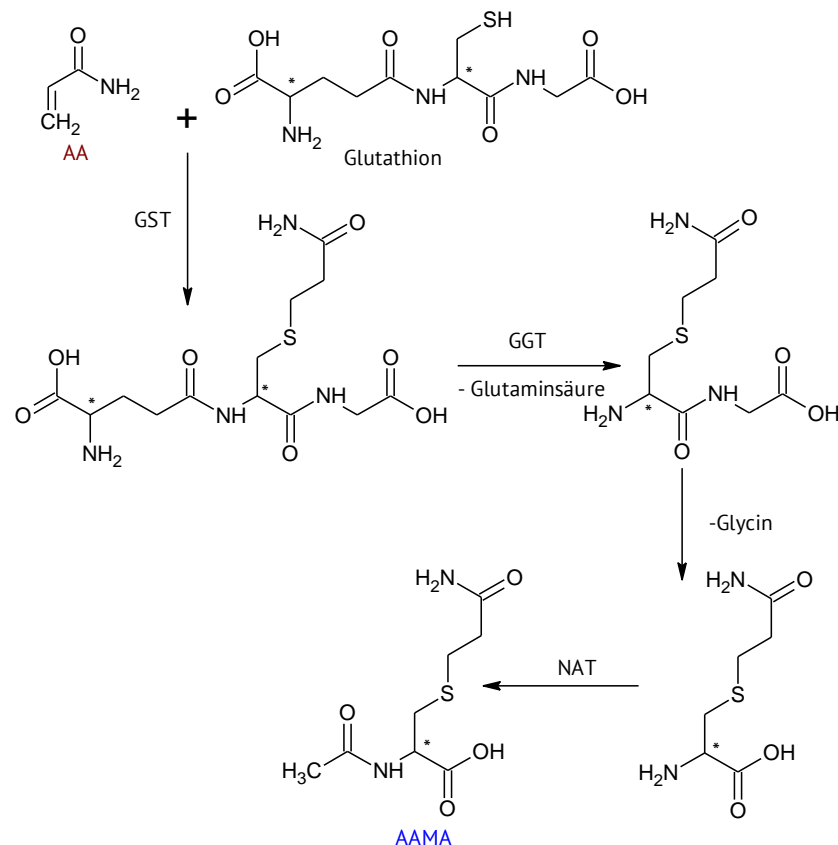
Tabelle 03: Beispiele für mögliche am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Phase-I- und Phase-II-Enzyme [Vohr, 2010].

Phase-I-Enzyme	Phase-II-Enzyme
Cytochrom P450-Monooxygenasen (CYP)	Sulfotransferasen (SULT)
Flavin-abhängige Monooxygenasen (FMO)	Acetyltransferasen (NAT)
Monoaminoxidasen	Glutathion-S-Transferasen (GST)
Alkoholdehydrogenase	UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT)
Aldehyddehydrogenase	Methyltransferasen
Esterasen	Aminoacyltransferasen
Epoxidhydrolasen	

Charakteristisch für Phase-II-Reaktionen ist die Konjugation von Stoffen mit polaren Stoffen des Intermediärstoffwechsels, um so den hydrophilen Charakter des Moleküls weiter zu erhöhen und in ein leichter ausscheidbares Molekül umzuwandeln [Vohr, 2010; Eisenbrand und Metzler, 2005]. Auch durch Phase-II können ultimale Kanzerogene gebildet werden. Ein Beispiel hierfür stellt die Sulfonierung dar, bei welcher die Abspaltung der Sulfatgruppe eines Moleküls die Bildung von Carbenium oder Nitrenium-Ionen begünstigt [Glatt *et al.*, 2000].

Von besonderer Bedeutung für den Phase-II-Metabolismus des AA werden Gluthations-S-Transferasen (GST) betrachtet, welche mengenmäßig in den Hepatozyten am stärksten zu gebildet werden. GST katalysieren die Konjugation elektrophiler Verbindungen mit dem Tripeptid GSH. Die bei der Reaktion entstehenden GSH-Konjugate unterliegen weiteren Reaktionen, in welchen der Peptidanteil des Moleküls verändert wird und letztlich Mercaptursäuren gebildet

werden. Dieser Vorgang kann in drei Abschnitte unterteilt werden. Der erste Schritt stellt die Abspaltung der Glutaminsäure, katalysiert durch das Enzym γ -Glutamyltranspeptidase (GGT), dar. In einem weiteren Schritt erfolgt die Abspaltung der Aminosäure Glycin, katalysiert durch das Enzym Dipeptidase. Als letzter Schritt erfolgt die Abspaltung der Aminogruppe des Cysteins unter Beteiligung einer *N*-Acetyltransferase (NAT) [Aktories *et al.*, 2017; Dudo-Chodak *et al.*, 2016]. Die Bildung eines Konjugats aus GSH und AA, sowie der Abbau zur entsprechenden Mercaptursäure *N*-Acetyl-S-(2-Carbamoylethyl)-L-cystein (AAMA) ist in Schema 03 dargestellt.



Schema 03: Bildung der Mercaptursäure *N*-Acetyl-S-(2-Carbamoylethyl)-cystein (AAMA) aus AA und GSH. Mit GSH: Glutathion, GST: Glutathion-S-Transferase, GGT: γ -Glutamyltranspeptidase und NAT: *N*-Acetyltransferase [mod. nach Duda-Chodak *et al.*, 2016].

2.3 Kanzerogenese

Die Induktion von benignen (gutartigen) und malignen (bösartigen) Tumoren durch exogene (Chemikalien, energiereiche Strahlung, Viren) und endogene Faktoren (genetische Präposition und Lebensstilfaktoren: Rauchen, Übergewicht etc.) wird als Kanzerogenese (auch Karzinogenese) bezeichnet. Ein wesentlicher Unterschied zwischen benignen und malignen Tumoren besteht darin, dass der maligne Tumor invasiv wächst. Weitere Unterschiede sind in Tabelle 04 aufgeführt.

Tabelle 04: Dignitätsbeurteilung und Differenzierung von Tumoren [Kumar *et al.*, 2017].

Kriterium	Benigner Tumor	Maligner Tumor
Differenzierungsgrad	Gut differenziert	Gut, mäßig oder gering
Anaplasie	Gewebetypische Struktur	Differenziert, oft atypischer Aufbau
Wachstumsrate	Langsam progredient, Regression möglich, Mitosen selten	Unterschiedlich, oft zahlreiche atypische Mitosen
Metastasierung	Keine	Häufig in Abhängigkeit von Stadium und Differenzierungsgrad des Tumors
Lokale Invasion	Kohäsiv, expansiv, glatt, begrenzt, umkapselt	Lokal, infiltrativ, destruktiv, dissoziierend

Die Kanzerogenese stellt einen sehr komplexen mehrstufigen und meist langjährigen Prozess dar, welcher bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Das erste Modellsystem, das zur Beschreibung der Tumorentwicklung verwendet wurde und aus zwei Stufen bestand, ist auf Tierstudien von Berenblum und Shubik (1947) zurückzuführen [Berenblum und Shubik, 1947]. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigten, dass für die Krebsentstehung zwei aufeinander folgende Prozesse (Initiation und Promotion), entscheidend sind. Später wurde das Modellsystem um einen

weiteren Schritt (Progression) von Boutwell (1964) erweitert [Boutwell, 1994]. Zusammenfassend besteht das Drei-Stufen-Modellsystem der Kanzerogenese, wie in Abbildung 04 dargestellt aus den Schritten: Initiation, Promotion und Progression.



Abbildung 04: Fließschema des Drei-Stufen-Modellsystems.

Im ersten Schritt, der Initiation, werden Zellen mit geschädigter DNA erzeugt. Zu den möglichen Folgen solcher DNA-Schädigungen zählen Mutationen und Replikationsfehler. Liegt der Schaden innerhalb kodierender Bereiche (z. B. für Zellwachstum und Differenzierung), besteht die Gefahr der bösartigen Entartung der Zelle [Efferth, 2006]. Zu den Initiatoren zählen zum einen Verbindungen, welche selbst chemisch reaktiv und damit zur Initiation führen, zum anderen, Verbindungen, welche in Folge des Fremdstoffmetabolismus gebildet werden (ultimales Kanzerogen). Typische Initiatoren sind beispielsweise: AA, Strahlung (UVA und UVB), Dimethylnitrosamine, heterozyklische Amine, Aflatoxine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe [Aktories *et al.*, 2017]. Initiierte Zellen zeichnen sich zunächst durch nicht maligne Veränderungen (Präneoplasie) aus und sind phänotypisch nicht (oder nur wenig) von gesunden Zellen differenzierbar [Ganten und Ruckpaul, 2012]. Das Wachstum von solchen Zellen wird durch umliegendes Gewebe kontrolliert [Greim, 2017]. In Hinblick auf die chemische Kanzerogenese entstehen initiierte Zellen, wenn elektrophile Agentien, wie beispielsweise Epoxide, zu denen auch GA zugeordnet wird, mit Nukleophilen (z. B. DNA) reagieren und in dessen Folge DNA-Addukte gebildet werden. Wird die Veränderung innerhalb der DNA nicht erkannt und nicht mittels diverser Reparaturmechanismen repariert, so kann sich der Schaden bei Mutation der Zelle und nachfolgenden Zellteilungen irreversibel manifestieren. Genotoxische Kanzerogene, welche einen DNA-Schaden mittels DNA-Adduktbildung induzieren können, lassen sich in zwei Klassen, entsprechend des Wirkmechanismus einteilen. Alkylantien, sind der ersten Gruppe, den sogenannten direkten Kanzerogenen zuzuordnen. Verbindungen dieser Kategorie können auch ohne metabolische Aktivierung wirken, indem sie mit der DNA reagieren. Im

Gegenzug dazu müssen sekundäre Kanzerogene (Prokanzerogene), zu reaktiven elektrophilen Verbindungen, den ultimalen Kanzerogenen, umgesetzt werden [Eisenbrand und Metzler, 2005; Greim, 2017]. Im zweiten Schritt der Kanzerogese erfolgt die Promotion. Nicht gentoxische Kanzerogene sind in der Lage, einen DNA-Schaden zu induzieren, indem sie auf initiierte Zellen tumorpromovierend wirken. Die Promotion stellt einen reversiblen Prozess dar, in welchem bereits initiierte Zellen zum Wachstum angeregt werden, wodurch die Tumorbildung stimuliert wird. Infolge immer wiederkehrender Wachstumsstimulation, sowie Zellproliferation entsteht eine präneoplastische Zelle, welche eine Karzinomvorstufe darstellt. Dieser Prozess erstreckt sich über einen längeren Zeitraum und ist durch eine Akkumulation weiterer Veränderungen gekennzeichnet, welche zu einem Fortschreiten sowie einem Kontrollverlust der mutierten Zelle beitragen. Stoffe, die die Promotion fördern, werden Tumorpromotoren genannt. Oftmals weisen diese Verbindungen induzierende und inflammatorische Wirkungen auf. Beispiele hierfür sind unter anderem chronische Entzündungen, welche mit Niedergang des Gewebes und Förderung der Promotion einhergehen. Promotoren allein wirken nicht kanzerogen, da sie auf initiierte Zellen angewiesen sind [Aktories *et al.*, 2017]. Als Beispiele dieser Klasse sind folgende Verbindungen zu nennen: Phorbol ester; Phenobarbital, Dioxine und weitere. Die kanzerogene Wirkung dieser Gruppe ist oftmals erst nach wiederholter Applikation oder oberhalb der Schwellendosis ersichtlich. Anders verhält es sich bei den gentoxischen Kanzerogenen (Initiatoren), bei welchen keine Schwellendosis postuliert werden kann. Eine einmalige Applikation (konzentrations-unabhängig) kann bereits zur Ausbildung eines DNA-Schadens führen [Henderson *et al.*, 2000; Jenkins *et al.*, 2010]. Im *Worst case scenario* bedeutet dies, dass ein einziges Molekül eines gentoxischen Kanzerogens ausreicht, um die DNA der Zelle zu schädigen. Neuere Studien stehen dem Schwellenwert-Konzept kritisch gegenüber [Doak *et al.*, 2007; Doak *et al.*, 2008; Jenkins *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2016]. So deuten die Ergebnisse von Jenkins und Kollegen darauf hin, dass eine Wirkschwelle für gentoxische Substanzen existiert. Lag die Testkonzentration unterhalb der Wirkschwelle, konnte die Manifestation des DNA-Schadens mittels Reparaturenzyme verhindert werden [Jenkins *et al.*, 2010]. Das Zusammenwirken aus Initiation und Promotion ist in Abbildung 05 dargestellt.

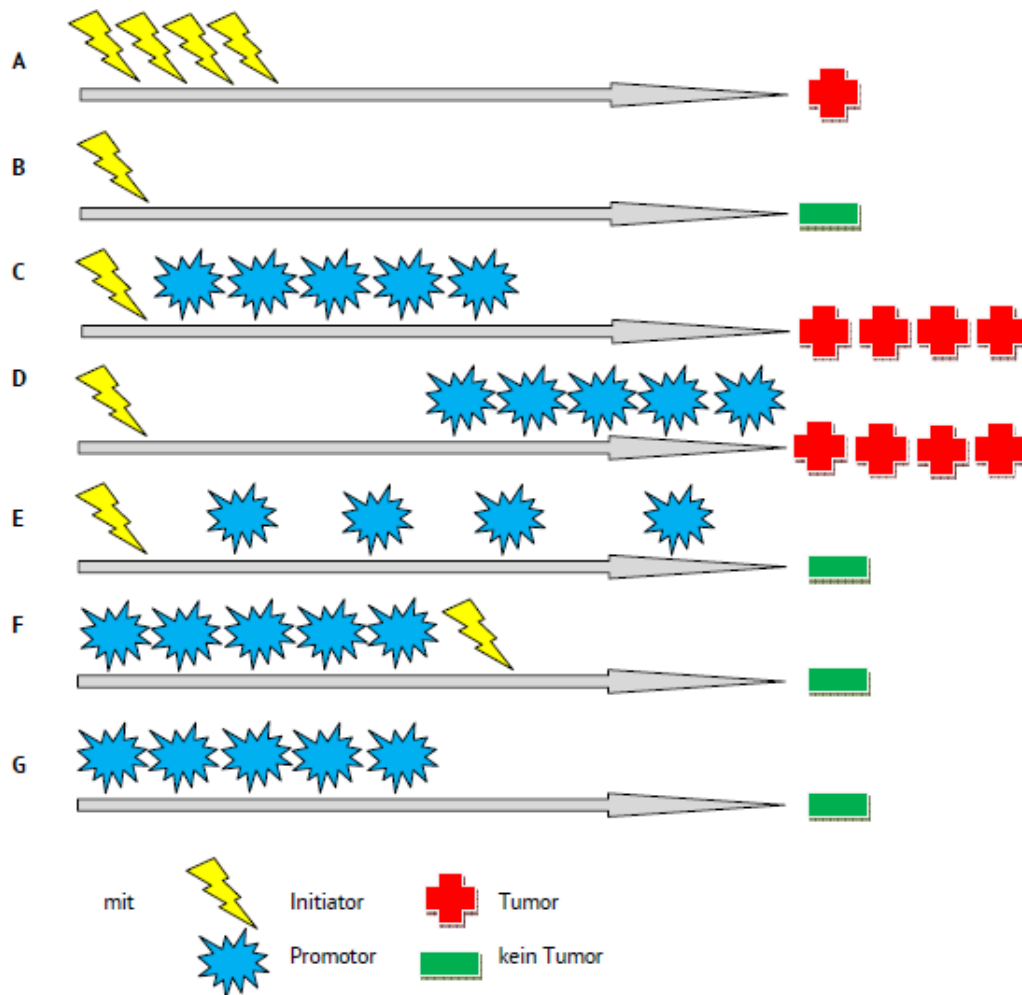


Abbildung 05: Zusammenhang zwischen Initiatoren und Promotoren. Mit A: Induktion von Tumoren nach ausreichender und mehrmaliger Applikation des Initiators ohne Applikation eines Promotors. B: geringe (einmalige) Dosis des Initiators führt zu keiner Tumorentstehung. C und D: Verabreichung von Tumorinduktor und Tumorpromotor führt zur Tumorbildung. E: Zu große Intervalle zwischen Applikation des Promotors führen zu keiner Tumorentstehung. F: Applikation des Initiators in Folge mehrmaliger Applikation des Promotors führt nicht zur Tumorbildung. G: mehrmalige Applikation des Promotors ohne zusätzliche Gabe eines Initiators führt zu keiner Tumorentstehung [mod. nach Aktories *et al.*, 2017].

Der letzte (irreversible) Schritt innerhalb der Kanzerogenese wird als Progression bezeichnet. Dieser ist durch maligne Transformation in einer präneoplastischen Läsion zum malignen Tumor gekennzeichnet. Die Umwandlung zur malignen Tumorzelle erfordert eine Akkumulation weiterer Ereignisse. Mutationen tragen dabei zu weiteren Veränderungen hin zur malignen Tumorzelle bei. Charakteristisch für maligne Tumorzellen ist ein klonales Wachstum und deren Fähigkeit zur Invasion

und Metastasierung [Schubert, 2014]. Die Umwandlung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle, beginnend mit der Initiation ist in Abbildung 06 dargestellt.



Abbildung 06: Transformation einer normalen Zelle in eine maligne Zelle im Verlauf der Kanzerogenese, basierend auf dem Drei-Stufen-Modellsystem. Mit A: Initiation, B: Promotion und C: Progression [mod. nach Schubert, 2014].

Neben dem klassischen Mehrstufenmodell der Kanzerogenese hat sich ein weiteres Modell („*Cancer hallmarks*“) der Kanzerogenese entwickelt und etabliert. Anders als im klassischen Mehrstufenmodell werden epigenetische Faktoren mitberücksichtigt. Im Jahre 2000 beschrieben Hanahan und Weinberg (2000) eine Vielzahl von Eigenschaften eines Tumors aus molekularbiologischer Sicht. Demnach zeichnen sich Tumorzellen durch sechs verschiedene Kompetenzen aus. Eine Auflistung der einzelnen Fähigkeiten ist in Abbildung 07 dargestellt. Während fünf der genannten Eigenschaften sowohl für benigne als auch maligne Tumore zutreffen, ist eine Kompetenz, die Fähigkeit zur Ausbildung von Metastasen, ausschließlich für maligne Tumore kennzeichnend [Hanahan und Weinberg, 2000]. 2011 wurde das Konzept erweitert und weitere Eigenschaften von Krebszellen, welche charakteristisch für vollständig entartete Krebszellen sind, dem bereits bestehenden Modell hinzugefügt [Hanahan und Weinberg, 2011]. Diese erweiterten Eigenschaften sind ebenfalls in Abbildung 07 ausgeführt.

Unempfindlichkeit gegenüber Wachstums-inhibitorischen Signalen

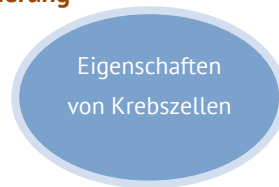
Invasives Wachstum und Metastasierung

Resistenz gegenüber Apoptose

Stimulation der Angiogenese

Immortalisierung

Selbstversorgung mit Wachstumssignalen



Umgehen des Immunsystems

Förderung von Entzündungsreaktionen

Genom Instabilität und erhöhte Mutationsrate

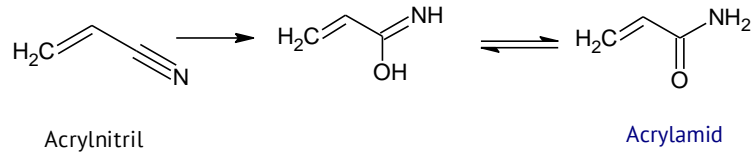
Veränderung des zellulären Energiestoffwechsels

Abbildung 07: Charakteristika von Krebszellen entsprechend dem Modell nach Hanahan und Weinberg (2000 und 2011). Braun dargestellt sind die im Jahre 2000 beschriebenen Eigenschaften von Krebszellen. Grün dargestellt sind weitere Faktoren, welche 2011 dem Modell hinzugefügt wurden [Hanahan und Weinberg, 2000; Hanahan und Weinberg, 2011].

Das klassische Mehrstufenmodell der Kanzerogenese stellt ein lineares Modellsystem dar. Im Gegenzug dazu handelt es sich bei dem von Hanahan und Weinberg (2011) beschriebenen Modell um ein kombinatorisches Modellsystem [Hanahan und Weinberg, 2011]. Bereits im ursprünglich entwickelten Modell, bestehend aus sechs Eigenschaften, ist die Reihenfolge der einzelnen Eigenschaften beliebig. Die Reihenfolge folgt einer von fünf möglichen Sequenzen [Hanahan und Weinberg, 2000]. Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Sequenzen ist jedoch festzustellen, dass gewisse Charakteristika von Krebszellen, frühe Ereignisse innerhalb der Kanzerogenese darstellen, während andere Zelleigenschaften späte Ereignisse repräsentieren. Die Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, sowie die Unempfindlichkeit gegenüber Wachstums-inhibitorischen Signalen, sind typische Fähigkeiten von Tumorzellen zu Beginn der Kanzerogenese. Die Fähigkeit in andere Gewebe einzuwachsen (invasives Wachstum), sowie die Bildung von Metastasen (Metastasierung), welche charakteristisch für maligne Tumorzellen sind, erwerben Krebszellen gegen Ende der Kanzerogenese. Auch im Mehrstufenmodell entwickeln Zellen diese Fähigkeit erst innerhalb der Progression und damit im letzten Teilschritt des Modellsystems.

2.4 Acrylamid

2.4.1 Allgemeines



Schema 04: Vereinfachte Darstellung der chemischen Synthese von AA.

Acrylamid (2-Propenamid; CAS#79-06-1; Summenformel $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$; AA) ist eine α ,- β ungesättigte aliphatische Carbonylverbindung, die aufgrund ihrer Amidstruktur der chemischen Gruppe der Amide zuzuordnen ist. Es handelt sich bei der Verbindung um einen bei Raumtemperatur (RT) weißen geruchlosen kristallinen Feststoff. Die chemische Synthese erfolgt wie in Schema 04 dargestellt, durch Hydratation von Acrylnitril in Anwesenheit von Kupferkatalysatoren. Physikalisch-chemische Eigenschaften der Substanz AA sind in Tabelle 05 aufgeführt [IFA, 2017].

Tabelle 05: Physikalisch-chemische Eigenschaften von AA [IFA, 2017].

Physikalisch-chemische Größe	Wert
Molekulargewicht	71,078 g/mol
Dichte	1,13 g/cm ³ bei 20 °C
Schmelzpunkt	84–86 °C
Siedepunkt	125 °C bei 33,3 hPa
Dampfdruck	0,9 PA bei 25 °C
Wasserlöslichkeit	2040 g/l bei 25 °C

2.4.2 Exposition des Menschen

Als Industriechemikalie wird AA hauptsächlich zur Herstellung von (Co)polymeren u. a. für die Papier-, Farben- und Zementindustrie, aber auch in der Abwasseraufarbeitung als Flockungsmittel, eingesetzt.

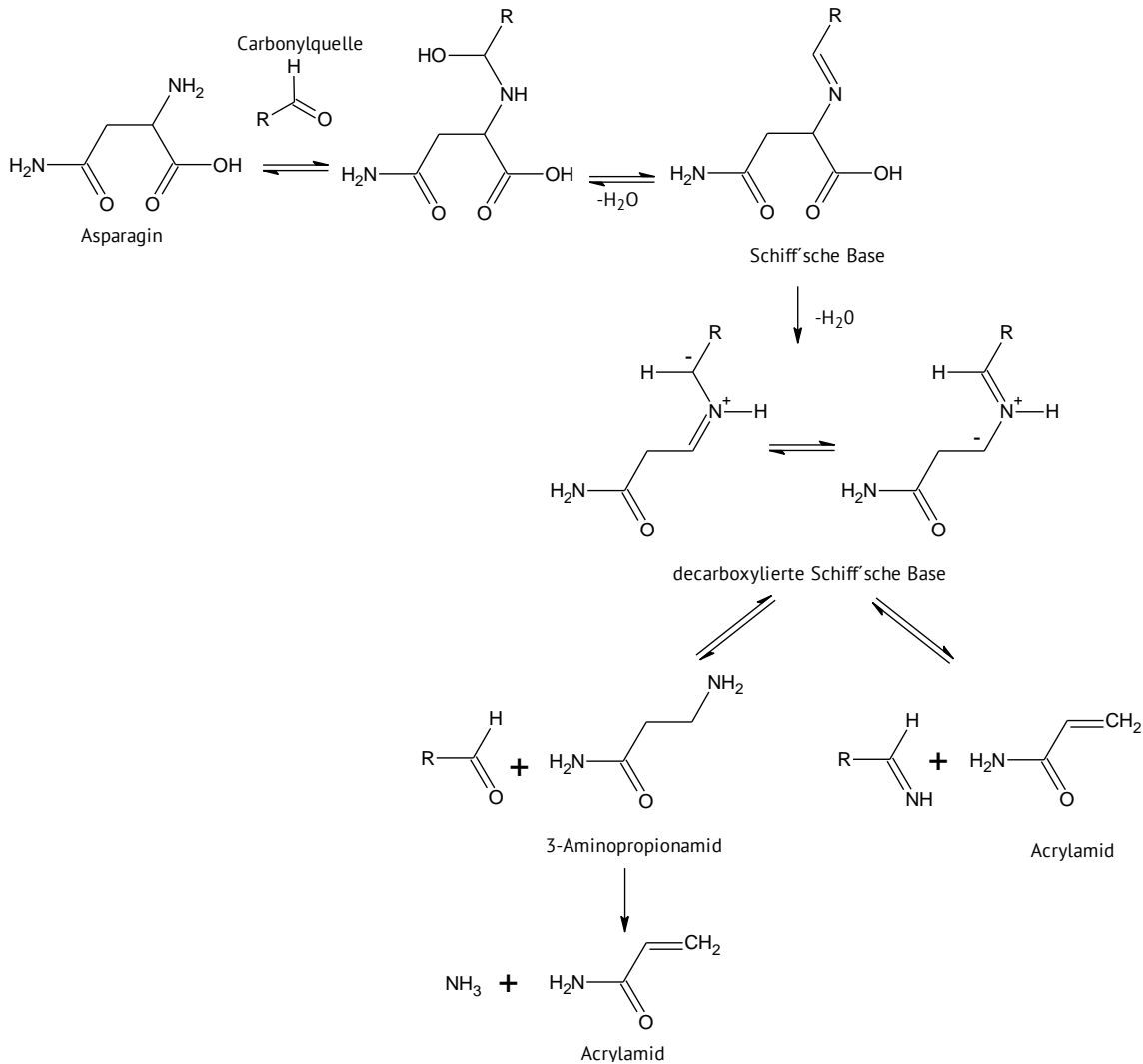
1997 wurde ein AA-haltiges Polymer als Dichtungsmittel zur Versiegelung von undichten Stellen in einem schwedischen Eisenbahntunnel eingesetzt. Unvollständig polymerisiertes AA gelang ins Grundwasser und hatte ein vermehrtes Fischsterben zur Folge. Darüber hinaus konnten neurologische Störungen bei Rindern, die mit AA-kontaminiertes Wasser getrunken hatten, beobachtet. Die Blut-Untersuchung, der beim Bau des Tunnels beteiligten Arbeiter auf Hämoglobin-Addukte (Hb), ergab eine starke AA-Belastung der Arbeiter. Darüber hinaus konnte auch in der Kontrollgruppe, bestehend aus nicht exponierten Personen und Nichtrauchern, Hb-Addukte im Blut nachgewiesen und damit eine mögliche AA-Hintergrundbeobachtung festgestellt werden [Hagmar *et al.*, 2001]. Diese Beobachtung deckt sich mit vorhergehender Studie von Bergmark (1997), in welcher selbst in der Nichtrauchergruppe eine Hintergrundbelastung detektiert werden konnte, weshalb eine endogene oder alimentäre Exposition für möglich gehalten wurde. Als Untersuchungsmatrix wurde das Blut von Laborarbeitern, welche durch ihre Tätigkeit Umgang mit Polyacrylamid-haltigen Gelen hatten, sowie Rauchern und Nichtrauchern untersucht. Die Gehalte an Hämoglobin-Addukten lagen in der Arbeitergruppe bei 54 pmol/g Hb, bei der Nichtraucher-Gruppe bei 31 pmol/g Hb und bei der Raucher-Gruppe bei 116 pmol/g Hb [Bergmark *et al.*, 1997]. (Tabak-)Rauchen stellt eine wesentliche Expositionsquelle für AA dar. Der Gehalt des durch Pyrolyse entstehenden AA im Hauptstrom von Zigaretten liegt bei 1100–2340 ng/Zigarette [Smith *et al.*, 2000] bzw. 455–822,5 ng/Zigarette [Mojska *et al.*, 2016]. Ausgehend von einem starken Raucherverhalten (20 Zigaretten/Tag) und einem Gehalt von 2 µg AA/Zigarette, ergibt sich eine AA-Exposition von 40 µg/Tag. Bei einem 70 kg schweren Erwachsenen entspricht dies einer Dosis von 0,57 µg/kg KG/Tag [SKLM, 2012]. Verglichen damit wird die mittlere tägliche Exposition mit AA durch Lebensmittel (LM) auf 0,4–1,9 µg/kg KG und im 95. Perzentil der Exposition auf 0,6–3,4 µg/kg KG/Tag geschätzt [EFSA, 2015]. Erst 2002 wurde AA erstmals in verschiedenen LM nachgewiesen [Tareke *et al.*, 2002]. Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass vorwiegend hochoerhitzte kohlenhydratreiche LM, wie z. B. Pommes frites, Chips, Knäckebrot, Lebkuchen u. a., besonders viel der Carbonylverbindung enthalten und damit zur Exposition des Menschen beitragen und die beobachteten Hintergrundbelastungen in den Studien erklären [Svensson *et al.*, 2003]. Eine genaue Beschreibung der Bildung und Gehalte von AA im LM erfolgt in Kapitel 2.4.3.

Durch die Verwendung als Industriechemikalie kann AA in Gewässer, Abwasser oder in den Boden gelangen. Die Gehalte in Trinkwasser sind dabei jedoch rechtlich festgelegt und dürfen in der EU 0,1 µg pro Liter nicht überschreiten [Richtlinie 98/83 EG]. Ausgehend von einer AA-Konzentration und einer Aufnahme von zwei Liter Wasser pro Tag, ergibt sich für einen 70 kg schweren Erwachsenen eine tägliche Exposition von 2,9 ng/kg KG/Tag. Die Aufnahme von AA über das Trinkwasser liegt damit deutlich unter der Exposition durch die Nahrung oder durch Tabakrauch und ist eher als vernachlässigbare Aufnahmequelle anzusehen [Gomes *et al.*, 2002].

Eine weitere, jedoch ebenfalls als vernachlässigbare Quelle von AA zu betrachten, sind Kosmetika. Kosmetika, welche Polyacrylamid als Bestandteil ihrer Formulierung enthalten, können als Verunreinigung Spuren des Monomers aufweisen. Gemäß den Verordnungen (EG) Nr. 1223/2009 und 76/768/EWG darf der Restgehalt von AA in Polyacrylamid bei Körperpflegemitteln, welche auf der Haut verbleiben, 0,1 mg/kg nicht überschreiten. Bei sonstigen kosmetischen Mitteln ist ein Wert von 0,5 mg/kg festgelegt [BfR 2003; Verordnung (EG) Nr. 1223/2009]. Die tägliche Exposition durch Kosmetika ist geschlechterspezifisch und wird bei Frauen mit einem Wert von 0,23 ng AA/kg KG/Tag, verglichen mit einer Exposition von 0,17 ng AA/kg KG/Tag bei Männern, etwas höher eingestuft.

2.4.3 Bildung und Gehalte im Lebensmittel

AA wird im LM im Zuge der Maillard-Reaktion aus Asparagin (und anderen Aminosäuren z. B. Cystein, Glutamin oder Methionin) und reduzierenden Zuckern (z. B. Glukose oder Fruktose) ab Temperaturen von > 120 °C gebildet. Diese Reaktion, auch als nicht enzymatische Bräunung bekannt, trägt wesentlich zum Aroma und zur Farbgebung von erhitzten LM wie z. B. Keksen und Chips bei. In einem mehrstufigen Prozess, unter Einwirkung von hohen Temperaturen und/oder längerer Reaktionszeit, kommt es zur Bildung von heterozyklischen Verbindungen wie z. B. Mono- und Dicarbonylverbindungen [Mottram *et al.*, 2002; Stadler *et al.*, 2002].

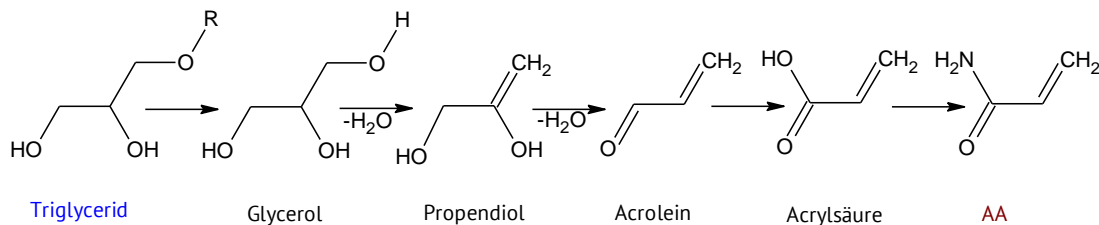


Schema 05: Bildungsmechanismus von AA aus Asparagin und reduzierendem Zucker (Carbonylquelle). Ausgehend von einer Schiff'schen Base (1) und nachfolgender Wasserabspaltung unter Bildung der decarboxylierten Schiff'schen Base (2) kann AA auf zwei Pfaden (A, B) gebildet werden. In Weg A entsteht 3-Aminopropionamid (3) und daraus AA (4). In Weg B wird AA ausgehend von (2) ohne weitere Zwischenstufen direkt gebildet [mod. nach Zyzak *et al.*, 2003].

Der Bildungsmechanismus von AA unter Beteiligung der Aminosäure Asparagin ist in Schema 05 dargestellt. Eingeleitet wird dieser Mechanismus durch den nukleophilen Angriff der freien α -Aminogruppe des Asparagins an die Carbonylgruppe eines reduzierenden Zuckers. Als Reaktionsprodukt entsteht ein *N*-Glykosid, welches zur Schiff'schen Base dehydriert. Durch Decarboxylierung und nachfolgender Dehydrierung entsteht 3-Aminopropionamid (3-APA), aus welchem sich nach Ammoniak-Freisetzung AA bildet. Durch Decarboxylierung der Aminosäure

Asparagin kann ebenfalls 3-APA gebildet werden. Eine Bildung von AA ohne Beteiligung von reduzierenden Zuckern ist daher möglich. Ausgehend von der Schiff-Base ist auch die Freisetzung eines Imins und AA, durch Spaltung der C-N-Bindung des bei der Decarboxylierung der Schiffschsen-Base resultierenden Ylids, möglich [Granvogl und Schieberle, 2006; Xu *et al.*, 2014].

Ein weiterer jedoch untergeordneter Bildungsmechanismus ist die Bildung von AA aus Triglyceriden (TG) bei hohen Temperaturen (> 200 °C) durch Freisetzung von Glycerol und nachfolgender Dehydrierung, Oxidation und Weiterreaktion zu AA [Becalski *et al.*, 2003]. Dieser Bildungsmechanismus ist in Schema 06 dargestellt.



Schema 06: Bildungsmechanismus von AA aus Triglyceriden [mod. nach Becalski *et al.*, 2003].

Da AA dem LM weder absichtlich zugesetzt wird noch natürlich vorkommt, handelt es sich somit um eine herstellungsbedingte unerwünschte Lebensmittelkontaminante. Um die Gehalte im Produkt möglichst gering zu halten, wurden national und international Minimierungskonzepte entwickelt [BfR, 2011]. Für genotoxische Kanzerogene wurde das sogenannte ALARA-Konzept (*as low as reasonable achievable*) entwickelt. Ziel des Minimierungskonzepts ist es, die Mengen an solchen Stoffen im LM kontinuierlich auf einen technisch realisierbaren Gehalt zu minimieren. Im Falle der Verbindung AA betrifft dies vor allem Produktgruppen, wie z. B. Pommes frites, Chips, Lebkuchen, Frühstückscerealien, Brot, Kekse etc. Charakteristisch tragen solche LM, aufgrund der erhöhten Menge an AA im Produkt oder der erhöhten Verzehrsmenge des LMs, zur Exposition des Verbrauchers bei. Auf Basis von Untersuchungsergebnissen der amtlichen Lebensmittelüberwachung ermittelt das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit Signalwerte auf Basis des 90ten Perzentils der eingereichten Untersuchungsergebnisse für unterschiedliche Warengruppen.

Überschreitet ein Hersteller die festgelegten Signalwerte, wird dieser umgehend kontaktiert, um eine Reduzierung der AA-Gehalte anzustreben. Im Jahre 2013 wurde ein ähnliches Konzept auf EU-Ebene eingeführt. Die dabei eingeführten Richtwerte sind vergleichbar mit den in Deutschland geltenden Signalwerten [Kommissions-Empfehlung 2013/647/EU]. Im Jahre 2017 trat eine neue EU-Verordnung zur Reduktion der AA-Gehalte auf europäischer Ebene in Kraft [Verordnung (EU) 2017/2158]. Verglichen mit der davor geltenden Empfehlung der EU-Kommission sind die Richtwerte in verschiedenen Produkten erniedrigt. Tabelle 06 enthält Richtwerte aus beiden Verordnungen.

Tabelle 06: Gegenüberstellung der Richtwerte aus der EU-Empfehlung und der EU-Verordnung 2017. [EU-Empfehlung 2013/647/EU und Verordnung EU 2017/2158].

Lebensmittel	Richtwert EU-Empfehlung	Richtwert EU-Verordnung
	2013/647/EU [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	2017/2158/EU [$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Verzehrfertige Pommes frites	600	500
Chips aus frischen Kartoffeln und aus Kartoffelteig	1000	750
Weiches Brot auf Weizenbasis	80	100
Kekse und Waffeln	500	350
Knäckebrot	450	350
Lebkuchen	1000	800
Gerösteter Kaffee	450	400
Instand-Kaffee	900	850
Kekse und Zwieback Säuglinge	200	150

Es gibt eine ganze Reihe an Einflussfaktoren, die die AA-Bildung im LM beeinflussen. Sowohl die Auswahl der Rohstoffe als auch die Zubereitung des LM beeinflusst den Gehalt an AA. Amrein und Kollegen (2003) untersuchten die Bildung von AA beim Backen von Kartoffelstreifen unterschiedlicher Kartoffelsorten. Während einige Sorten, wie z. B. Panda mit 209 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AA geringe Mengen der Substanzen enthielten, konnten in anderen Sorten, wie der Eba mit 1553 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AA,

deutlich höhere Gehalte detektiert werden [Amrein *et al.*, 2003]. Neben der richtigen Kartoffelsorte spielt auch die Dauer des Frittierens, sowie die Temperatur des Fettes eine wesentliche Rolle. Jackson (2014) untersuchte den Gehalt an AA in frittierten (vorgekochten) Pommes frites in Abhängigkeit der Frittierzeit. Während unfrittierte Pommes frites 45 µg/kg AA enthielten, stieg der Gehalt nach einer Frittierzeit von zwei Minuten und 185 °C auf 262 µg/kg an. Nach vier Minuten konnten bereits 866 µg/kg AA detektiert werden [Jackson, 2014; EFSA, 2015]. Eine Erniedrigung der Frittier-Temperatur von 185 auf 175 °C bewirkt eine deutliche Absenkung der AA-Gehalte um bis zu 35 % [Gertz *et al.*, 2002]. Bei anderen Kartoffelspeisen wie Bratkartoffeln empfiehlt sich die Verwendung von gekochten Kartoffeln. Bei der Zubereitung aus rohen Kartoffeln ist es sinnvoll die Kartoffeln vorab gut zu wässern, damit die Stärke der Knolle entzogen wird. Auch Blanchieren führt zur Reduktion der AA-Gehalte. Studien von Pedreschi und Kollegen (2004) konnten zeigen, dass 70minütiges Blanchieren bei 50 °C bzw. 40minütiges blanchieren bei 70 °C zu einer Senkung des AA-Gehaltes um mehr als 90 % beiträgt [Pedreschi *et al.*, 2004].

Neben Kartoffelprodukten gehört Lebkuchen auch zur mit AA belasteten Warengruppe. Es konnte gezeigt werden, dass das Backtriebmittel einen wesentlichen Einfluss auf die AA-Bildung nimmt. Der Einsatz von Natriumhydrogencarbonat anstelle von Ammoniumhydrogencarbonat führt zu einer um bis zu 60 % reduzierten AA-Bildung [Amrein *et al.*, 2004]. Des Weiteren empfiehlt sich reduzierende Zucker wie Glukose und Fruktose gegen Saccharose (ein nicht reduzierendes Disaccharid) zu ersetzen.

Durch Absenkung des pH-Wert mittels Zugabe von organischen Säuren (z. B. Zitronensäure) kann die AA-Bildung ebenfalls reduziert werden, indem die Aminosäure Asparagin protoniert vorliegt und nicht mit einem reduzierenden Zucker reagieren kann. Im Modellsystem, bestehend aus Glukose und Asparagin, konnte gezeigt werden, dass eine Absenkung des pH-Wertes von pH 7 auf pH 4 zu einer 99,1%igen Inhibition der AA-Bildung bereits nach 30minütiger thermischer Behandlung (150 °C) führt. Auch mit Matrix, bestehend aus bei 70 °C für zehn Minuten blanchierten Kartoffeln, konnte

eine pH-abhängige Bildung der Verbindung aufgezeigt werden [Jung *et al.*, 2003; De Vleeschouwer *et al.*, 2006].

2.4.4 Endogene Bildung

Verschiedene Hinweise aus Tierversuchen und Humanstudien deuten darauf hin, dass AA möglicherweise auch endogen im Körper gebildet werden kann [Tareke *et al.*, 2008; Watzek *et al.*, 2012b; Ruenz *et al.*, 2016; Goempel *et al.*, 2017]. Hierfür existieren verschiedene Hypothesen.

Tareke und Kollegen (2009) konnten im Tierversuch mit männlichen C57BL/6N-Mäusen zeigen, dass die Behandlung der Tiere mit Stoffen, die freie Radikale erzeugen können, zu einem Anstieg der Hb-Adduktgehalte führt. Bereits 24 h ($n = 8$) bzw. 48 h ($n = 3$) nach Applikation von 3,2 mg/kg KG FeSO_4 , stiegen die AA-Hb- bzw. GA-Hb-Gehalte signifikant an. Eine Gabe von 20 mg/kg KG 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin-Salzsäure (MPTP; $n = 9$), sowie eine Gabe von 10 mg/kg KG Methamphetamin (METH; $n = 4$) führte 72 h nach Applikation zu einem extrem signifikanten Anstieg der AA-Hb-Addukte, jedoch zu keinem Anstieg der GA-Hb-Addukte [Tareke *et al.*, 2008]. Um die Ergebnisse zu bestätigen, dass AA in Folge von oxidativem Stress gebildet werden kann, wurde eine *in-vitro*-Studie durchgeführt, in welcher gezeigt werden konnte, dass AA unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4; 37 °C) bei Inkubation von Asparagin mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Abhängigkeit von Zeit und H_2O_2 -Konzentration gebildet wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass reduzierende Zucker wie Glukose zu keiner Erhöhung der AA-Bildung beitragen [Tareke *et al.*, 2009]. In einer weiteren Tierstudie an weiblichen Sprague-Dawley-Ratten ($n = 54$) konnte eine Diskrepanz zwischen AA-Aufnahme und Mercaptursäure-Ausscheidung beobachtet werden, was auf eine endogene Bildung hindeutet. Die Tiere erhielten ein spezielles für die Studie hergestelltes AA-armes Futter, welches einen AA-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze (0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AA) aufwies. Bedingt durch die Nachweisgrenze ergab sich eine maximale AA-Aufnahmemenge von 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG bzw. 0,4 nmol AA. Tatsächlich konnte in der Kontrollgruppe jedoch eine Mercaptursäure-Ausscheidung von 0,8 mmol beobachtet werden, was auf eine möglicherweise endogen gebildete AA-Menge von 0,6–0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG bzw. 1,6–2 nmol schließen lässt [Watzek *et al.*, 2012a].

Ähnliche Beobachtungen konnten auch in zwei Humanstudien gemacht werden [Ruenz *et al.*, 2016; Goempel *et al.*, 2017]. In einer Studie von Ruenz und Kollegen (2016) erhielten 14 männliche Probanden zu Beginn der Studie eine AA-arme Ernährung. Die AA-Aufnahme während dieser sog. *Washout*-Phase lag bei maximal 41 ng/kg KG/Tag. Am Ende des *Washouts* konnten im Urin der Probanden *N*-Acetyl-*S*-(2-Carbamoylethyl)-cystein-Gehalte (AAMA) von 93 ± 31 nmol/Tag nachgewiesen werden, was auf eine aufgenommene AA-Dosis von 0,2–0,3 µg/kg KG/Tag schließen lässt [Ruenz *et al.*, 2016]. In einer weiteren Studie, bestehend aus 12 männlichen Probanden, erhielt die Hälfte der Probanden während einer 13-tägigen *Washout*-Phase 1 µg/kg KG $^{13}\text{C}_3\text{D}_3$ -AA. Dies entspricht einer AA-Aufnahme von 0,06 µg/Tag. Die AAMA-Ausscheidung in dieser Gruppe lag am Ende des *Washouts* bei $0,14 \pm 0,1$ µmol/Tag und somit ergibt sich ein AA-Level von 0,3–0,4 µg/kg KG/Tag. Als möglicher Bildungsmechanismus der endogenen AA-Bildung wurde eine Reaktion zwischen reduzierenden Zuckern und anderen Verbindungen mit Aminverbindungen Verbindungen, ähnlich der Maillard-Reaktion, aufgeführt [Goempel *et al.*, 2017]. Derartige Reaktion führen zur Bildung von einer Gruppe heterozyklischer Verbindungen den sogenannten *advanced glycation endproducts* (AGEs). Die Bildung der durch nicht enzymatischen Glykierung entstanden Produkte im Rahmen der Maillard-Reaktion im Körper wurde bereits beschrieben [Vistoli *et al.*, 2013].

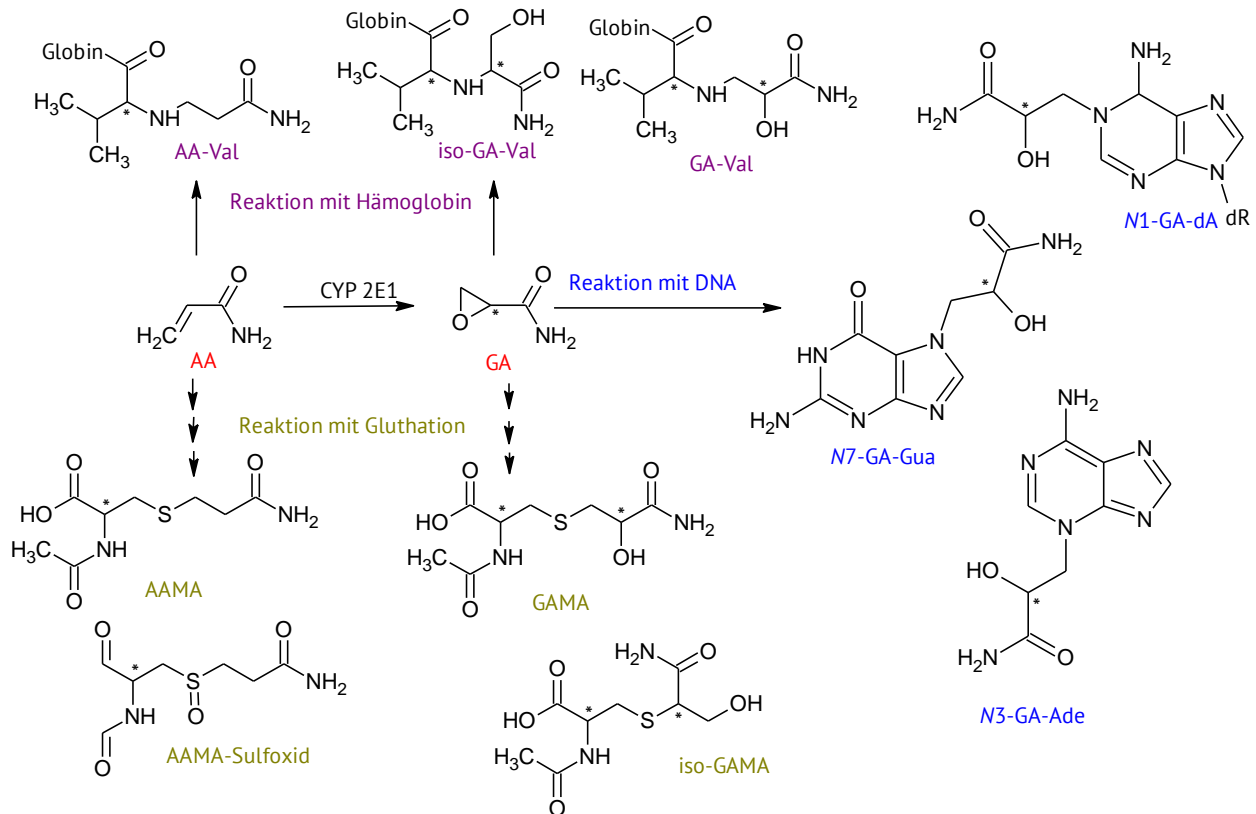
2.4.5 Toxikokinetik

Aufgrund seiner Struktur kann AA sehr leicht oral, dermal oder inhalativ in den Körper gelangen. Durch die Nahrung aufgenommenes AA gelangt dabei durch den Magen-Darmtrakt in die Leber und kann aufgrund seiner kleinen molaren Masse und guten Wasserlöslichkeit, schnell in alle Gewebe verteilt werden [EFSA, 2015].

Erste Studien zur Toxikokinetik der Verbindung wurden bereits 1982 von Miller und Kollegen (1982) durchgeführt. Männlichen F344-Ratten wurde 1; 10 oder 100 mg/kg KG 2,3- ^{14}C -markiertes AA ins Trinkwasser hinzugefügt und die Gehalte an markiertem AA im Fäzes und Urin bestimmt. Nach 24 h konnten 4,8 % im Fäzes und 62 % im Urin detektiert werden. In derselben Studie wurde den Tieren 10 mg/kg KG 2,3- ^{14}C -markiertes AA intravenös (*i. v.*) injiziert und die Verteilung in den verschiedenen

Gewebe untersucht. Dabei konnte eine schnelle und gleichmäßige Verteilung in alle Gewebe (Leber, Niere, Lunge, Muskel, Gehirn, Ischiasnerv, Rückenmark, Haut, Fettgewebe und Dünndarm) beobachtet werden, so konnten beispielsweise 7 % AA in der Leber und 12 % der Verbindung im Blut detektiert werden [Miller *et al.*, 1982]. Die ubiquitäre Verteilung von AA in unterschiedliche Gewebe und die Ausscheidung der Substanz mittels Urin und Fäzes konnte in weiteren Tierversuchen aufgezeigt und beschrieben werden [Katry *et al.*, 1999; Sumner *et al.*, 2003; Doerge *et al.*, 2005ab].

Auch ein Überwinden der Plazenta-, oder Blut-Hirn-Schranke ist möglich. So wurde in einer Studie von Sörgel *et al.* (2003) gezeigt, dass bereits nach 30 Minuten 20 % der AA-Plasmakonzentration in der Plazenta vorliegen. Auch in Muttermilch konnte AA detektiert werden. Nimmt der Fötus AA auf, kann dieses über die Blut-Hirn-Barriere übertreten und im Gehirn neurotoxische Schäden verursachen [Sörgel *et al.*, 2003].



Schema 07: Metabolismus von AA. Zur besseren Übersicht wurde auf die Bildung von Glyceramid aus GA verzichtet. Mit AA-Val: *N*-(2-Carbamylethyl)-valin; GA-Val: *N*-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-valin; iso-GA-Val: (*N*-(2-Carbamoyl-1-hydroxyethyl)-valin; *N*¹-GA-dA: *N*¹-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-2'-deoxyadenosin; *N*7-GA-Gua: *N*7-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-guanin; *N*3-GA-Ade: *N*3-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-2-hydroxyethyl-adenin; AAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-Carbamylethyl)-cystein; GAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-Carbamylethyl-2-Hydroxyethyl)-cystein; iso-GAMA: *N*-Acetyl-*S*-(1-Carbamylethyl-2-Hydroxyethyl)-cystein; Hb: Hämoglobin und dR: Deoxyribose [mod. nach: Sumner *et al.*, 2003; Boettcher und Angerer, 2005; Doerge *et al.*, 2005c; Tareke *et al.*, 2006 ; EFSA 2015].

Schema 07 zeigt den Metabolismus von AA im Menschen. Katalysiert von Enzym CYP2E1 bildet sich aus AA in der Leber der eigentlich toxische Metabolit der Verbindung, das sogenannte 2,3-Epoxypropanamid (Glycidamid, GA). Eine Vielzahl an Studien konnte zeigen, dass CYP2E1 maßgeblich an der Umsetzung des AA zum GA beteiligt ist [Sumner *et al.*, 1999; Kurebayashi und Ohno, 2006; Settels *et al.*, 2008, Kraus *et al.*, 2013]. Ghanayem und Kollegen (2005a) führten hierzu Versuche an CYP2E1 exprimierenden Mäusen (Wildtyp-Mäuse) und an nicht CYP2E1 exprimierenden

Mäusen (CYP2E1-*knockout*-Mäuse) durch. Den Tieren wurde 50 mg/kg AA *intraperitoneal* (*i. p.*) verabreicht. Nach 6 h wurden die Tiere getötet und die AA- und GA- Plasmalevel untersucht. Während bei den Wildtyp-Mäusen geringe Gehalte an AA ($0,84 \pm 0,8 \mu\text{M}$) und vergleichsweise hohe Gehalte an GA ($33 \pm 6,3 \mu\text{M}$) detektiert werden konnten, zeigte sich ein gegenläufiger Trend bei den CYP2E1-*knockout*-Mäusen. Hier konnten hohe AA-Gehalte ($115 \pm 14 \mu\text{M}$) und vergleichsweise sehr geringe Gehalte an GA ($1,7 \pm 0,31 \mu\text{M}$) beobachtet werden [Ghanayem *et al.*, 2005a]. Auch mittels Humandaten konnte gezeigt werden, dass CYP2E1 eine wichtige Rolle im Metabolismus des AA einnimmt. In einer Studie bestehend aus 16 Probanden (Nichtraucher, 8 Männer und 8 Frauen) wurde die Ausscheidung von AA zu unterschiedlichen Zeitpunkten (bis zu 72 h) im Urin detektiert. Mindestens eine Stunde nach der letzten Nahrungsaufnahme und zehn Stunden vor dem Verzehr von Kartoffelchips, wurde den Probanden einmalig ein CYP2E1-Inhibitor (500 mg Disulfiram in Form einer Dispergette) verabreicht. Es konnte eine um 1,34fache erhöhte AA-Ausscheidung, sowie eine um 0,44fache Erniedrigung der GA-Ausscheidung beobachtet werden [Doroshenko *et al.*, 2009].

Die Entgiftung des GA erfolgt mittels Epoxidhydrolase, welche GA enzymatisch zu 2,3-Dihydroxypropanamid (DHPA), auch bekannt als Glyceramid, umsetzt [Fennell und Friedman, 2005; EFSA, 2015], und mit dem Urin aus dem Körper ausgeschieden wird [Hartmann *et al.*, 2011, Latzin *et al.*, 2012]. In einer Studie bestehend aus 30 Probanden (16 Nichtraucher und 14 Raucher), waren die gemessenen Konzentrationen an DHPA im Urin ca. 10fach höher als in Folge der Umsetzung von AA zu GA erwartet. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass andere Quellen für die Bildung von DHPA existieren könnten [Latzin *et al.*, 2012]. Ein möglicher jedoch noch nicht vollständig aufgeklärter Weg ist die Bildung von Kohlenstoffdioxid über 2,3-Dihydroxypropansäure [Sumner *et al.*, 2003]. Von besonderer Bedeutung scheint dabei das C1-Atom des DHPA zu sein. Im Tierversuch mit männlichen Albino-Ratten konnten Hashimoto und Aldridge (1970) zeigen, dass nach *i. v.*-Verabreichung einer 100 mg/kg KG Dosis $1\text{-}^{14}\text{C}$ -AA innerhalb von 24 h bereits 5 % des am C1-Atom isotoopenmarkiertem AA als $^{14}\text{CO}_2$ abgeatmet wurden. Im Gegenzug dazu konnten Studien mit männlichen F344-Ratten, denen einmalig 10 mg/kg KG *i. v.* $2,3\text{-}^{14}\text{C}$ -markiertes AA verabreicht wurde zeigen, dass kein isotoopenmarkiertes Kohlenstoffdioxid gebildet wurde [Miller *et al.*, 1982].

Eine weitere Folgereaktion der Verbindung GA als auch AA, welche eine Entgiftungsreaktion des Körpers darstellt, ist die Konjugation der Substanzen mit dem Tripeptid GHS und nachfolgendem Abbau zu sogenannten Mercaptursäuren, welche mit dem Urin aus dem Körper ausgeschieden werden und als Kurzzeitbiomarker (ca. 24 h) der AA-Exposition dienen [Watzek *et al.*, 2012a; Duale *et al.*, 2009]. Mercaptursäuren werden im Humanen Biomonitoring (HBM), welches ausführlicher in Kapitel 2.5.3 beschrieben wird, den Expositionsbiomarkern zugeordnet. Die Bildung von Mercaptursäuren dient der Detoxifizierung von AA. Typische Mercaptursäuren sind *N*-Acetyl-*S*-(2-Carbamoylethyl)-cystein (AAMA) und *N*-Acetyl-*S*-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-cystein (GAMA), sowie *N*-Acetyl-*S*-(2-Carbamoylethyl)-cystein-sulfoxid (AAMA-Sul, spezifisch beim Menschen) [Führ *et al.*, 2006]. Im Menschen wird AAMA mengenmäßig am stärksten gebildet [Fennell und Friedman, 2005; Boettcher *et al.*, 2006; Kopp und Dekant, 2009; Watzek *et al.*, 2012a; Ruenz *et al.*, 2016; Goempel *et al.*, 2017]. Die Bildung von Mercaptursäuren stellt einen typischen Entgiftungsweg dar. Die Entstehung der Mercaptursäure AAMA wurde bereits in Kapitel 2.2 näher erläutert. Kopp und Dekant (2009) untersuchten die Spezies abhängige Mercaptursäure-Ausscheidung in Ratte und Mensch mittels Flüssigkeitschromatographie mit (Tandem-)Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS). Den Tieren (5 männliche F344-Ratten) wurde einmalig 20 µg/kg KG ¹³C₃-markiertes AA mittels Schlundsonde verabreicht. Zum Vergleich der Tierdaten mit Humandaten, wurde auch der Urin von 6 Probanden (Nichtraucher; 3 Männer und 3 Frauen), welche die gleiche Dosis an ¹³C₃-markiertem AA einmalig über das Trinkwasser aufgenommen haben, untersucht. Die Ergebnisse der Studie sind in Tabelle 07 aufgeführt [Kopp und Dekant, 2009]. Eine kleine Auswahl weiterer Studien zur Untersuchung der Speziesunterschiede ist dort ebenso aufgeführt [Kopp und Dekant, 2009; Doerge *et al.*, 2007; Sumner *et al.*, 1992; Fennell *et al.*, 2006].

Tabelle 07: Ausscheidung von AA und dessen Metaboliten in unterschiedlichen Spezies über einen Zeitraum von 24 h. Die Ergebnisse spiegeln die Molprozent der aufgenommenen Dosis wider. Mit AAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-Carbamoylethyl)-cystein; AAMA-Sul: *N*-Acetyl-*S*-(2-Carbamoylethyl)-cysteine-sulfoxid; GAMA: *N*-Acetyl-*S*-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-cystein; GA: Glyceramid; AA: Acrylamid und DHPA: 2,3-Dihydroxypropanamid; a: Beinhaltet sofern bestimmt auch iso-GAMA;b: Summe aus GA und GAMA; c: Summe aus AA, AAMA und AAMA-Sul [EFSA 2015].

Spezies	Dosis [mg/kg KG]	AAMA	GAMA ^a	∑	∑GA ^b /∑AA ^c	Lit.
Mensch	0,02	37,4 ± 2,92	3,23 ± 0,69	46,9	0,07	Kopp und Dekant, 2009
Mensch	3	22 ± 5,3	nd	34	0,16	Fennell <i>et al.</i> , 2006
Ratte	0,02	30 ± 5,1	25 ± 6,2	55	0,8	Kopp und Dekant, 2009
Ratte	0,1	31	28	67	1,1	Doerge <i>et al.</i> , 2007
Ratte	3	29 ± 4,5	21 ± 2,4	50	0,7	Fennell <i>et al.</i> , 2006
Ratte	50	34 ± 1,8	12 ± 0,6	50,7	0,5	Sumner <i>et al.</i> , 1992
Maus	0,1	7	16	40	4,2	Doerge <i>et al.</i> , 2007
Maus	50	21 ± 1,1	17 ± 0,6	50,4	1,3	Sumner <i>et al.</i> , 1992

Wie in Tabelle 07 ersichtlich ist, unterscheidet sich der Metabolismus von Ratte, Maus und Mensch voneinander. Während beim Menschen AAMA mengenmäßig am stärksten gebildet wird, sind die Gehalte an AAMA und GAMA im Nager recht ähnlich. Deutlich wird dies bei genauerer Betrachtung der Verhältnisse von GA (und dessen Metaboliten) und AA (und dessen Metaboliten). Die Verhältnisse

nehmen in folgender Reihenfolge ab: Maus > Ratte > Mensch. Je kleiner der Wert desto größer der Einfluss der Konjugationsreaktion mit GSH und desto geringer die GA-Bildung. Während somit Mäuse sehr effektiv in der Umsetzung des AA zu GA sind und damit zu einer Toxifizierungsreaktion neigen, erfolgt beim Menschen verstärkte Phase-II-Konjugation mit GSH, was letztlich zur Detoxifizierung führt. Aufgrund der geringen Effizienz der Detoxifizierung bei Mäusen, ist diese Spezies verglichen mit Ratte und Mensch die empfindlichste. Neben Speziesunterschieden bei der AAMA und GAMA-Ausscheidung, konnte in Humanstudien eine Korrelation zwischen AA-Aufnahme und der AAMA- und GAMA-Ausscheidung aufgezeigt werden [Kellert *et al.*, 2006; Watzek *et al.*, 2012a; Ruenz *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Goempel *et al.*, 2017]. Des Weiteren konnte in anderen Studien eine Korrelation zwischen AAMA und GAMA-Ausscheidung und dem Rauchen aufgezeigt werden [Bjellaas *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Boettcher *et al.*, 2005; Kellert *et al.*, 2006; Bjellaas *et al.*, 2007a; Huang *et al.*, 2007; Schettgen *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2014]. Eine Studie von Boettcher und Kollegen (2005) konnte zeigen, dass die Gehalte an AAMA in Rauchern ($n = 13$; 3 Männer und 10 Frauen) im Median um das 4fache höher sind als in der Nichtrauchergruppe ($n = 16$; 5 Männer und 11 Frauen). Auch die Gehalte an GAMA waren beim Raucher höher. Während der Median für AAMA bzw. GAMA bei den Rauchern bei 127 bzw. 29 $\mu\text{g/l}$ Urin lag, konnten für Nichtraucher Gehalte von 29 bzw. 5 $\mu\text{g/l}$ Urin bestimmt werden [Boettcher *et al.*, 2005].

AA kann als α , β -ungesättigte Carbonylverbindung in einer Michael-Addition und GA als elektrophiles Epoxid mit nukleophilen Zentren wie z. B. Amino-, Thiol-, oder Hydroxylgruppen von Proteinen reagieren. Typisch ist hierfür die Bildung von Hb-Addukten wie z. B. *N*-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-valin (AA-Val) und *N*-(2-Carbamoyl-1-Hydroxyethyl)-valin (GA-Val). Besondere Bedeutung kommt dabei den Addukten am *N*-terminalen Valin im Hb zu, welche sich über die Lebenszeit eines Erythrozyten anreichern und daher als typische Langzeitbiomarker (ca. 4 Monate) für eine AA-Exposition eingesetzt werden [Bergmark, 1997; Fennell *et al.*, 2005; Törnqvist *et al.*, 2002; Bjellaas *et al.*, 2007b]. Ähnlich wie Mercaptursäuren dienen Hb-Addukte im HBM als Expositionsbiomarker. Zu den ersten Hb-Addukten, welche im humanen AA-Biomonitoring untersucht wurden, zählen Cystein-Hb-Addukte. Diese Addukte sind für das HBM nicht relevant. Hb

von Ratten enthält reaktive Cystein-Reste, welche nicht im Menschen vorhanden sind. Daher sind diese Hb-Addukte des Cysteins nicht speziesübergreifend geeignet und somit nicht für humane Biomonitoring-Studien verwendbar. Auf Grundlage dieser Kenntnisse haben sich im HBM, Hb-Val-Addukte als Biomarker etabliert. Eine gängige Methode zur Detektion von AA-Val und GA-Val, welche gerne in Biomonitoringstudien zur Berufs-, und Umwelt-bedingten AA-Exposition angewendet wird, stellt die GC-MS/MS dar. Neuere Methoden basieren auf LC-MS/MS-Analysen [EFSA, 2015]. Eine Korrelation zwischen AA-Aufnahme und Bildung der AA-Val und GA-Val konnte im mehreren Tierversuchsstudien nachgewiesen werden [Tareke *et al.*, 2006; Vikström *et al.*, 2008; Zeiger *et al.*, 2009; Berger *et al.*, 2011]. Eine Ausnahme stellen die Ergebnisse von Berger und Kollegen (2011) dar, diese verabreichten männlichen Sprague-Dawley-Ratten ($n = 3$; pro Dosis) einmalig 0,45; 0,9 oder 10 mg/kg KG AA mittels Schlundsonde. Nach 24 h wurde das Blut der Tiere auf Hb-Addukte untersucht. Während für AA-Val ein konzentrationsabhängiger Anstieg beobachtet wurde, konnte dieser Anstieg für GA-Val mit 251 ± 42 pmol/g Hb erst bei höchster Dosis beobachtet werden. Ähnliche Beobachtungen ergaben sich in einem weiteren Experiment, in welchem den Tieren neun Tage 50 oder 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AA über Futter und Trinkwasser verabreicht wurde. Während die Menge an gebildeten AA-Val zunahm, blieben die GA-Val-Gehalte mit 28 ± 10 pmol/g Hb im Bereich der Kontrollgruppe (28 ± 9 pmol/g Hb). Als Ursache für diese Beobachtung postulierten die Autoren, dass das in der Leber gebildete GA effizient mit GSH konjugiert und somit nicht zur Bildung von GA-Val zur Verfügung steht [Berger *et al.*, 2011]. Auch in Humanstudien konnte eine Abhängigkeit der (analytisch erfassten) AA-Aufnahme und Hb-Addukt-Bildung aufgezeigt werden [Fennell *et al.*, 2005; Vikström *et al.*, 2011]. Eine Studie an 9 Probanden (Nichtraucher; 4 Männer und 5 Frauen), welche über 28 Tage täglich ca. 160 μg AA über den Verzehr AA-haltiger Lebensmittel aufgenommen haben, zeigte einen signifikanten Anstieg der AA-Val- und GA-Val-Gehalte. Zu Beginn und am Ende der Studie wurden die AA-Val- und GA-Val-Gehalte im Blut bestimmt. Für AA-Val konnte ein signifikanter Anstieg von 36 ± 15 auf 81 ± 30 pmol/g Hb und für GA-Val von 35 ± 2 auf 62 ± 23 pmol/g Hb beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine weitere Studie mit 19 Nichtrauchern, die in zwei Gruppen eingeteilt wurden. Die Niedrigdosisgruppe (10 Probanden; 4 Männer und 6 Frauen) erhielt über vier Tage hinweg $20 \mu\text{g} \pm 8 \mu\text{g}$ AA über den Konsum von

AA-haltigen LM, während die Hochdosisgruppe $3050 \pm 330 \mu\text{g}$ AA aufnahm. Am 5ten Tag wurde das Blut untersucht. Im Falle der Niedrigdosisgruppe stiegen die AA-Val-Werte nicht signifikant von 59 ± 19 auf $58 \pm 19 \text{ pmol/g Hb}$ und die GA-Val-Werte signifikant von 72 ± 19 auf $80 \pm 18 \text{ pmol/g Hb}$. Für die Hochdosisgruppe lagen die AA-Val- bzw. GA-Val-Spiegel zu Beginn bei 57 ± 10 bzw. $64 \pm 27 \text{ pmol/g Hb}$ und stiegen am Ende der Studie signifikant auf 114 ± 5 bzw. $106 \pm 25 \text{ pmol/g Hb}$ an [Vikström *et al.*, 2012]. Neben der AA-Aufnahme durch LM gibt es weitere Humanstudien, welche eine Korrelation zwischen Hb-Addukte und Lifestyle-Faktoren wie dem Rauchen aufzeigen [Schettgen *et al.*, 2003; Schettgen *et al.*, 2004; Vesper *et al.*, 2008; Kütting *et al.*, 2009; Vesper *et al.* 2013]. In einer Humanstudie bestehend aus 29 Probanden (13 Raucher und 16 Nichtraucher) konnte gezeigt werden, dass die Gehalte an AA-Val bzw. GA-Val-Addukten in Rauchern (4 Männer und 12 Frauen) mit 80 ± 48 bzw. $53 \pm 30 \text{ pmol/g Hb}$ gegenüber Nichtrauchern (3 Männer und 10 Frauen) mit 19 ± 4 bzw. $17 \pm 4 \text{ pmol/g Hb}$ erhöht waren [Schettgen *et al.*, 2004]. Fennell und Kollegen (2005) untersuchten die Hb-Bildung speziesabhängig in Ratte und Mensch. Vier männlichen F344-Ratten wurde einmalig eine Dosis von $3 \text{ mg } 1,2,3\text{-}^{13}\text{C}_3$ -markiertes AA mittels Schlundsonde verabreicht und nach 24 h das Blut der Tiere untersucht. Für an ^{13}C -markiertem AA-Val bzw. GA-Val konnten Gehalte von 752 ± 106 bzw. $907 \pm 176 \text{ pmol/g Hb}$ bestimmt werden. Beim Menschen (Nichtraucher; 6 Männer) induzierte dieselbe Dosis an $1,2,3\text{-}^{13}\text{C}_3$ -AA (gelöst in 200 ml Wasser), nach 24 h AA-Val- bzw. GA-Val-Gehalte von 247 ± 685 bzw. $1076 \pm 237 \text{ pmol/g Hb}$. Es ergaben sich $^{13}\text{C}_3$ -GA-Val- zu $^{13}\text{C}_3$ -AA-Val-Verhältnisse von $0,84 \pm 0,07$ (Ratte) und $0,44 \pm 0,06$ (Mensch). Diese Ergebnisse decken sich mit den bereits beschriebenen GAMA/AAMA-Verhältnissen und deuten auf eine effektivere Umsetzung des AA zu GA im Nager verglichen mit dem Menschen hin [Fennell *et al.*, 2005].

Während AA selbst keine (in *in-vivo*- und *in-vitro*-Studien), oder allenfalls eine sehr geringe DNA-Reaktivität (in Synthesemodell-Versuchen) aufweist, bildet GA mehrere DNA-Addukte *in vitro* und *in vivo* bei Nagern [EFSA, 2015]. Das Hauptaddukt stellt N7-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-guanin (N7-GA-Gua) dar. In geringeren Mengen wurden ebenfalls N1-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-2'-deoxyadenosin (N1-GA-dA), N3-(2-Carbamoyl-2-Hydroxyethyl)-adenin (N3-GA-Ade) detektiert. N1-GA-Gua konnte bisher nur in *in-vitro*-Versuchen nach Inkubation von DNA mit GA detektiert

werden, nicht jedoch in *in-vivo*-Studien [Segerbäck *et al.*, 1995; Gamboa da Costa *et al.*, 2003; Doerge *et al.*, 2005c; Tareke *et al.*, 2006; Kotova *et al.*, 2011, Watzek *et al.*, 2012b]. Gamboa da Costa und Kollegen (2003) untersuchten die DNA-Adduktbildung *in vitro* sowie *in vivo* bei Mäusen. Zur Untersuchung der Bildungsrate *in vitro* wurde Lachshoden-DNA mit unterschiedlichen Dosen an GA (1 ng bis 1 mg GA pro mg DNA) für 24 h inkubiert. Bei einer Inkubation von 1 mg GA/mg DNA konnten mehr als 130000 N7-GA-Gua, 2200 N3-GA-Ade und 25000 N1-GA-dA-Addukte detektiert werden. Ähnliche Verhältnisse an N7-GA-Gua und N3-GA-Ade konnten im Tierversuch mit B6C3F1 bzw. C57B1/CN-Mäusen nach einmaliger *i. p.*-Injektion von 5 bzw. 100 µl einer 50 mg/kg Lösung AA gemacht werden. Hier lagen die Gehalte an N7-GA-Gua-Addukten bis auf das 100fach höher als die der N3-GA-Gua-Addukte [Gamboa da Costa *et al.*, 2003]. Vergleichbare Ergebnisse lieferten Doerge und Kollegen (2005). Die einmalige *i. v.*-Gabe von 50 mg/kg KG AA induzierte bei B6C3F1-Mäusen ($n = 3-4$; pro Geschlecht) bis zu 75fach höhere N7-GA-Gua-Adduktgehalte. Die Konzentration an N7-GA-Gua in Gewebe und Leukozyten lag bei ca. 840–2100 N7-GA-Gua-Addukten pro 10^8 Nukleotiden. Bei F344-Ratten ($n = 3-4$; pro Geschlecht) konnten nach *i. v.*-Gabe von 50 mg/kg KG AA in Gewebe und Leukozyten 270–960 N7-GA-Gua-Addukte pro 10^8 Nukleotiden detektiert werden, was auf eine effektivere Umsetzung des AA zu GA in der Maus schließen lässt [Doerge *et al.*, 2005c]. In einer weiteren Nager-Studie mit weiblichen Sprague-Dawley-Ratten ($n = 54$) wurde den Tieren mittels Schlundsonde einmalig, 0,1; 1; 10; 100; 500; 1000; 3000; 6000 oder 10000 µg AA/kg KG verabreicht (0,1–100 µg AA/kg KG, $n = 8$; 1000–10000 µg AA/kg KG, $n = 2-3$). 16 h nach Applikation wurden die Tiere getötet und Leber, Niere und Lunge auf den Gehalt an N7-GA-Gua untersucht. Während in der Niedrigdosisgruppe von 1 µg AA/kg KG Addukte in Lunge und Leber detektiert werden konnte, wurden Addukte in der Leber erst ab 10 µg AA/kg KG sichtbar. Im unteren Dosisbereich (bis 100 µg AA/kg KG) konnte keine Dosisabhängigkeit in den untersuchten Geweben beobachtet werden, erst ab 100 µg AA/kg KG stiegen die N7-GA-Gua-Addukte konzentrationsabhängig an [Watzek *et al.*, 2012b]. Eine Korrelation zwischen AA-Aufnahme und der N7-GA-Gua-Bildungsrate konnte in weiteren Tierversuchsstudien aufgezeigt werden [Zeiger *et al.*, 2009; Koyama *et al.*, 2011a]. Doerge und Kollegen (2005) untersuchten die N7-GA-Gua-Bildung nach wiederholter Gabe. Über einen Zeitraum von 42 Tagen erhielten weibliche und männliche

B6C3F1-Mäuse ($n = 8$) über das Trinkwasser eine tägliche AA-Dosis von 1 mg/kg KG/Tag. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet und die Adduktgehalte in der Leber bestimmt. Während in den ersten zwei Wochen eine kontinuierliche Zunahme beobachtet werden konnte, wurde ab dem 14ten Tag keine weitere Zunahme beobachtet. Ähnliche Effekte zeigten sich im Versuch mit weiblichen und männlichen F344-Ratten, welche ebenfalls über einen Zeitraum von 42 Tagen täglich 1 mg/kg KG/Tag AA über das Trinkwasser verabreicht wurden. Nach 14 Tagen konnte in den weiblichen Tieren keine Zunahme der Adduktgehalte festgestellt werden, während in den männlichen Tieren ein leichter Rückgang der Addukt mengen beobachtet werden konnte [Doerge *et al.*, 2005c].

Während es für die in diesem Kapitel beschriebenen Mercaptursäuren und Hb-Addukte eine Vielzahl an Humanstudien gibt, existiert für den Nachweis von DNA-Addukten nur eine Humanstudie, welche von Huang und Kollegen (2015) durchgeführt wurde. In dieser Studie wurde der Urin von 63 Probanden (30 Raucher und 33 Nichtraucher) auf N7-GA-Gua-Gehalte untersucht. Der Raucherstatus schien dabei keinen Einfluss auf die Ergebnisse zu liefern. Bei den Nichtrauchern bzw. Rauchern lagen die Addukt-Gehalte bei 0,93 bzw. 1,41 µg/g Kreatinin [Huang *et al.*, 2015].

2.6.6 Toxikodynamik

Die Toxikodynamik von AA wurde bereits in der Literatur in mehreren Studien ausführlich untersucht. Zu den kritischen Endpunkten zählen: Reproduktionstoxizität bei männlichen Tieren, Entwicklungstoxizität, Neurotoxizität, Mutagenität und Kanzerogenität [EFSA, 2015], die in den nachfolgenden Kapiteln näher beschrieben werden.

2.4.6.1 Akute Toxizität

Mehrere Studien belegen die akute Toxizität von AA. Nach oraler Gabe wurde die akute Toxizität von AA an verschiedenen Spezies untersucht. Die ermittelten LD₅₀-Werte lagen bei Mäusen bei 107 mg/kg KG, bei Kaninchen und Meerschweinchen lag der Wert zwischen 150 und 180 mg/kg KG

[Hashimoto *et al.*, 1981], und bei Ratten zwischen 150 und 250 mg/kg KG [McCollister *et al.*, 1964; Fullerton und Barnes, 1966; Tilson und Cabe, 1979].

2.4.6.2 Reproduktionstoxizität und Entwicklungstoxizität

In einer zwei-Generationen-Studie mit F344-Ratten ($n = 30$; pro Dosisgruppe und Geschlecht) wurde die reprotoxische Wirkung von AA untersucht. Über einen Zeitraum von 10 Wochen erhielten die Tiere (F0-Generation) täglich eine AA-Dosis von 0; 0,5; 2 oder 5 mg/kg KG/Tag über das Trinkwasser verabreicht. Die F1-Generation erhielt über einen Zeitraum von 11 Wochen dieselbe Behandlung. Sowohl in der F0- als auch F1-Generation konnten zum einen in allen Dosisgruppen neurotoxische Effekte (Spreizfüße und Kopfneigung), zum anderen ab 2 mg/kg KG/Tag eine systematische Toxizität und in der Hochdosisgruppe eine Erniedrigung der Anzahl an lebenden Tieren pro Wurf beobachtet werden. Auch die Überlebensrate (Tag der Geburt bis Tag vier nach der Geburt) der F1- und F2-Generation war erniedrigt. Weitere Untersuchungen konnten eine Anschwellung der Fragmentierung der Axone des peripheren Nervensystems aufzeigen. Im Zuge der Studie wurde ein Dominant-Letal-Test durchgeführt. Der *no observed effect level* (NOAEL) für systematische Toxizität (inkl. Neurotoxizität) bzw. Reproduktionstoxizität lag bei $< 0,5$ bzw. 2 mg/kg KG/Tag [Tyl *et al.*, 2000]. Die durch AA induzierte Neurotoxizität wird in nachfolgendem Kapitel genauer beschrieben. In weiteren Nagerstudien an Ratten und Mäusen zur Prüfung der reprotoxischen und/oder entwicklungstoxischen Wirkung von AA in Abhängigkeit des Geschlechts des exponierten Tieres, konnte gezeigt werden, dass eine Verpaarung von mit AA exponierten Weibchen mit unbehandelten Männchen mit keinen reprotoxischen Effekten wie z. B. Verringerung der Wurfgröße hervorruft. Bei Verpaarung von exponierten männlichen Tieren mit weiblichen unexponierten oder auch weiblichen exponierten Tieren konnte hingegen eine reproduktionstoxische Wirkung des AA beobachtet werden [Sarkomoto und Hashimoto, 1986; Tyl *et al.*, 2000; Tyl und Friedman, 2003; Shipp *et al.*, 2006; EFSA, 2015]. In männlichen Tieren führt AA zur Verringerung der Spermienanzahl, sowie zu einer abnormalen Morphologie der Spermien und Hoden [Sakamoto und Hashimoto *et al.*, 1986; Sakamoto *et al.*, 1988; Wang *et al.*, 2010a; Rajeh *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2011; NTP 2012; Pourntezari *et al.*, 2014]. Ausgehend von den Beobachtungen in Nagerstudien wurde von der EFSA für die

reproduktionstoxische Wirkung des AA ein NOAEL-Wert von 2 mg/kg KG/Tag festgelegt [EFSA, 2015].

Zu den durch AA induzierten entwicklungstoxischen Effekten zählen: Neurologische Verhaltensstörungen, histologische Veränderungen des zentralen Nervensystems, geringfügig reduzierte Gewichtszunahme, sowie Skelettveränderungen. Als niedrigster NOAEL-Wert für die entwicklungstoxische Wirkung von AA wurde ein Wert von 1 mg/kg KG/Tag empfohlen [EFSA, 2015].

2.4.6.3 Neurotoxizität

Eine neurotoxische Wirkung von AA konnte sowohl beim Tier als auch beim Menschen nachgewiesen werden. Takahashi und Kollegen (2011) verabreichten über vier Wochen hinweg *via* Trinkwasser männlichen Sprague-Dawley-Ratten ($n = 80$; davon die Hälfte drei Wochen alt, die andere Hälfte sechs Wochen alt) 0; 50; 100; oder 200 ppM AA. Sowohl in den jüngeren als auch in den älteren Tieren konnte ab einer Dosis von 100 ppM AA ein signifikanter Anstieg neurotoxischer Effekte beobachtet werden. Neben Veränderungen im Gang, traten bei den jüngeren Versuchstieren eine Zunahme der Dichte der Axone des Hüftnervs, bei den älteren Tieren hingegen eine Zunahme der degenerierten Axone des Hüftnervs, auf [Takahashi *et al.*, 2011]. Auch in weiteren Nagerstudien konnten neurotoxische Effekte aufgezeigt werden. Häufig wird dabei eine Lähmung der Hinterfüße und/oder histopathologische Veränderungen der peripheren Nerven und des zentralen Nervensystems beobachtet [Burek *et al.*, 1980; Tyl *et al.*, 2000; NTP, 2012; Tian *et al.*, 2015; EFSA, 2015]. In einer 92 bzw. 93 Tage andauernden subchronischen Studie mit männlichen und weiblichen F344-Ratten, wurde den Tieren 0; 0,05; 0,2; 1; 5 oder 20 mg/kg KG/Tag AA ($n = 10-29$; pro Geschlecht und Dosisgruppe) über das Trinkwasser verabreicht. Anschließend wurden die Tiere ohne AA-Belastung bis zu 144 Tage weiter beobachtet. Bei Applikation von 1 mg/kg KG/Tag AA konnte eine geringfügige Degeneration der Nerven festgestellt werden, welche 25 Tage nach AA-Belastung verschwunden war. Eine Verabreichung von 5 mg/kg KG/Tag AA führte zur Schädigung des peripheren Nervensystems, die nach 111 Tagen ohne AA-Belastungen nicht mehr sichtbar waren. In der höchsten Dosisgruppe konnten sowohl schädigende Effekte auf das periphere als auch auf das

zentrale Nervensystem festgestellt werden. Nach 144 Tagen ohne Belastung waren diese Effekte teilweise oder vollständig reversibel [Burek *et al.*, 1980].

Auf Basis dieser Tierdaten wurde von der *Food and Agriculture Organization of the United Nation/ World Health Organisation* (FAO/WHO) ein NOAEL-Wert von 0,2 mg/kg KG/Tag für die durch AA hervorgerufenen neurotoxische Wirkungen (morphologische Änderungen des Nervensystems) bestimmt [FAO/WHO, 2006; FAO/WHO, 2011].

Zu den durch AA hervorgerufenen neurotoxischen Effekten auf das periphere Nervensystem des Menschen zählen: Kribbeln der Haut, Taubheitsgefühle in den Extremitäten, Ataxie und Muskelschwäche [Calleman *et al.*, 1994; Hagmar *et al.*, 2001]. Im Zuge des bereits erwähnten Tunnelunfalls in Schweden (siehe Kapitel 2.4.2), wurde das Blut von 210 Tunnelarbeitern (207 Männer und 3 Frauen) auf den Gehalt an Hb-Addukten untersucht. Mittels Befragung wurden unterschiedliche durch AA hervorgerufene neurotoxische Effekte erfasst. Dabei konnte eine Korrelation zwischen Hb-Adduktgehalten und dem Auftreten von neurologischen Symptomen beobachtet werden. Mit zunehmender Menge an Addukten nahm die Prävalenz neurotoxischer Effekte wie Gefühllosigkeit in den Füßen und Beinen signifikant zu. Des Weiteren konnten (nicht neurotoxische) Effekte wie Hautablösung an den Händen, Reizung der Augen, Nase und Hals, Husten, Kopfschmerzen und Übelkeit beobachtet werden [Hagmar *et al.*, 2001].

2.4.6.4 Mutagenität

Wie bereits erwähnt, ist AA bzw. dessen Metabolit GA in der Lage an DNA zu binden und somit DNA-Addukte zu bilden. Werden diese nicht von der Zelle erkannt und der Schaden nicht repariert, so kann es zur Mutation der Zelle, einem wichtigen Schritt innerhalb der in Kapitel 2.3 beschriebenen Prozess der Kanzerogenese, kommen.

Im klassischen Ames-Test zur Bestimmung der Mutagenität *in vitro* erwies sich AA, sowohl mit als auch ohne metabolische Aktivierung in verschiedenen *Salmonella typhimurium* Bakterienstämmen als nicht mutagen [ATSDR, 2012]. Nur in den Stämmen TA98 und TA100 konnte eine mutagene Wirkung des aktiven Metaboliten GA beobachtet werden [Hashimoto und Tanii, 1985]. Im Tyrosinkinase (TK) -Test oder Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)-Test konnte, mit und ohne metabolische Aktivierung, eine negative oder schwache mutagene Wirkung des AA auf Säugerzellen (V79-Zellen; AHH-1; HL-60; NB4; TK6) gezeigt werden [ATSDR, 2012; EFSA, 2015]. Als Ursache für die teilweise beobachteten positiven mutagenen Effekte wird die Umwandlung von AA zu GA mit nachfolgender DNA-Adduktbildung diskutiert. Wichtige Voraussetzung dafür ist, dass die Zellen die dafür nötigen CYP-Enzyme exprimieren, damit die Umwandlung stattfinden kann. Ein solcher Zusammenhang konnte von Koyama und Kollegen (2011b) gezeigt werden. Im TK-Test mit TK6-Zellen induzierte AA, ohne metabolische Aktivierung, bei höheren Konzentrationen ab 10 mM schwache Effekte. GA hingegen bewirkte bereits ab 0,5 mM einen konzentrationsabhängigen Anstieg. Ähnliche Beobachtungen konnten hinsichtlich der DNA-Adduktbildungsrate des DNA-Adduktes N7-GA-Gua gemacht werden. Während nach Inkubation der Zellen mit 14 mM AA ohne metabolische Aktivierung bzw. 10 mM mit metabolischer Aktivierung, bis zu 22 bzw. 40 N7-GA-Gua-Addukte pro 10^8 Nukleotide detektiert werden konnten, lag die Anzahl an gemessenen Addukten nach GA-Inkubation (4,8 mM) mit 1100 N7-GA-Gua-Addukte pro 10^8 Nukleotide deutlich erhöht [Koyama *et al.*, 2011b]. Zu den durch AA bzw. GA induzierten Punktmutationen zählen GC AT Transition bzw. GC TA Transversion [Besaratina und Pfeifer, 2005].

Die Mutagenität von AA wurde auch *in vivo* in verschiedenen transgenen Mausmodellen (*Big Blue* Maus und Ratte; Muta Maus; gpt *delta* Maus) untersucht [Krebs und Favor 1997; Manjanatha *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010b; Mei *et al.*, 2010; Koyama *et al.*, 2011; Ishii *et al.*, 2015; Manjanatha *et al.*, 2015]. In einer Studie von Manjanatha und Kollegen (2006) mit männlichen und weiblichen *Big Blue* Mäusen ($n = 6$; pro Dosis und Geschlecht), welche über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen, 0; 100; oder 500 mg/l AA; oder 120; 600 mg/l GA über das Trinkwasser verabreicht wurde, konnte bei höchster Dosisgruppe einen signifikanter Anstieg um das 2–2,5fache der *cII*-Gen-Mutationsrate in

den Leberzellen der Tiere beobachtet werden. Weiterhin konnten vorwiegend GC zu TA Transversions-Mutationen, sowie -1/+1 *Frameshift*-Mutationen im *cII*-Gen detektiert werden. Des Weiteren nahm die Mutationsrate im HPRT-Gen von Lymphozyten signifikant dosisabhängig zu. In höchster Dosisgruppe stieg die Anzahl an HPRT-Mutationen auf das 16–25fache der Kontrollgruppe an [Manjanatha *et al.*, 2006].

Zur Bestimmung dominant letaler Effekte von AA *in vivo*, wurde ein Dominant-Letal-Test an B6C3F1-Mäusen durchgeführt. Männliche CYP2E1-Wildtyp und CYP2E1-*knockout*-Mäuse wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen 0; 12,5; 25 oder 50 mg/kg KG/Tag AA und Dosisgruppe mittels *i. p.*-Injektion verabreicht. Weibliche Tiere erhielten keine AA-Behandlung. Nach Verpaarung der Tiere wurden die trächtigen Weibchen getötet und der Uterus auf die Anzahl an lebenden und toten Embryonen untersucht. Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Anzahl lebender Embryonen in den Wildtyp-Mäusen beobachtet werden. Auch nahm die Häufigkeit dominant letaler Effekte in den Wildtyp-Mäusen zu. In CYP2E1-*knockout*-Mäusen waren diese Beobachtungen nicht zu sehen. AA wirkt somit mutagen auf Keimzellen [Ghanayem *et al.*, 2005b].

Unter REACH-(*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*), einer EU-Chemikalienverordnung, wurde AA als erbgutverändernd der Gruppe 1B gelistet. Solche Stoffe sind damit als wahrscheinlich reproduktionstoxisch eingestuft [Verordnung (EU) 366/2011].

2.4.6.7 Gentoxizität

Die Gentoxizität von AA wurde *in vitro* in verschiedenen Testsystemen (Chromosomenaberration (CA)-Test, Mikrokern (MK)-Test, Schwesterchromatidaustausch-Test (*sister chromatid exchange*, SCE) und Einzelzellgelelektrophorese (*Comet Assay*) untersucht [EFSA 2015; ATSDR, 2012]. Eine Induktion von CA, MK und SCEs konnte nach AA-Behandlung von Säugerzellen, ohne metabolische Aktivierung, bzw. auch nach GA-Behandlung, beobachtet werden [Baum *et al.*, 2005; Koyama *et al.*, 06; Matins *et al.*, 2007; Katic *et al.*, 2010; Pingarilho *et al.*, 2013]. Im Comet Assay mit humanen Lymphozyten erwies sich AA als nicht gentoxisch, GA hingegen schon [Baum *et al.*, 2005; Koyama *et al.*, 06]. Aneugene

Effekte (Störung des Spindelapparates, Polyploidie und Aneuploidie) in *in-vitro*-Studien konnten in der chinesischen Hamsterfibroblasten-Zelllinie V79 nachgewiesen werden [ATSDR, 2012]. Ebenso konnten klastogene Effekte *in vitro* an V79 und humanen Lymphozyten nach AA-Behandlung gezeigt werden [Martins *et al.*, 2007; Pingarilho *et al.*, 2013]. Zur Bestimmung der gentoxischen Wirkung von AA und GA mittels Chromosomenabberationstest wurden V79 für einen Zeitraum von 16 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (bis zu 2 mM) an AA und GA behandelt. Zu den am häufigsten beobachteten Effekten zählten dabei Chromatiden-Brüche sowie Chromatiden-Gaps. Mit zunehmender Konzentration an Substanz nahm der Effekt zu. Aufgrund der fehlenden CYP2E1-Expression in V79-Zellen schlossen die Autoren darauf, dass für die gentoxische Wirkung von AA ein anderer Wirkmechanismus als die Umsetzung zu GA verantwortlich ist [Martins *et al.*, 2007]. Eine mögliche Erklärung für die Beobachtung von gentoxischen Effekten, verursacht durch hohe Dosen (mM-Bereich) der Verbindung AA *in-vitro*-Studien –ohne metabolische Aktivierung– ist die Bildung von ROS und oxidativem Stress sowie die damit einhergehende DNA-Schädigung. Jiang und Kollegen (2007) führten hierzu Untersuchungen an HepG2-Zellen, einer humanen Leberkarzinomzelllinie, durch. Nach 24h-Inkubation der Zellen konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme von Mikrokernen beobachtet werden. Um eine Assoziation zwischen diesen Effekten und oxidativem Stress herzustellen, wurden weitere Tests durchgeführt. Die Bestimmung von ROS erfolgte mittels 2,7-Dichlorfluorescein (DCF)-Assay. Nach einstündiger Inkubation der Zellen konnte eine dosisabhängige Zunahme an ROS über den gesamten Dosisbereich (0–40 mM) beobachtet werden. Ab 10 mM wichen die ROS-Gehalte signifikant von der Kontrolle ab. Des Weiteren wurde die Bildung von 8-Hydroxyguanosin (8-OHdG) nach dreistündiger Inkubationsdauer mittels immunochemischer Analyse bestimmt. Die Menge an 8-OHdG nahm über den gesamten Testbereich (0–20 mM) zu und wich ab 5 mM bereits signifikant von der Kontrolle ab [Jiang *et al.*, 2007]. Auch die Bildung von oxidativem Stress in Folge einer GSH-Depletion wird diskutiert. Um einen solchen Zusammenhang aufzuzeigen wurden HepG2-Zellen für 16 h mit Buthioninsulfoximin (BSO) behandelt, um eine GSH-Depletion in den Zellen zu bewirken. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Dosen AA (0–80 mM AA) behandelt. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde ein 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

bromid-(MTT)-Test durchgeführt. Verglichen mit Zellen, welche nicht mit BSO vorinkubiert wurden, war die Viabilität in den mit BSO behandelten Zellen erniedrigt. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass die durch AA verursachte zytotoxische Wirkung in Folge erniedrigter intrazellulärer GSH-Gehalte und somit einem verringerten Schutz gegenüber ROS einhergeht [Jiang *et al.*, 2007].

Zur Bestimmung der Gentoxizität *in vivo* wurden folgende Testsysteme angewandt: Mikrokern Test, Comet Assay und UDS-Test (*unscheduled DNA synthesis*; Unplanmäßige (außerplanmäßige) DNA-Synthese). Mei und Kollegen (2010) verabreichten männlichen und weiblichen *Big Blue* Ratten über einen Zeitraum von 2 Monaten über das Trinkwasser 50–60 mg/l AA bzw. 100–120 mg/l GA (0,7 mM AA bzw. 1,4 mM GA). 24 h nach letzter Exposition wurde den Tieren Blut entnommen und dieses auf den Gehalt an Mikrokernen untersucht. Es konnte keine signifikante Erhöhung der Mikrokern-Retikulozyten beobachtet werden. Als Ursache für das Ausbleiben von positiven Effekten wurde unter anderem die geringe Dosis, sowie die geringere Sensitivität gegenüber AA bei Ratten (verglichen mit Mäusen) diskutiert [Mei *et al.*, 2010]. Nach Verabreichung von höheren Dosen konnten hingegen positive Effekte aufgezeigt werden. Yener und Dikmenli (2009) verabreichten männlichen Sprague-Dawley-Ratten einmalig mittels Schlundsonde 0; 125; 150; oder 175 mg/kg KG AA. 48 h nach Applikation wurden die Tiere getötet und das Knochenmark der Ratten untersucht. Es konnte eine dosisabhängige Zunahme an Mikrokernen in polychromatischen Erythrozyten gezeigt werden. Bei höchster Dosierung waren diese um das 3,75fache verglichen mit der Kontrolle erhöht [Yener und Dikmenli, 2009]. In männlichen *Big Blue* Mäusen konnte, bereits bei geringen Konzentrationen an AA, eine Zunahme der Mikrokern-Retikulozyten gezeigt werden. In einer Studie von Manjanatha und Kollegen (2006) mit männlichen *Big Blue* Mäusen ($n = 4$ AA; $n = 6$ GA) konnte nach vierwöchiger Verabreichung von 500 mg/l AA (98 mg/kg KG/Tag) bzw. 600 mg/l GA (88 mg/kg KG/Tag) über das Trinkwasser, eine signifikante Erhöhung der Mikrokern-Retikulozyten, um das 3,3fache bzw. 1,7fache zur Kontrolle gezeigt werden [Manjanatha *et al.*, 2006]. Im Comet Assay erwies sich AA in unterschiedlichen Geweben (Target und Nontarget) als positiv [Manière *et al.*, 2005; Dobrzynska, 2007; Recio *et al.*, 2010; Rothfuss *et al.*, 2010; Koyama *et al.*, 2011a]. Im *in-vivo*-Test auf außerplanmäßige DNA-Synthese konnten abhängig von der Applikationsdauer und des untersuchten

Gewebes positive und negative Effekte aufgezeigt werden. Männliche F344-Ratten erhielten einmalig 100 mg/kg KG AA bzw. an fünf aufeinander folgenden Tagen 30 mg/kg KG AA mittels Schlucksonde. Während nach einmaliger Gabe von AA weder in den Spermatozyten noch in den Hepatozyten ein Anstieg von UDS sichtbar war, nahm diese nach wiederholter Applikation in den untersuchten Spermatozyten zu [Butterworth *et al.*, 1992].

2.4.6.2 Kanzerogenität

Zur Bestimmung der Kanzerogenität wurden verschiedene Zwei-Jahres-Nagerstudien an Ratten und Mäusen durchgeführt [Johnson *et al.*, 1986; Friedman *et al.*, 1995; NTP 2012; Beland *et al.*, 2013; Maronpot *et al.*, 2015]. In einer Zwei-Jahres-Studie an weiblichen und männlichen B6C3F1-Mäusen ($n = 48$; pro Dosisgruppe und Geschlecht), wurde den Tieren 6,25; 12,5; 25 oder 50 ppm AA über das Trinkwasser verabreicht. Bei den männlichen Tieren konnten folgende Beobachtungen gemacht werden: für alle Dosisgruppen konnte eine Zunahme der Inzidenz von Adenomen und Adenokarzinomen der Harderschen Drüse beobachtet werden. Eine Verabreichung von 12,5 und 50 ppm AA führte zu einer signifikanten Zunahme der Inzidenz alveolarer/bronchiolarer Adenome und Karzinome. Bei Applikation von 25 und 50 ppm AA stieg die Inzidenz an Vormagen-Plattenepithel-Papillomen und Karzinomen signifikant an. Bei den weiblichen Tieren konnten ähnliche Effekte aufgezeigt werden. Ein Anstieg der Inzidenz an Adenomen der Harderschen Drüse konnte bei allen Dosisgruppen beobachtet werden, während Adenoakanthome und Adenokarzinome der Brustdrüsen erst ab 12,5 ppm AA detektiert werden konnten. Des Weiteren konnten nach Verabreichung ab 25 ppm AA alveolare/bronchiolare Adenome und Karzinome, sowie maligne mesenchymale Hauttumore und benigne Eierstockgranulosazelltumore festgestellt werden. Nach Applikation von 50 ppm AA wurden benigne Veränderungen der Eierstock-Granulosazellen und Adenoakanthome der Milchdrüse beobachtet. Eine ähnliche Studie wurde an weiblichen und männlichen F344/N-Ratten ($n = 48$; pro Dosisgruppe und Geschlecht) durchgeführt. Die verabreichte Menge, sowie die Applikationsart waren identisch mit der Zwei-Jahres-Maus-Studie. Bei den männlichen Tieren konnten in der höchsten Dosisgruppe signifikant erhöhte Inzidenzen für maligne Nebenhoden und Hodenhaut Mesotheliome, Adenome der Langerhans-Inselzellen, sowie Adenome

und Karzinome des Follicularepithels der Schilddrüse festgestellt werden. Bei den weiblichen Tieren konnte ab einer Verabreichung von 12,5 ppM Fibroadenome der Schilddrüse beobachtet werden. Bei der höchsten Dosis wurden verschiedene neoplastische Veränderungen, wie Schleimhautplattenepithelpapilome und Karzinome, Hautfibrome, Fibrosarkome, Adenome und Karzinome des Folikelepithels der Schilddrüse, festgestellt [NTP, 2012].

Neben Nagerstudien existiert eine Reihe von epidemiologischen Studien, in welchen ein möglicher Zusammenhang zwischen AA-Aufnahme und Krebs-Inzidenz untersucht wurde (EFSA, 2015). Eine Metaanalyse von 32 Humanstudien (Stand vor Juli 2014) kam zu dem Ergebnis, dass für die meisten Krebsarten keine Assoziation zwischen AA-Aufnahme und Tumorbildung existiert. Ein leicht erhöhtes relatives Risiko (RR) konnte jedoch bei Nichtrauchern für Nierenkrebs (RR = 1,2; mit 95 % Konfidenz-Intervall (CI) 1,00–1,45), Gebärmutterkrebs (RR = 1,23; mit CI 1,00–1,51) und Eierstockkrebs (RR = 1,39; mit CI 0,97–2,00) beobachtet werden [Pelucchi *et al.*, 2015].

Bereits 1994 wurde AA von der *International Agency for Research on Cancer (IARC)* als wahrscheinlich krebserzeugend für den Menschen (Gruppe 2A) eingestuft. Da es sich bei der Chemikalie sowohl um eine Lebensmittelkontaminante als auch um eine in großem Maßstab hergestellte Industriechemikalie handelt, wurde AA in der REACH-Verordnung erfasst. Im Jahre 2010 wurde AA in die Kandidatenliste der besonders besorgniserregenden Stoffe aufgenommen und 2011 im Anhang XVII als wahrscheinlich krebserzeugend für den Menschen (Gruppe 1B) gelistet [Verordnung (EU) 366/2011]. Die krebserzeugende Wirkung von AA ist vermutlich auf die Umwandlung von AA zu GA, welches mit der DNA interagieren und einen DNA-Schaden verursachen kann, zurückzuführen [EFSA, 2015].

2.5 Risikobewertung und Humanes Biomonitoring

2.5.1 Allgemeines

Wie in vorangehendem Kapitel beschrieben, handelt es sich bei AA um einen toxikologisch bedenklichen Stoff. Durch die ungewollte Bildung im LM, oder im Zigarettenrauch ist der Mensch diesem kontinuierlich ausgesetzt. Um den Menschen vor möglichen Gesundheitsgefahren durch Gefahrstoffe zu schützen, dient die Risikobewertung von Stoffen. Mittels dieses Konzepts werden mögliche Gefahrstoffe erkannt und Maßnahmen, wie z. B. das bereits erwähnte ALARA-Konzept, getroffen. Ziel ist es somit ein Risiko, wie durch AA verursachte adverse Effekte zu minimieren und letztlich den Menschen zu schützen. Ein wichtiger Teil der Risikobewertung stellt das HBM dar, mit welchen beispielsweise die tatsächliche AA-Belastung eines Individuums bestimmt werden kann. Mittels HBM kann die Exposition von AA für einzelne Personen ermittelt und somit die individuelle Belastung bestimmt werden.

2.5.2 Risikobewertung

Die Risikobewertung (*Risk assessment*) von Stoffen dient der Erfassung von Exposition und Anwendungsbereichen von Substanzen, von welchen bereits während der Herstellung, Verwendung und Beseitigung ein Risiko ausgeht, das Anlass zur Besorgnis gibt und Maßnahmen zur Senkung des Risikos erfordern.



Abbildung 08: Ablauf der Risikobewertung [mod. nach BfR, 2010].

Wie in Abbildung 08 gezeigt ist, wird das Konzept der Risikobewertung in vier Schritte unterteilt. Eingeleitet wird das Konzept mit der Identifikation möglicher Gefahrenquellen (*hazard identification*) [BfR, 2010]. Als Gefahrstoff, werden Stoffe oder Gemische bezeichnet, von denen physikalisch-chemische Eigenschaften (z. B. leicht entzündlich, explosionsgefährlich), gesundheitsschädliche Eigenschaften für den Menschen (z. B. akute Toxizität, kanzerogene, mutagene oder reproduktionstoxische Eigenschaften u. a.) und/ oder umweltschädigende Eigenschaften (z. B. schädlich für Wasserorganismen, die Ozonschicht schädigend u. a.) ausgehen. Gefahrstoffe weisen somit potenziell gefährliche Eigenschaften auf [Gefahrstoff-Verordnung]. Erst die Exposition mit dem Gefahrstoff stellt ein Risiko (möglicher adverser Effekte) für den Menschen oder die Umwelt dar [Gefahrstoff-Verordnung].

Die Identifizierung möglicher Gefahrenquellen führt zu einer qualitativen Beschreibung inhärenter Stoffeigenschaften, sowie Bedingungen, unter denen sich solche Stoffeigenschaften manifestieren können. Als Datenquelle dienen (sofern vorhanden) Humandaten, Ergebnisse aus Tierversuchen und *in-vitro*-Studien [Kahl und Timm, 2003]. Im nächsten Schritt der Risikobewertung erfolgt die Charakterisierung des Gefährdungspotentials (*hazard characterisation*), mittels qualitativer und/oder quantitativer Beurteilung, der von der bereits zuvor identifizierten Gefahrenquelle, ausgehenden gesundheitsschädlichen Wirkung. Wichtige Bestandteile des Gefährdungspotentials umfassen folgende Bereiche: Toxikokinetik/Pharmakokinetik, Toxikodynamik (akute und chronische Toxizität, Gentoxizität, Kanzerogenität und Reproduktionstoxizität), Dosis-Wirkungsabschätzungen, sowie toxikologische und epidemiologische Kenngrößen. Im darauffolgenden Schritt erfolgt die quantitative und/oder qualitative Abschätzung der Exposition des Menschen unter Berücksichtigung aller relevanten Expositionspfade (*exposure assessment*). Neben Angaben exponierter Bevölkerungsgruppen werden ggf. auch unterschiedliche Belastungssituationen berücksichtigt. Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Exposition zu bestimmen. Eine Möglichkeit ist die Bestimmung der Exposition aufgrund von Verzehrdaten oder Gehaltsdaten der Substanz im Lebensmittel. Ein weiterer Ansatz ist die Bestimmung der Exposition mittels der im HBM erhaltenen Daten.

Im letzten Teil der Risikobewertung erfolgt die Charakterisierung des konkreten Risikos (*risk characterisation*) mittels quantitativer und/oder qualitativer Einschätzung der Häufigkeit und Schwere der von der Gefahrenquelle ausgehenden gesundheitsschädlichen Auswirkung [BfR, 2010].

Für genotoxische Kanzerogene gilt das Minimierungsprinzip (ALARA). Eine ausführliche Erläuterung dieses ALARA-Konzepts erfolgt in Kap. 2.4.3. Die Bewertung hinsichtlich der Gefährdung für den Menschen, die von einer Substanz ausgeht, geht aus dem ALARA-Konzept nicht hervor. Um verschiedene Substanzen dahingehend zu vergleichen wurde ein weiteres Konzept, das sogenannte *Margin of Exposure (MoE)*-Konzept, entwickelt. Der MoE-Wert, eine dimensionslose Zahl, ergibt sich aus dem Verhältnis der im Tierversuch festgestellten oder berechneten Effektdosis für eine gegebene Tumorzinzenz und der Exposition des Menschen. Als Größe zur Berechnung des MoE-Wertes eignet sich der sogenannte *BMDL₁₀*-Wert (*benchmark dose lower confidence limit*), abgeleitet aus der Dosis-Wirkungskurve des Tierversuches. Dieser Wert gibt Auskunft über die kleinste Dosis, die im Tierexperiment mit 95%iger Sicherheit eine Tumorzinzenz von nicht mehr als 10 % verursacht. Je kleiner der MoE-Wert ist (< 10000), desto größer ist das Gesundheitsrisiko und desto dringlicher werden Minimierungsmaßnahmen. Der Wert 10000 resultiert aus vier Unsicherheitsfaktoren [BfR, 2005].

Die Bewertung von nicht genotoxischen kanzerogenen Stoffen erfolgt mittels ADI/TDI-Konzept. Der ADI-Wert (*acceptable daily intake*) gibt die tolerierbare tägliche Aufnahme von Stoffen wieder, von der für den Menschen kein erkennbares Gesundheitsrisiko ausgeht. Ausgenommen werden dabei LM- und Futtermittelkontaminanten, bei denen der TDI-Wert (*tolerable daily intake*) die täglich duldbare Aufnahme angibt. Zur Ableitung des TDI/ADI wird aus Tierversuchen oder epidemiologischen Studien ein NOAEL-Wert ermittelt. Der NOAEL-Wert beschreibt die höchste Konzentration oder Menge einer Substanz, bei der nach Exposition keine nachweisbaren adversen Veränderungen des Organismus auftreten. Die Bildung des Quotienten aus NOAEL und einem Unsicherheitsfaktor ergibt den ADI/TDI-Wert. Oft wird ein Sicherheitsfaktor von $10 \cdot 10$, welcher

Intraspezies- und Interspezies-Unterschiede berücksichtigt, verwendet [Kahl und Timm, 2003; Fischer und Glomb; 2015].

2.5.3 Humanes Biomonitoring

Als HBM wird die Untersuchung von menschlichen Körperflüssigkeiten und Geweben auf die Belastung mit Schadstoffen bezeichnet. Ziel ist es dabei die tatsächliche Exposition des Menschen gegenüber Schadstoffen zu erfassen um damit möglicherweise zur Prävention Schadstoff-bedingter Erkrankungen des Menschen beizutragen. Ein Haupteinsatzgebiet des HBM ist daher die Arbeits- und Umweltmedizin. Das Biomonitoring kann in Belastungs- und Effektmonitoring unterteilt werden. Ersteres dient der Quantifizierung der inneren Belastung eines Schadstoffes mittels einmaliger oder wiederholter Messung der Konzentration von Stoffen oder deren Metaboliten in humanen biologischen Materialien wie Blut, Harn und Gewebe. Das Belastungsmonitoring (BM) spiegelt die tatsächliche Belastung eines Organismus mit dem Schadstoff, unabhängig der Expositionsart, wider. Das Effektbiomonitoring (EM) hingegen gibt die Beanspruchung, der aus der Belastung (inneren und äußere Exposition) resultierenden biochemischen und biologischen Effekte, an. Die Konzentration von Chemikalien in der Umwelt wird im Umweltmonitoring als äußere Exposition bezeichnet. Im HBM dient das EM der Untersuchung von biochemischen (DNA- und Proteinaddukten) oder biologischen Parameter (zytogenetische Parameter z. B. Chromosomenaberrationen, Mikrokerne, Schwesterchromatidaustausch), die eine Wirkung des Schadstoffes anzeigen. Mittels einmaliger oder wiederholter Messung werden im EM biologischer Größen erfasst, welche eine Belastung durch biologische, chemische oder physikalische Faktoren reagieren oder deren Wirkung anzeigen (Wirkungsparameter). Aufgrund der Tatsache, dass Wirkparameter bis auf wenige Ausnahmen unspezifisch sind, können diese oftmals nur in Zusammenhang mit Belastungsparametern betrachtet werden [Sattelberger, 2007]. Während das BM zwar hochspezifisch für den Schadstoff ist, jedoch keine Aussagen zur Wirkung einer Substanz erlaubt, geben Effektbiomarker Informationen über die Wirkung eines Schadstoffes, nicht jedoch darüber welcher Schadstoff welchen Effekt induziert, wieder [Sattelberger, 2007]. Eine abschließende Darstellung einzelner Arten des Biomonitoring und deren Bedeutung für die Risikoabschätzung ist in Tabelle 08 aufgeführt [BfR, 2010].

2. Theorie

Tabelle 08: Bedeutung des Biomonitoring für die Risikoabschätzung. Mit UBM: Umweltbiomonitoring; HBM: humanes Biomonitoring; BM: Belastungsmonitoring und EB: Effektbiomonitoring [mod. nach Marquardt *et al.*, 2013].

Arte des BM	Wirkung	Analyse-medium	Analyse/Diagnose von	Bedeutung für die Risikoabschätzung
UBM	Äußere Belastung	Luft, Wasser, Boden, LM	Chemikalien	-
HBM (BM)	Innere Belastung	Blut, Harn	Chemikalien, Metabolite	+
HBM (EM)	Biochemische Effekte	Blut, Harn	Protein-, DNA-Addukte	++
HBM (EM)	Biologische Effekte	Blut, (Harn)	Cytogenetischen Effekten	++

2.6 Verwendete Biomaterialien und Tiermodelle

2.6.1 Blut und seine Bestandteile

In vorliegender Arbeit wurde das Blut von gesunden Probanden auf den Gehalt an *N7-GA-Gua*, untersucht. Blut setzt sich aus festen und flüssigen Bestandteilen zusammen. Die festen Blutbestandteile bilden die Blutzellen. Je nach Zelltyp wird dabei in rote Blutzellen (Erythrozyten), weiße Blutzellen (Leukozyten) und Blutplättchen (Thrombozyten) differenziert (Abbildung 09).

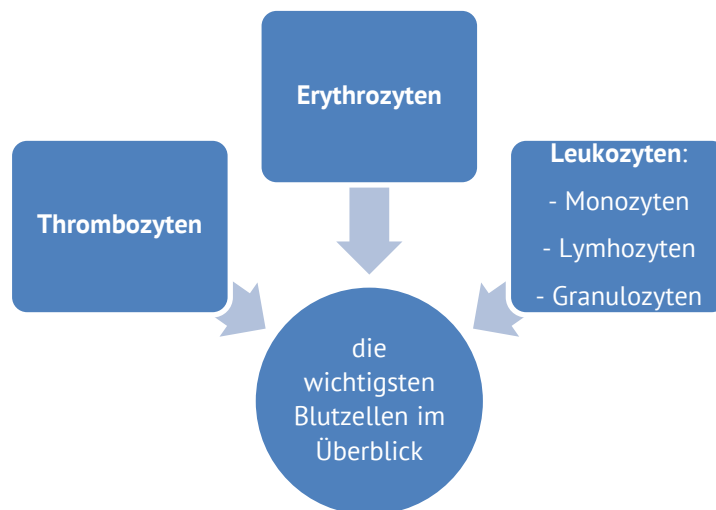


Abbildung 09: Übersicht über alle drei Klassen von Blutzellen.

Die flüssigen Bestandteile des Blutes werden als Blutplasma bezeichnet. Typische Bestandteile dieser Flüssigkeit sind Zucker, Proteine, Fettsäuren und Enzyme. Den mengenmäßig größten Anteil an Zellen im festen Bestandteil bilden mit 4,5–5,5 Mio Zellen/ μl die Erythrozyten. Ihre Hauptaufgabe liegt im Transport von Sauerstoff. Den zweitgrößten Anteil der Blutzellen mit 150000–300000 Zellen/ μl stellen die Thrombozyten dar, welche maßgeblich am Prozess der Blutstillung beteiligt sind. Bei einer (offenen) Schnittverletzung kommt es zur Aggregation von Thrombozyten, welche mit einem Stoppen der Blutung und einer Krustenbildung der Wunde einhergeht. Den mengenmäßig geringsten Anteil an Zellen im Blut, bilden mit 4000–11000 Zellen/ μl die Leukozyten. Diese übernehmen wichtige Aufgaben in der allgemeinen und spezifischen Immunabwehr und sind damit maßgeblich an der Funktionalität des Immunsystems beteiligt. Aufgrund ihrer

unterschiedlichen Morphologie werden Leukozyten in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten unterteilt. Während Granulozyten und Monozyten an der nichtadaptiven Immunantwort beteiligt sind, tragen Lymphozyten zur adaptiven Immunantwort bei. Zu den Lymphozyten zählen, neben den B- und T-Lymphozyten auch die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Reifen die Zellen im Knochenmark heran, werden diese als B-Lymphozyten bezeichnet. Findet der Reifungszustand im Thymus statt, handelt es sich um T-Lymphozyten. Während B-Lymphozyten in Folge einer Lymphokinproduktion an der zellvermittelten Immunantwort beteiligt sind, sind die T-Zellen maßgeblich an der humoralen Immunantwort beteiligt, indem diese Immunglobuline sezernieren [Kiefel, 2010]. NK-Zellen tragen zur Immunantwort bei, indem diese Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen erkennen und mittels zellvermittelter Zytotoxizität zerstören [Römpp, 2011].

Neben ihrer Funktion als Immunzellen sind Lymphozyten in der Lage sowohl Phase-I- als auch Phase-II-Enzyme zu exprimieren. Raucy und Kollegen (1999) untersuchten die Aktivität verschiedener CYPs und Phase-II-Enzyme auf RNA-Ebene mittels Polymerase-Kettenreaktion (*realtime polymerase chain reaction*; RT-PCR) und postulierten dabei, dass die CYP2E1-Gehalte vergleichbar mit Enzymaktivitäten in der Leber *in vivo* sind [Raucy *et al.*, 1999]. Als Phase-I-Enzym katalysiert CYP2E1 die Umwandlung, der in vorliegender Arbeit wichtigen Verbindung AA, zum Metaboliten GA. Auch die Aktivität der Epoxidhydrolase, welche ein wichtiges Phase-II-Enzym der Detoxifizierung des für diese Arbeit thematisierten GA zum Glyceramid darstellt, ist in frischen Lymphozyten mit den Werten in der Leber vergleichbar [Omiecinski *et al.*, 1993; Sumner *et al.*, 1992].

2.6.2 Tiermodelle

Nachfolgend werden die einzelnen Tiermodelle vorgestellt, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden. Es wurden unterschiedliche Spezies (Ratte und Maus) verwendet, welche im weiteren Verlauf ausführlicher beschrieben werden.

2.6.2.1 Wistar-Ratte

Zur Isolation von Hepatozyten wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich männliche Wistar-Ratten verwendet. Dieser leicht zu züchtende Auszucht-Albino-Ratten-Stamm wurde 1906 erstmals am *Wistar Institute* (USA) entwickelt und gezüchtet. Als erster Ratten-Modellorganismus wird die Wistar-Ratte auch heute noch sehr gerne in verschiedenen Forschungsdisziplinen der Medizin und Biologie eingesetzt. Aufgrund von Eigenschaften wie z. B. Langlebigkeit und geringer Inzidenz für Tumorerkrankungen werden Wistar-Ratten sehr gerne in Langzeitstudien verwendet. Zu weiteren Anwendungsgebieten zählen Infektionskrankheiten, Onkologie, Pharmakologie, Physiologie, Stoffwechsel, Teratologie und Toxikologie [JanvierLabs, 2017]. Neben isolierten Hepatozyten wurde den Tieren Milz, Nieren und Lunge entnommen und auf den Gehalt an *N7-GA-Gua* untersucht. Mit den gewonnenen Hepatozyten wurden Inkubationsversuche durchgeführt, bei welchem die Zellen über unterschiedliche Zeiträume mit unterschiedlichen Konzentrationen an AA behandelt wurden, um eine mögliche zeit- und konzentrationsabhängige Bildung des *N7-GA-Gua* zu untersuchen.

2.6.2.2 C57BL/6JRj-Maus

Wie bereits Kapitel 2.4 beschrieben, ist der Metabolismus von Ratte und Maus verschieden, sodass Mäuse AA stärker zu GA umsetzen und daher empfindlicher für Addukt-Bildungsversuche sind. Um mögliche Speziesunterschiede zu untersuchen, wurde die C57BL/6JRj-Maus als weiteres Tiermodell, eingesetzt. Es handelt sich beim C57BL/6, oftmals auch als „black6“, „B6“ oder „C57Black“ bezeichnet [Fontaine und Davis, 2016], um einen Inzucht-Maus-Stamm, welcher von C.C. Little, dem Gründer des *Jackson Laboratory*, im Jahre 1921 entwickelt wurde. Erstmals wurden die Tiere am *Jackson Laboratory* (JAX) gezüchtet. Tiere aus dieser Zucht werden als C57BL/6J bezeichnet, wobei das J auf JAX

hindeutet. Im Jahre 1951 wurde eine Kolonie der Tiere (F32) dem National Institute of Health (NIH) übergeben, woraus eine weitere Sublinie, namentlich C57BL/6N entstanden ist, wobei N auf NIH hindeutet [JanvierLabs, 2017; Fontaine und Davis, 2016]. Die vollständige Entschlüsselung des Genoms der J-Linie, ermöglicht die Expression einer Vielzahl an Mutationen und damit die Entwicklung von transgenen Tiermodellen. Zu den typischen Anwendungsgebieten dieses Stammes zählen: Immunologie, Kardiologie, Neurobiologie, Onkologie und Toxikologie. C57BL/6JRj-Mäuse neigen zu einer durch Fütterung induzierten Entwicklung von Diabetes Typ2 und Arteriosklerose. Mit zunehmendem Alter neigen die Tiere zudem zu Hörverlusten. Für vorliegende Arbeit wurde den Tieren Lunge, Leber und Nieren, entnommen.

2.6.2.3 BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Maus

Um mögliche Abhängigkeiten der Stoffwechsellage auf die Bildung von N7-GA-Gua auszuschließen oder gar aufzuzeigen, wurde ein weiteres Tiermodell eingesetzt. Es handelt sich bei der BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Maus um eine diabetische Inzucht-Maus, mit Punktmutation im Leptin-Rezeptor-Gen (*Lepr*), welche auf dem genetischen Hintergrund einer C57BL/6J fixiert wurde [JanvierLabs, 2017]. Die Mutation im Leptin-Rezeptor-Gen führt bei Db/db-Mäusen zu einer fehlerhaften Synthese des Leptin-Rezeptors und einem damit einhergehenden Funktionsverlust des Rezeptors. Die Mäuse sind daher resistent gegenüber Leptin, einem Hormon, welches (zusammen mit Insulin) im Hypothalamus die Langzeitregulation der Nahrungsaufnahme durch anorexigene Wirkung steuert. Des Weiteren verringert das Leptin die periphere Wirksamkeit von Insulin und hemmt dessen Ausschüttung [Hick und Hick, 2013]. Die Tiere neigen daher zur Gewichtszunahme und daraus resultierenden Hyperinsulinämie, Hyperglykämie mit Glukosetoleranz, Hyperleptinämie, Atrophie der Langerhans-Inseln und Insulinresistenz [Hummel *et al.*, 1966; Mao *et al.*, 2006; Uchida *et al.*, 2005]. Zu den typischen Anwendungsgebieten dieses Mausstammes zählen vor allem: Diabetes Typ II, sowie damit assoziierte Pathologien (Übergewicht, periphere Neuropathie, Herzmuskelkrankheiten, verzögerte Wundheilung) [JanvierLabs, 2017]. Auch bei den Diabetes Tieren wurde die Lunge, Leber, und Nieren, entnommen.

2.7 Analytik

2.7.1 Allgemeines

Nachfolgend werden sowohl die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie als auch deren Kopplung mit der Massenspektrometrie vorgestellt. Ziel dieser Arbeit war es eine solche analytische Methode zu entwickeln. Diese sollte sensitiv genug sein, um damit selbst in unbehandelten Proben eine Hintergrundbelastung von AA aufzudecken.

2.7.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Chromatographie bezeichnet ein physikalisch-chemisches Verfahren zur Auftrennung von Substanzmischungen aufgrund unterschiedlicher Verteilung der Einzelkomponenten zwischen einer immobilen (stationären) und einer beweglichen (mobilen) Phase. Das Prinzip chromatographischer Methoden ist auf Untersuchungen des russischen Botanikers Michail Tswett (1872–1919) zurückzuführen. 1906 veröffentlichte Tswett eine Studie zur Auftrennung von Blattfarbstoff-Extrakten in die darin enthaltenen Pflanzenpigmente der Chlorophylle, Xanthophylle und Carotine. Zur Isolation mittels Säulenflüssigkeitschromatographie diente eine mit Calciumcarbonat gefüllte Glassäule. Das dabei angewendete Verfahren bezeichnete dieser als Chromatographie, abgeleitet von den griechischen Wörtern *chroma* (Farbe) und *graphein* (schreiben) [Tswett, 1906].

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) stellt eine Weiterentwicklung der klassischen Säulenflüssigkeitschromatographie dar. Der Einsatz kleinerer Partikelgrößen, sowie die Verbesserung der Instrumentalisierung bei HPLC-Anlagen führten zu einer deutlich besseren Effizienz der Chromatographie. Mit der Entwicklung von UHPLC (*ultra high performance liquid chromatography*), seit Anfang des Jahres 2000, erfolgte eine weitere Effizienz-Steigerung. UHPLC-Säulen nutzen sub-2µm Partikel, wodurch höhere Säulenrückdrücke von bis zu 1200 Bar möglich sind [Römpp, 2017]. Als mobile Phase dienen unterschiedliche Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische, welche mit hohem Druck über die Säule gepresst werden und dabei den Analyten über die Säule transportieren. Eine wichtige Voraussetzung zur

Durchführung einer UHPLC-Analyse ist daher, dass der Analyt in Lösungsmittel löslich ist [Matissek *et al.*, 2014].

Ein HPLC bzw. UHPLC-System besteht aus folgenden Komponenten [Matissek *et al.*, 2014]:

- Vorratsgefäße für mobile Phase
- Entgaser
- eine oder mehrere Pumpen
- Injektor
- Säule: chromatographische Trennung
- Detektor
- Auswerteeinheit

Je nach Fragestellung existiert eine Vielzahl an unterschiedlichen Phasenfüllmaterialien. Prinzipiell wird in drei Klassen von stationären Phasen eingeteilt. Normalphasen enthalten als stationäre Phase relativ polare Füllmaterialien mit hoher spezifischer Oberfläche, wie z. B. Kieselgel. Auch chemisch gebundene Phasen mit funktionellen Gruppen, wie z. B. Diol, Amin und weitere werden als stationäre Phasen eingesetzt. Als mobile Phase dienen relativ unpolare Lösungsmittel wie z. B. Heptan bis Tetrahydrofuran (THF). Der zugrundeliegende Mechanismus der Trennung beruht in der Normalphasen-Chromatographie auf der unterschiedlichen relativen Affinität bzw. Adsorption des Analyten mit der stationären Phase. Anders in der *Reversed-Phase* (RP)-Chromatographie (Umkehrphasen-Chromatographie). Als stationäre Phase dient modifiziertes Kieselgel, bei welchem die endständigen OH-Gruppen durch chemische Reaktion verändert wurden. Dabei werden Alkylreste oder beliebige funktionelle Gruppen eingeführt, sodass unpolare stationäre Phasen entstehen. Als mobile Phase dienen stark polare Lösungen wie Wasser oder Mischungen von Wasser mit Acetonitril oder Methanol [Matissek *et al.*, 2014]. Eine dritte Klasse von stationären Phasen bilden HILIC-Phasen (*hydrophilic interaction liquid chromatography*). Der zugrundeliegende Mechanismus der Trennung beruht auf einer Art Verteilungschromatographie. HILIC-Anwendungen eignen sich insbesondere für sehr stark polare Analyten. Während die stationäre Phase polar ist und damit an Normalphasen

erinnert, werden als mobile Phase organisch-wässrige mobile Phasen eingesetzt. Die Besonderheit von HILIC-Phasen besteht in einer permanenten Wasserschicht zwischen Adsorptionsfläche der stationären Phase und dem organischen Anteil der mobilen Phase, sofern die mobile Phase nicht 100% organisch ist [Gey, 2015]. HILIC-Phasen eignen sich gut für LC-MS-Anwendungen, da der hohe Anteil an organischem Lösungsmittel der mobilen Phase während der Elektronenspray-Ionisation (ESI) schnell verdunstet und somit die Sensitivität der Methode steigert [Buszewski und Noga, 2012].

2.7.3 Massenspektrometrie und Kopplung mit HPLC

Das Prinzip der Massenspektrometrie basiert auf Trennung und Messung von Ionen unterschiedlicher Masse entsprechend ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z). Ein Massenspektrometer besteht aus folgenden Komponenten [Matissek *et al.*, 2014]:

- Einlass-System für die Probe
- Ionenquelle zur Erzeugung von Ionen:
(Chemische Ionisation, chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck, Elektronenstoßionisation, Elektronensprayionisation, induktiv gekoppeltes Plasma, Matrix-unterstützte Laserdesorption)
- Massenanalysator zur Auftrennung eines Ionengemisches:
(Quadrupole, Ionenfallen, Flugzeit-Analysatoren, Hybrid-Massenspektrometer)
- Ionendetektor zum Empfang und Verstärkung des massespezifischen Signals

Mittels Einlass-System gelangt die Probe zur Ionenquelle, in welcher eine Ionisierung der Probe erfolgt. Es gibt verschiedene Arten von Ionisationstechniken. Bei Kopplung aus Massenspektrometer (MS) und HPLC muss vor Ionisierung das Lösungsmittel entfernt werden. Eine wichtige Ionisierungstechnik ist die ESI. Es handelt sich bei dieser Ionisierungsmethode um eine weiche Ionisierungstechnik. Die Vernebelung der Probe erfolgt in Anwesenheit eines heißen Inertgases (meist Stickstoff) im Hochspannungsfeld. Es kommt zur Bildung geladener Tröpfchen. Mit zunehmender Verdampfung (Desolvatation) werden diese immer kleiner, bis schließlich eine

Coulomb-Explosion eintritt und freie gasförmige Ionen gebildet werden. Im nächsten Schritt werden die Ionen zum Massenanalysator hin beschleunigt. Je nach Geräte-Aufbau existieren verschiedene Massenanalysatoren. Ein häufig verwendetes System ist die hintereinander Schaltung von drei Quadrupolen, wobei zwischen Quadrupol 1 (Q1) und Quadrupol 3 (Q3), eine Stoßkammer mit quadrupolartigem Aufbau, befindet. Die Stoßkammer dient lediglich der Fragmentierung, besitzt jedoch keine massenspektrometrische Funktion wie vergleichsweise Quadrupole aufweisen. Solche Geräte werden als Tandemmassenspektrometer oder Triple-Quad-Geräte bezeichnet. Ein Quadrupol besteht aus vier parallel zueinander angeordneten Stabelektroden. An gegenüberliegenden Elektroden liegt eine Gleichspannung an, welche von einer hochfrequenten Wechselspannung überlagert wird, sodass nur Ionen mit einem bestimmten Massen-zu-Ladungsverhältnis den Quadrupol passieren können [Matissek *et al.*, 2014]. Im Allgemeinen dient der erste Quadrupol (Q1) dazu ausgewählte Ionen, sogenannte *Precursor Ions* oder *Parent Ions*, passieren zu lassen. Der zweite (Q2) dient als Kollisionszelle, in welcher die Ionen in kleinere Ionen, sogenannte *product Ions* oder *daughter Ions*, fragmentiert werden. Im dritten (Q3) erfolgt die Detektion. Bei Triple-Quadrupol-Geräten gibt es verschiedene Möglichkeiten die einzelnen Quadrupole zu nutzen. Eine gängige Methode stellt der in Abbildung 10 gezeigte MRM-Modus (*multiple reaction monitoring*) dar, welche in vorliegender Arbeit verwendet wurde. Hierbei erfolgt eine Selektion ausgewählter Ionen im Q1 mit nachfolgender Fragmentation in Q2. Im Q3 erfolgt die Selektion eines bestimmten Fragment-Ions [Burtis und Brunz, 2015].

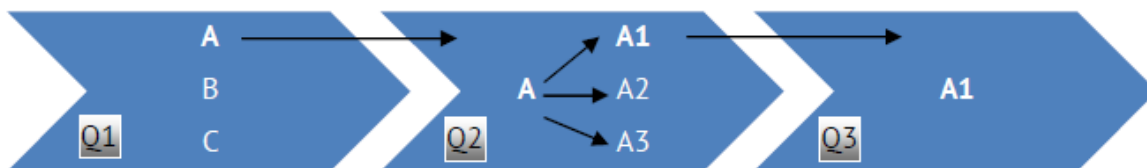


Abbildung 10: Veranschaulichung des MRM-Modus. Mit Q1: Quadrupol 1; Q2 Quadrupol 2; Q3: Quadrupol 3. Im Q1 erfolgt eine Selektion. Nur bestimmte Ionen (A) werden in den zweiten Quadrupol überführt und dort in Tochterionen fragmentiert. Anschließend erfolgt eine weitere Selektion, sodass nur ausgewählte Ionen (A1) den Q3 passieren können [mod. nach Burtis und Brunz, 2015]

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese

In diesem Kapitel wird die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Synthese der Verbindung GA, sowie die dabei erhaltene Kristallstruktur der Substanz, beschrieben. Zweck der Synthese war es, sowohl eine ausreichende Menge der Substanz für die Herstellung des DNA-Addukts N7-GA-Gua und dessen isotope markierte Variante [¹⁵N₅]N7-GA-Gua zu erhalten, als auch ein sauberes Produkt zu isolieren, um damit Untersuchungen zur Zytotoxizität durchzuführen.

3.1.1 Glycidamid

Die Synthese von GA wurde bereits in den 60er Jahren erstmals durch Payne und Williams (1961) veröffentlicht [Payn und Williams, 1961] und bereits vor dem Zeitpunkt dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eisenbrand durchgeführt. Dennoch gestaltete sich die Umsetzung der Synthesevorschrift als anspruchsvoll, da es oftmals zur Polymerisation und damit zum Abbruch der Synthese kam. Erst nach mehreren Versuchen und leichten Modifikationen, konnte das gewünschte Produkt, frei von Verunreinigungen, erhalten werden. Letztendlich führte dies dazu, dass sich bereits nach einigen Tagen bei -30 °C Kristalle in der Mutterlauge ausgebildet hatten. Die Kristallstruktur wurde genauer untersucht und bereits 2016 in dem Online Journal Acta Crystallografica publiziert [Hemgesberg *et al.*, 2016].

3.1.1.1 Vergleich der Synthese mit vorgegebener Synthesevorschrift und Charakterisierung der Substanz Glycidamid

Bei der Synthese des GA wurde die in Kapitel 5.1.1 beschriebene Synthesevorschrift grundsätzlich beibehalten. Diese erwies sich jedoch als sehr zeitaufwendig und, aufgrund der Polymerisationsneigung des Produktes, als schwierig. Eine sehr vereinfachte Darstellung der Synthesevorschrift ist in Abbildung 11 aufgeführt. Eine ausführliche Beschreibung der Syntheseroute ist im Methodenteil Kapitel 5.1.1 zu finden.

3. Ergebnisse und Diskussion

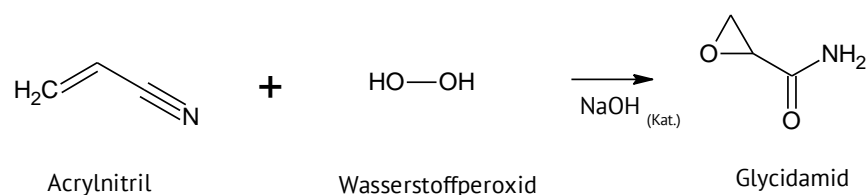


Abbildung 11: Vereinfachte Synthesevorschrift zur Herstellung von GA durch Zugeben von Natronlauge zu einer Mischung aus Acrylnitril und Wasserstoffperoxid.

Abweichend von der ursprünglichen Durchführung von Payne und Williams 1961 [Payne und Williams, 1961] wurden folgenden Modifikationen durchgeführt: Das Zutropfen der Natronlauge wurde deutlich verlängert und war erst nach 12 h anstelle von 7 h beendet. Die Wasserbad-Temperatur wurde prinzipiell, sowohl bei dieser Reaktion als auch im späteren Verlauf beim Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, auf maximal 35 °C eingestellt, um eine Polymerisation des Acrylnitrils zu verhindern. Bei der Zugabe von Aceton wurde zusätzlich über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, um das Reaktionsgemisch vollständig von Wasser zu befreien. GA ist sehr hygroskopisch und geht bei geringsten Mengen an Wasser direkt in Lösung. Aus diesem Grund wurden, sobald das Rohprodukt erhalten wurde, alle Schritte unter Argon als Schutzgas durchgeführt.

Vor Umkristallisation konnten 55 g (Ausbeute 63 %) eines gelblichen Pulvers erhalten werden. Nach Umkristallisation lag die Ausbeute an farblosen Kristallen bei 15 g (Ausbeute 18 %).

Die Charakterisierung der Kristalle erfolgte mittels verschiedenen Methoden. Neben einer Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) wurde eine Elementaranalyse, sowie eine Untersuchung der Kristallstruktur durchgeführt. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen werden nachfolgend ausführlicher beschrieben.

Abbildung 12 und Abbildung 13 enthalten die aufgenommenen NMR-Spektren der Verbindung GA. Aufgrund der Hygroskopizität der Substanz war es nicht möglich ein wasserfreies Spektrum aufzunehmen.

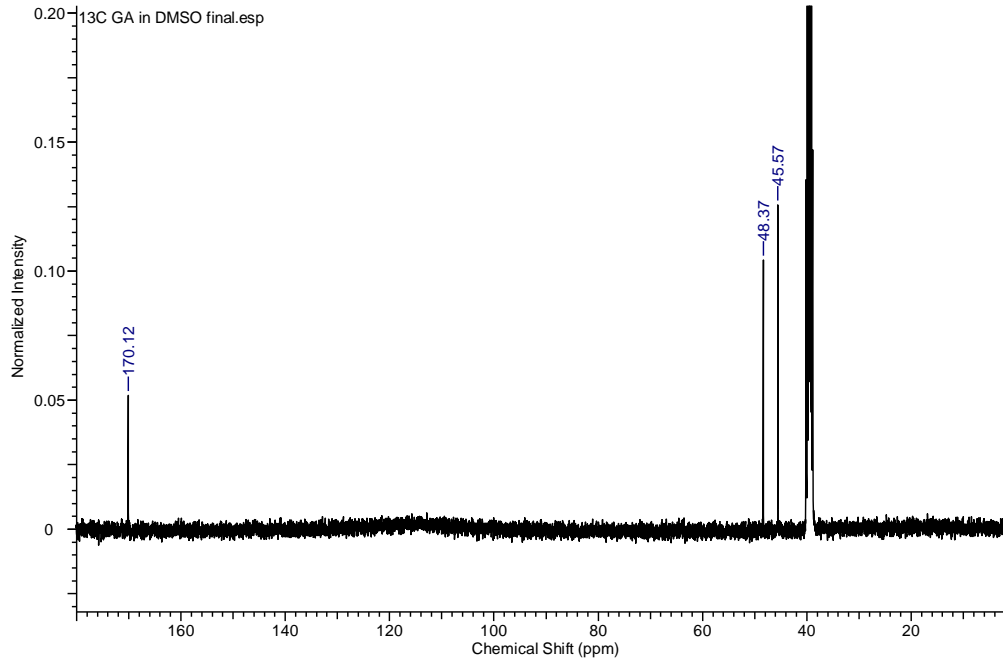


Abbildung 12: ¹³C-¹H-NMR der Verbindung GA (600,13 MHz; 295,15K, ppm, D₂O).

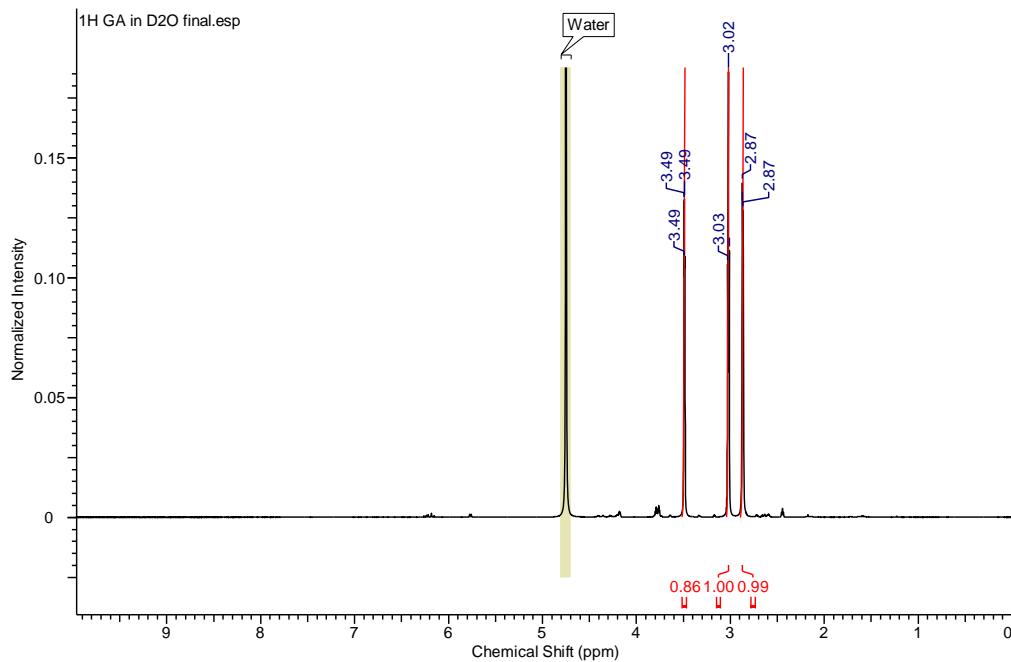


Abbildung 13: ¹H-NMR der Verbindung GA (100,66 MHz, 294,05 K; ppm; DMSO-d₆).

3. Ergebnisse und Diskussion

Die in den NMR-Spektren erhaltenen Signale der Protonen und Kohlenstoffatomen entsprechen den Erwartungen. Die zum Spektrum zugehörigen Kopplungskonstanten und Zuordnungen der einzelnen Signale zu den zugehörigen Atomen sind in Tabelle 09 aufgeführt.

Tabelle 09: Strukturanalytische Daten von GA mittels NMR-Untersuchung.

Methoden	Ergebnis
$^1\text{H-NMR}$ (600,13 MHz, 295,15 K, ppm, D ₂ O):	δ 3,49 (dd, $^2J_{\text{HH}} = 4,08$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 2,58$ Hz, 1H); 3,02 (t, 5,16 Hz, 1H); 2,87 (dd, $^2J_{\text{HH}} = 5,52$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 2,58$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ (100,66 MHz, 294,05 K, ppm, DMSO-d ₆):	δ 170,1 (C1); 48,5 (C2); 45,6 (C3).

Die Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Untersuchung decken sich mit den Angaben in der Promotionsarbeit von Puppel (2007), sodass davon ausgegangen werden konnte, GA erfolgreich synthetisiert zu haben. Die von Puppel (2007) beobachteten Signale lagen im $^1\text{H-NMR}$ bei δ 3,39 (dd, ^1H , 4,6 Hz und 2,6 Hz); 2,93 (dd, ^1H , 5,6 Hz, 4,7 Hz); 2,77 (dd, ^1H , 5,6 Hz, 2,6 Hz) und im $^{13}\text{C-}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}$ bei δ 47,4; 49; und 174,4 [Puppel, 2007].

Um die Ergebnisse ein weiteres Mal zu bestätigen, wurde eine Elementaranalyse durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analyse-Technik sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Quantitative Untersuchung mittels Elementaranalyse von GA. Vergleich der Elementaranalyse-Daten des synthetisierten GA mit des in der Literatur von Payne und Williams (1960) beschriebenen.

	Eigene Untersuchungen	Literaturdaten [Payne und Williams, 1960]
Berechnet	C 41,36 %; H 5,79 %; N 16,09 %.	C 41,4 %; H 5,8 %; N 16,1 %.
Gemessen	C 41,41 %; H 5,47 %; N 16,27 %.	C 41,5 %; H 5,9 %; N 16,1 %.

Die mittels Elementaranalyse bestimmten Gehalte von C, H und N stimmen (mit geringen Abweichungen) mit den berechneten Werten überein. Die größte Abweichung vom theoretisch

berechneten zum erhaltenen Wert lag bei 5,53 % (*H*-Atome), die anderen Abweichungen lagen bei 1,12 % (*N*-Atome) und 0,12 % (*C*-Atome). Die erfolgreiche Synthese der Verbindung GA wurde hiermit erneut bestätigt.

Nachdem aufgrund der durchgeführten Untersuchungen eine erfolgreiche Synthese von GA bestätigt werden konnte, wurde die Kristallstruktur der Substanz ausführlicher charakterisiert.

3.1.1.2 Diskussion der Kristallstruktur

Im Rahmen der im vorhergehenden Kapitel 3.1.1.1 genannten Modifikationen gelang es im praktischen Teil dieser Arbeit erstmals GA-Kristalle zu erhalten und zu charakterisieren. Zum damaligen Zeitpunkt war keine Kristallstruktur in der CSD-Datenbank (*cambridge crystallographic database*) hinterlegt. Folglich wurde die erhaltene Kristallstruktur ausführlich charakterisiert und die Ergebnisse bereits 2016 veröffentlicht [Hemgesberg *et al.*, 2016]. Es handelt sich bei GA um das zweitkleinste Epoxid, die kleinste Epoxid-Kristallstruktur stellt das Oxiran dar. Die Synthese des GA verläuft nicht stereospezifisch. Die Selektivität kann jedoch im Rahmen der Synthese beeinflusst werden. So erhöht eine kontinuierliche Gabe an Natronlauge mit konstantem Fluss die Selektivität der Synthese, während eine Erhöhung der Konzentration der eingesetzten Lauge von 2 M auf 3 M die Selektivität erniedrigt [Sugiyama *et al.*, 1989]. Die im Labor durchgeführte Synthese wurde jedoch entsprechend Payne und Williams (1961) unter diskontinuierlicher Zugabe durchgeführt, wobei immer so zugetropft wurde, dass der vorgegebene pH und das Temperatur-Intervall nicht über- oder unterschritten wurden. Die Mittelwerte der Bindungslängen im Epoxid-Fragment beider Enantiomere entsprechen anderen ähnlich substituierten Epoxid-Verbindungen. Tabelle 11 gibt die berechneten sowie die mittels Datenbank Recherche [CSD, Version 5.37, Update 2 Feb 2016; Groom *et al.*, 2016] erhaltenen Werte von 148 ähnlich substituierten Verbindungen, welche ein ebenfalls ein Epoxid als Strukturmerkmal enthalten, wieder.

3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 11: Vergleich der Bindungslängen aus experimenteller Berechnung und Datenbanken Recherche.

Bindung	Berechneter Wert	Datenbank Recherche
C-C	1,461	1,442 ± 0,028
H ₂ C-O	1,435	1,431 ± 0,026
XC-O	1,427	1,432 ± 0,026

Die bei der Reaktion gebildeten Enantiomere, welche in Abbildung 14 dargestellt sind, kristallisieren in Form von zwei unabhängigen Molekülen innerhalb der asymmetrischen Einheit.

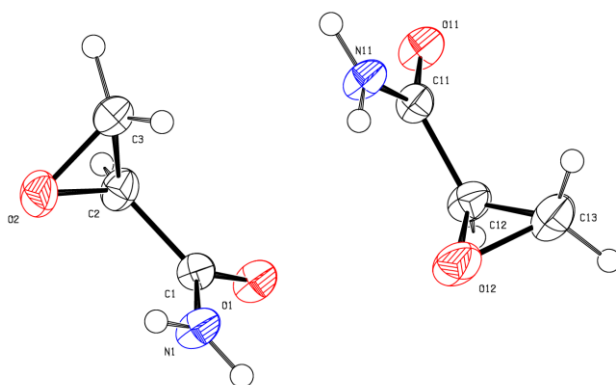


Abbildung 14: Strukturen der bei der Synthese des GA gebildeten Enantiomeren A und B, inklusive der Benennung der einzelnen Atome. Die Rotationsellipsoide stellen 50 % Aufenthaltswahrscheinlichkeit dar.

Ähnlich wie die Muttersubstanz AA, aus welcher sich GA in Folge des Phase-I-Metabolismus im Körper mittels CYP2E1 bildet, wird die dreidimensionale Struktur durch starke Wasserstoffbrückenbindungen zwischen N-H...O stabilisiert. Diese Bindungen vernetzen die einzelnen Moleküle zu bimolekularen Schichten, welche C...C Kontakte ermöglichen. Intra- und intermolekulare Bindungen tragen somit maßgeblich zur Stabilität der Festkörperstruktur bei. Intermolekulare Bindungen zwischen Carbonylgruppen und Aminogruppen benachbarter Moleküle ermöglichen die Bildung einer β -Faltblattstruktur, wie sie in Abbildung 15 gezeigt ist. Typischerweise sind solche Strukturen in Proteinen zu finden. Des Weiteren sind die dreidimensionalen Strukturen parallel zu einander angeordnet und durch weitere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den –

CH₂-Gruppen der Oxiraneinheit und den Sauerstoffatomen der Carbonyl- und Epoxyfunktionen von benachbarten Molekülen verbunden. Die dreidimensionale Anordnung wird in Abbildung 16 gezeigt.

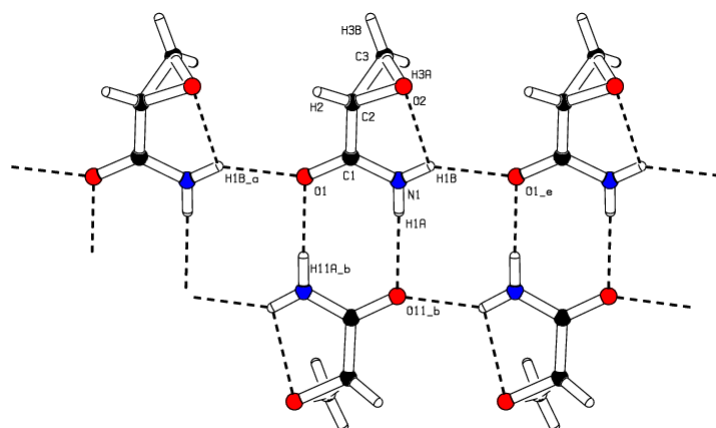


Abbildung 15: Festkörper Struktur der Verbindung GA. Mittels starker intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen ergibt sich eine β -Faltblattstruktur. Ausgewählte Bindungslängen [Å] und Winkel [°]: N1-H1A 0.861(16), H1A...O11b 2.121(16), N1...O11b 2.9651(16), N1-H1A...O11b 166.7(17); N1-H1B 0.858(16), H1B...O1e 2.121(15), N1...O1e 2.8482(14), N1-H1B...O1e 142.2(16).

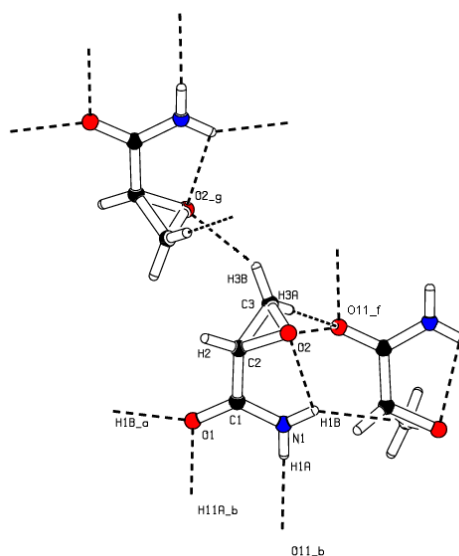


Abbildung 16: Anordnung der β -Faltblattstruktur aufgrund schwacher intermolekularer Wasserstoffbrückenbindungen. Ausgewählte Bindungslängen [Å] und Winkel [°]: C3-H3A 0.99, H3A...O11f 2.59, C3...O11f 3.5839(19), C3-H3A...O11f 179; C3-H3B 0.99, H3B...O2g 2.59, C3...O2g 3.4470(18), C3-H3B...O2g 144.:

Die einzelnen β -Faltblätter innerhalb der Kristallstruktur sind parallel zueinander angeordnet, und die daraus resultierende dreidimensionale Anordnung im Kristall wird in Abbildung 17 dargestellt.

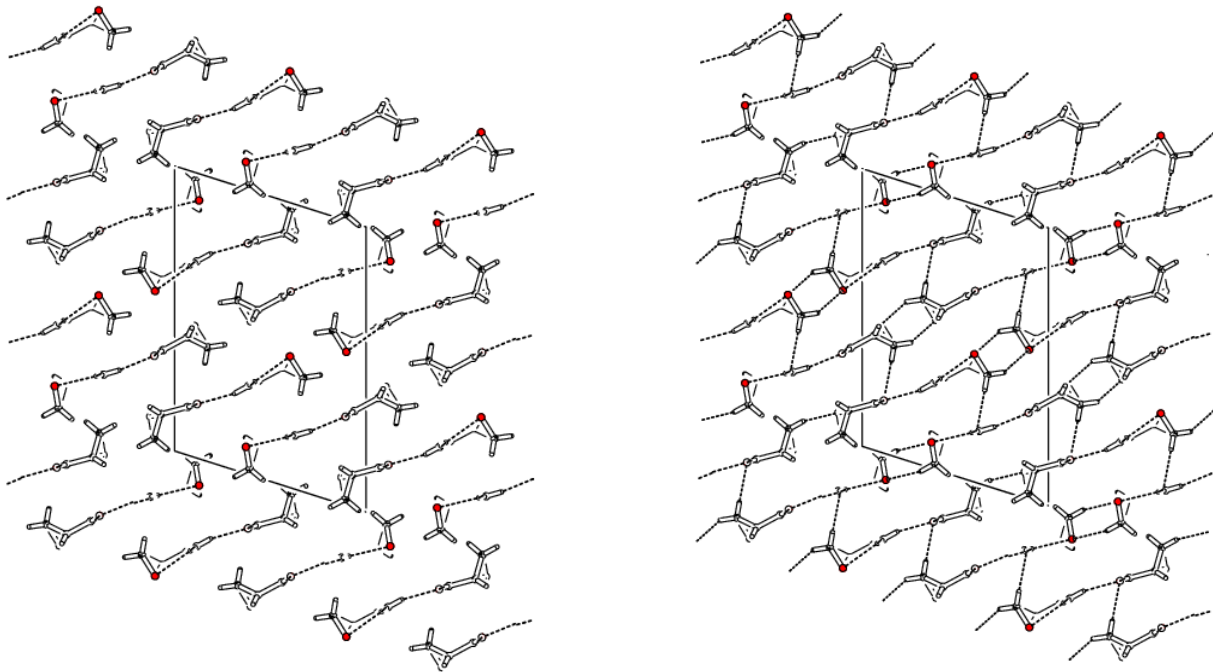


Abbildung 17: Links dargestellt: Blick entlang der b-Achse mit Anordnung der β -Faltblätter in Folge starker N-H...O Wasserstoffbrückenbindungen. Die Unterscheidung der beiden Enantiomere A und B erfolgt durch Kennzeichnung der farblich hinterlegten C-Atome in rot (Molekül B) und schwarz (Molekül A). Rechts dargestellt: Blick entlang der b-Achse mit Anordnung der β -Faltblätter in Folge starker N-H...O und C-H...O Wasserstoffbrückenbindungen. H-Atome, welche nicht an den Interaktionen beteiligt sind, wurden zur Veranschaulichung weggelassen (rot: Molekül B, schwarz: Molekül A).

3.1.1.3 Überprüfung der Stabilität in wässriger Lösung

Um die Stabilität der Verbindung in wässriger Lösung zu überprüfen wurden 20 mg Substanz in 600 μ l D_2O gelöst und über einen Zeitraum von 24 h stündlich eine NMR-Analyse durchgeführt. Zwischen den einzelnen Messungen war die Probe Temperaturschwankungen und unterschiedlichen tagesabhängigen Sonneneinstrahlungen ausgesetzt. Indirekt sollte daher geklärt werden, ob GA in späteren Inkubationsversuchen mit primären Rattenhepatozyten (pRH) möglicherweise bereits nach Zusetzen instabil ist und somit gar nicht in die Zelle gelangen kann, wodurch negative Ergebnisse bzw. das Fehlen von toxischen Effekten zu erklären wären.

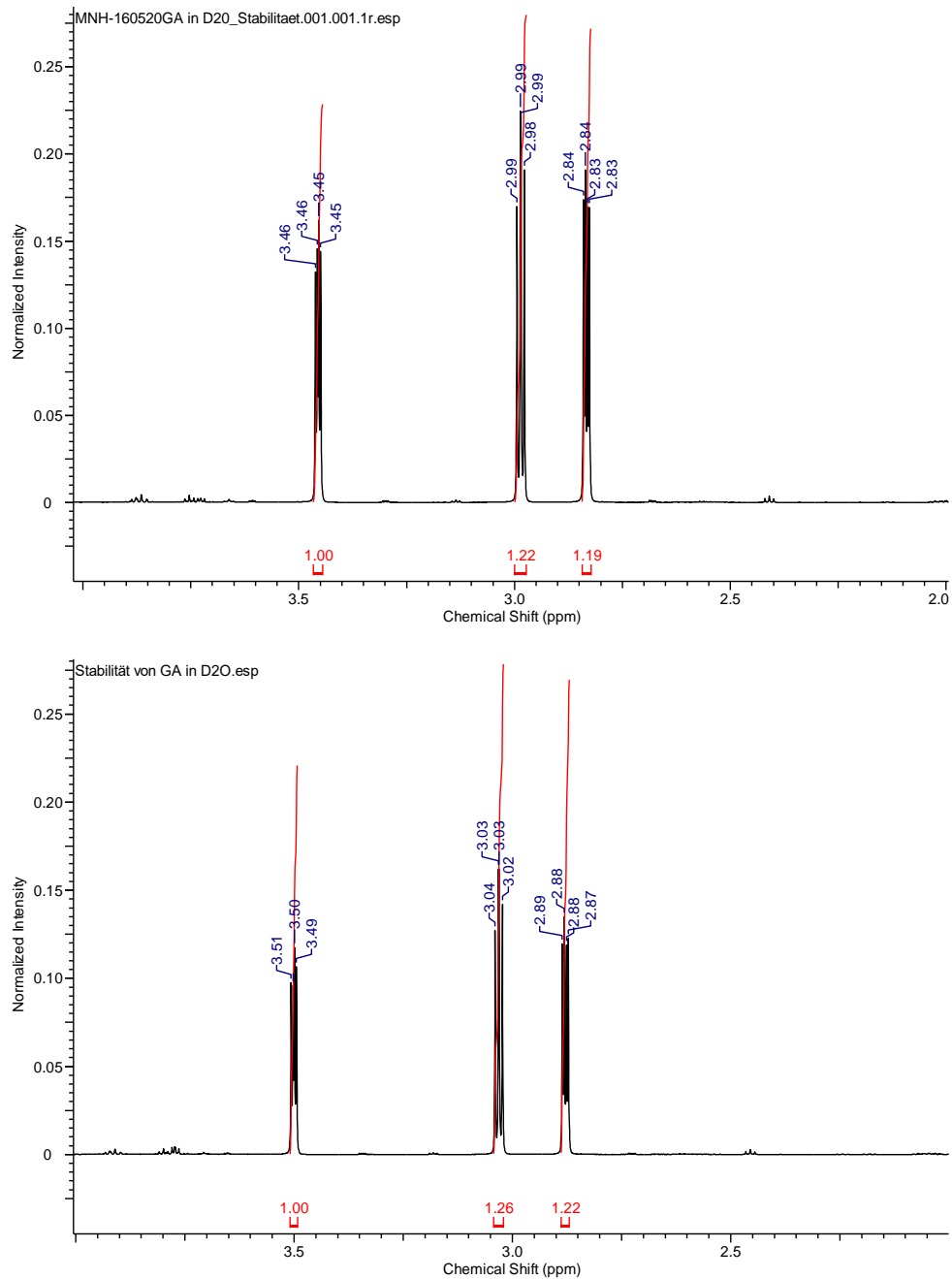


Abbildung 18: Überprüfung der Stabilität von GA in D_2O mittels $^1\text{H-NMR}$. Oben: Messung Zeitpunkt t_0 , Unten: Messung Zeitpunkt $t + 24$ h. Zur besseren Übersicht wurden auf die Darstellung der restlichen Messungen verzichtet. Gezeigt wird ein kleiner Ausschnitt des Spektrums, in welchem Signale detektiert wurden.

Abbildung 18 zeigt den relevanten Ausschnitt (Signale der Protonen) aus NMR-Spektren zu den Zeitpunkten t_0 und $t + 24$ h. Eine Zeitspanne von 24 h entspricht den maximalen Inkubationszeiten

aus späteren Versuchen, in welchen pRH mit AA inkubiert wurden. Nach 24 h sind keine Veränderungen der Signale zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass GA in wässriger Lösung innerhalb dieses Zeitraumes stabil ist. Ähnliche Beobachtungen konnten Doerge *et al.* (2005) feststellen [Doerge *et al.*, 2005b]. Hier erwies sich GA in wässriger Lösung als mindestens eine Woche stabil. Die Art der Messung und genaue Ergebnisse waren in der Publikation nicht näher erläutert. Weitere Untersuchungen wurden von Kim und Kollegen (2015) durchgeführt. Auch hier erwies sich GA (sowie AA) unter unterschiedlichen Bedingungen in biologischen Matrices als stabil. Neben Kurzzeitstabilität (RT; 4 h), Langzeitstabilität (-20 °C; 2 Wochen) und Stabilität im Autosampler (4 °C; 24 h), wurde die Stabilität der Verbindungen nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen (3 Zyklen) untersucht. Es konnten keine signifikanten Abweichungen beobachtet werden, was darauf schließen ließ, dass AA und GA unter den geprüften Bedingungen stabil sind [Kim *et al.*, 2015]. Betrachtet man die Struktur des GA, so stellt man fest, dass es sich hierbei um ein 1,2-Epoxid handelt. Im Gegensatz zu anderen Epoxiden, weisen 1,2-Epoxide eine relativ lange Stabilität in wässriger pH-neutraler Lösung auf. Die Halbwertszeit der dann stattfindenden Hydrolyse liegt zwischen 500–200 h. *In vivo* verläuft die Hydrolyse jedoch um das 100fache schneller. Grund hierfür ist die Metabolisierung bzw. enzymatische Detoxifizierung der Substanzen [Ehrenberg, 1981].

Die gemachten Beobachtungen aus eigenen Untersuchungen, sowie die in weiteren Studien beschriebenen Ergebnissen [Doerge *et al.*, 2005b; Kim *et al.*, 2015; Ehrenberg, 1981] deuten darauf hin, dass GA über einen Zeitraum von 24 h stabil ist und für Inkubationsversuche verwendet werden konnte.

3.1.2 N7-GA-Gua und [¹⁵N₅]N7-GA-Gua

Nachdem GA erfolgreich synthetisiert werden konnte, erfolgte die Synthese des N7-GA-Gua, einem Reaktionsprodukt aus dG und GA. Ziel der Synthese war es, ein reines Produkt zu erhalten, um damit Standards herzustellen, welche für spätere Untersuchungen mittels der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode (siehe Kapitel 3.3), notwendig waren. Mittels der hergestellten Standards (externe Standards) konnten Kalibriergeraden erstellt werden, welche der

Quantifizierung von *N7*-GA-Gua in den hergestellten Proben dienen. Unerlässlich war dabei auch die Synthese eines isotonenmarkierten Standards [$^{15}\text{N}_5$]*N7*-GA-Gua (interner Standard, IS), welcher den Proben in einer definierten Konzentration zugesetzt wurde, um mögliche Verluste während der Aufarbeitung zu berücksichtigen.

Eine sehr vereinfachte Darstellung der Synthesevorschrift ist in Abbildung 19 aufgeführt. Eine ausführliche Beschreibung der Syntheseroute ist im Methodenteil in Kapitel 5.1.2 zu finden.

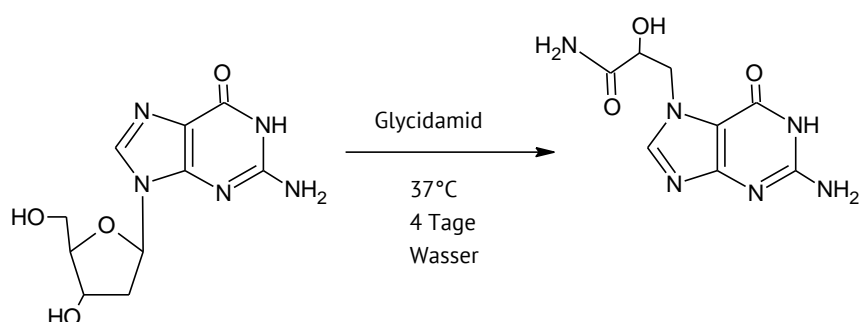


Abbildung 19: Synthesevorschrift (stark vereinfacht) zur Herstellung von *N7*-GA-Gua.

Das Produkt *N7*-GA-Gua fällt als weißer Niederschlag mit 11 % Ausbeute aus. Die Überprüfung der Synthese erfolgte mittels Kernresonanzspektroskopie. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 20 und Abbildung 21 gezeigt. Die zum Spektrum zugehörigen Kopplungskonstanten und Zuordnungen der einzelnen Signale zu den zugehörigen Atomen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

3. Ergebnisse und Diskussion

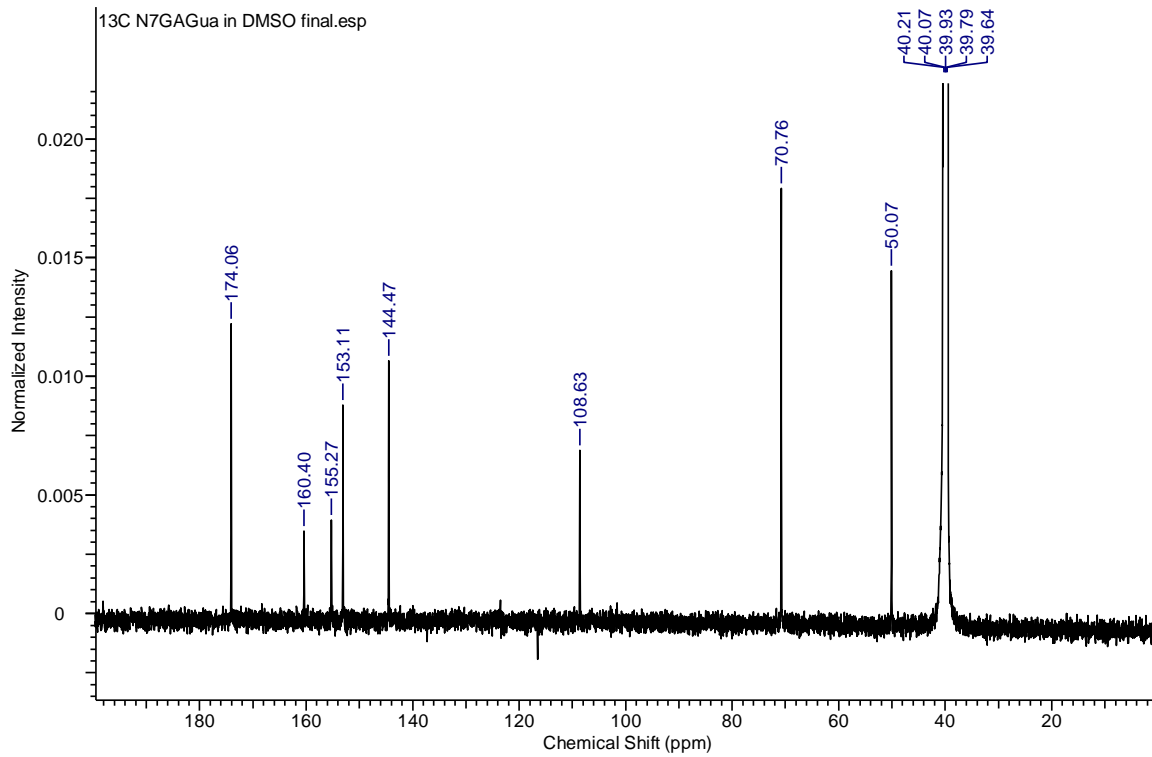


Abbildung 20: ¹³C-¹H-NMR der Verbindung N7-GA-Gua (600,13 MHz; 295,15 K; ppm; DMSO-d₆).

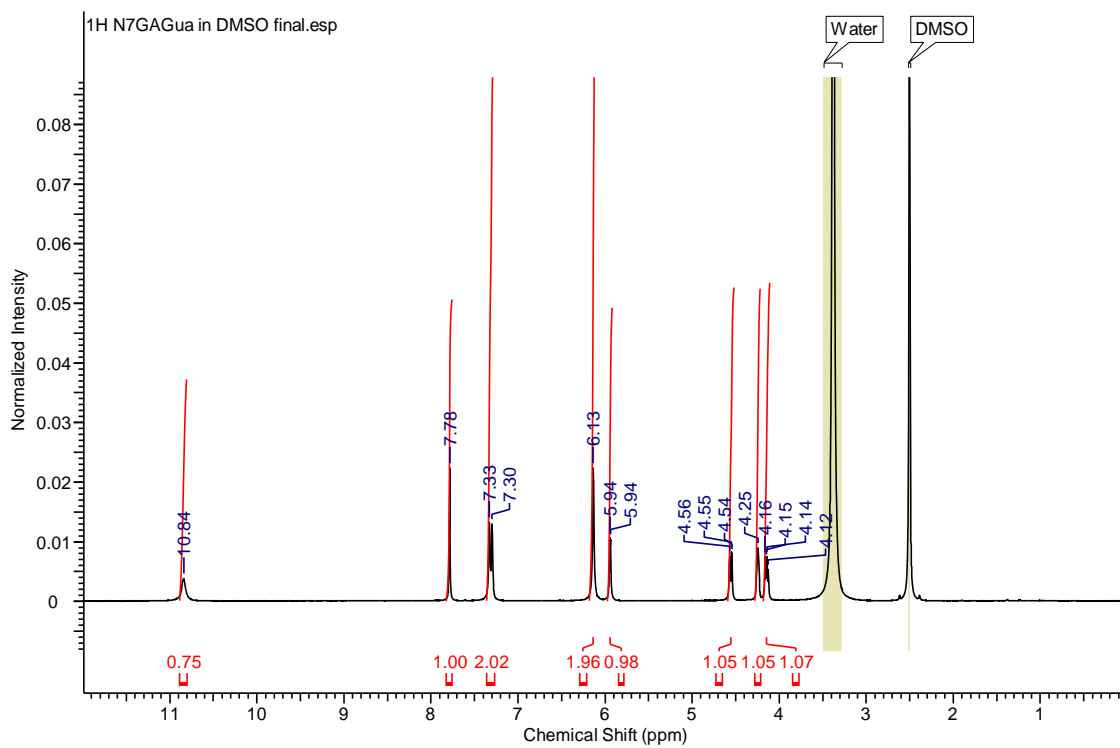


Abbildung 21: ¹H-NMR der Verbindung N7-GA-Gua (600,13 MHz; 295,15 K; ppm, DMSO-d₆).

Tabelle 12: Ergebnisse der NMR-spektroskopischen Untersuchung von *N7-GA-Gua*.

Methoden	Ergebnis
¹ H-NMR [600,13 MHz; 295,15 K; ppm; DMSO- <i>d</i> 6]	δ 10,84 (s; 1H; N1H); 7,78 (s; 1H; H8); 7,33 (d; 2H; ⁴ J _{HH} = 17,61Hz; CONH ₂); 6.13 (s; 2H; N ² H ₂); 5.94 (d; 1H; ³ J _{HH} = 5,50Hz; OH); 4,56 (dd; 1H; ² J _{HH} = 13,39; ³ J _{HH} = 2,75; CH ₂); 4,22 (m; 1H; CHOH); 4,15 (dd; 1H; ² J _{HH} = 13.39; ³ J _{HH} = 8,99; CH ₂).
¹³ C-{ ¹ H}-NMR [600,13 MHz; 295,15 K; ppm; DMSO- <i>d</i> 6]	δ 174,06 (CONH ₂); 160,4 (GuaC6); 155,27 (GuaC2); 153,11 (GuaC4); 144,47 (GuaC8); 108,63 (GuaC5); 70,76 (CHOH); 50,07 (N7CH ₂).

Die erhaltenen Signale der Protonen und Kohlenstoffatomen entsprechen den Erwartungen und decken sich mit den Ergebnissen von Puppel (2007) und Watzek *et al.* (2012b).

Um die Ergebnisse mittels weiterer Analysemethoden zu bestätigen, wurde eine Elementaranalyse durchgeführt. Tabelle 13 enthält die berechneten und gemessenen Gehalte an C, H, und N-Atomen.

Tabelle 13: Ergebnisse der Elementaranalyse von *N7-GA-Gua*.

Analysemethoden	Ergebnis
Elementaranalyse	Berechnet: C 40,34 %; H 4,23 %; N 35,28 % Gemessen: C 40,13 %; H 4,28 %; N 34,39 %.

Die mittels Elementaranalyse bestimmten Gehalte weichen mit 0,42 % (C-Atome), 1,18 % (H-Atome) und 2,52 % (N-Atome) nur geringfügig von den berechneten Werten ab. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der synthetisierten Verbindung um *N7-GA-Gua* handelt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es sich bei der hergestellten Verbindung um das gewünschte DNA-Addukt handelte, wurde eine massenspektrometrische Untersuchung durchgeführt. Ziel dieser war es, dass für das Addukt typische Fragmentierungsmuster zu erhalten, um damit geeignete

3. Ergebnisse und Diskussion

Massenübergänge zur späteren Entwicklung einer UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode (siehe Kapitel 3.3) zu detektieren.

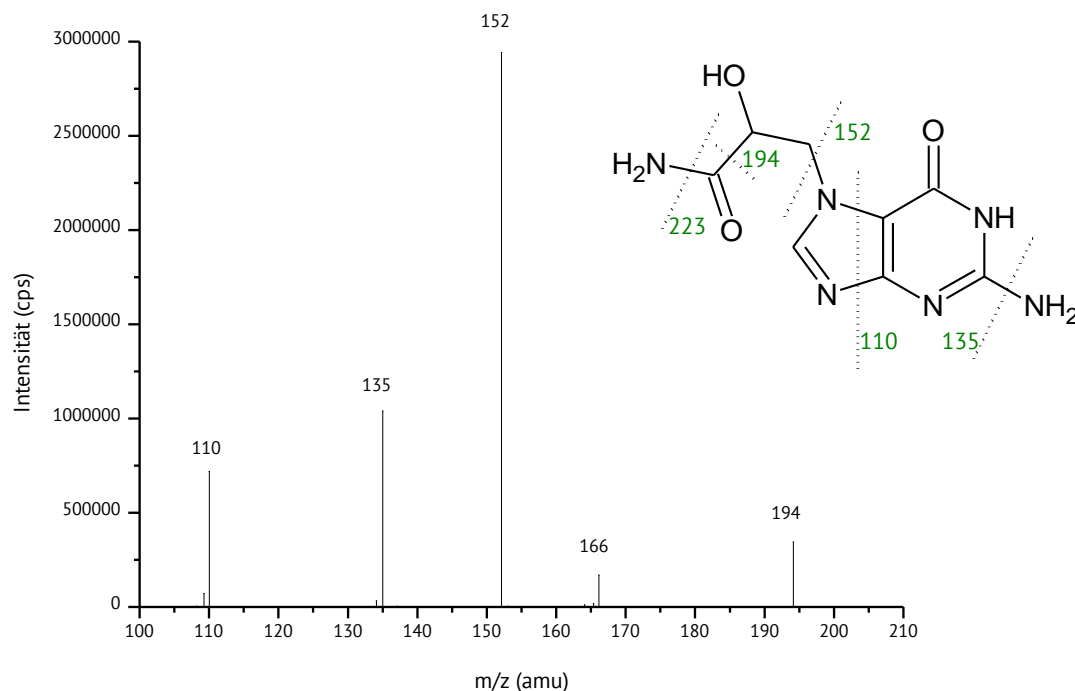


Abbildung 22: Fragmentierungsmuster der Verbindung *N*7-GA-Gua.

Die erhaltenen Massenübergänge stimmen mit dem Fragmentierungsmuster überein, sodass die erfolgreiche Synthese erneut bestätigt werden konnte.

Nachdem *N*7-GA-Gua erfolgreich hergestellt werden konnte, wurde die isotonenmarkierte Variante [¹⁵N₅]*N*7-GA-Gua synthetisiert. Die genaue Synthesevorschrift ist in Kapitel 5.1.2.2 beschrieben. Aufgrund der relativ schlechten Ausbeute von 11 % wurde die Synthese der isotonenmarkierten Verbindung modifiziert und der Überschuss an GA von einem 10fachen molaren Überschuss auf einen 16fachen molaren Überschuss erhöht. Dies hatte zur Folge, dass die Ausbeute an [¹⁵N₅]*N*7-GA-Gua auf 38 % erhöht werden konnte. Aufgrund der geringen Menge an [¹⁵N₅]dG und dem daraus entstehendem Produkt war lediglich genügend Substanz vorhanden, um das Fragmentierungsmuster

der Verbindung mittels Massenspektrometrie zu bestimmen. Das dabei erhaltene Massenspektrum der Fragmentierung ist in Abbildung 23 gezeigt.

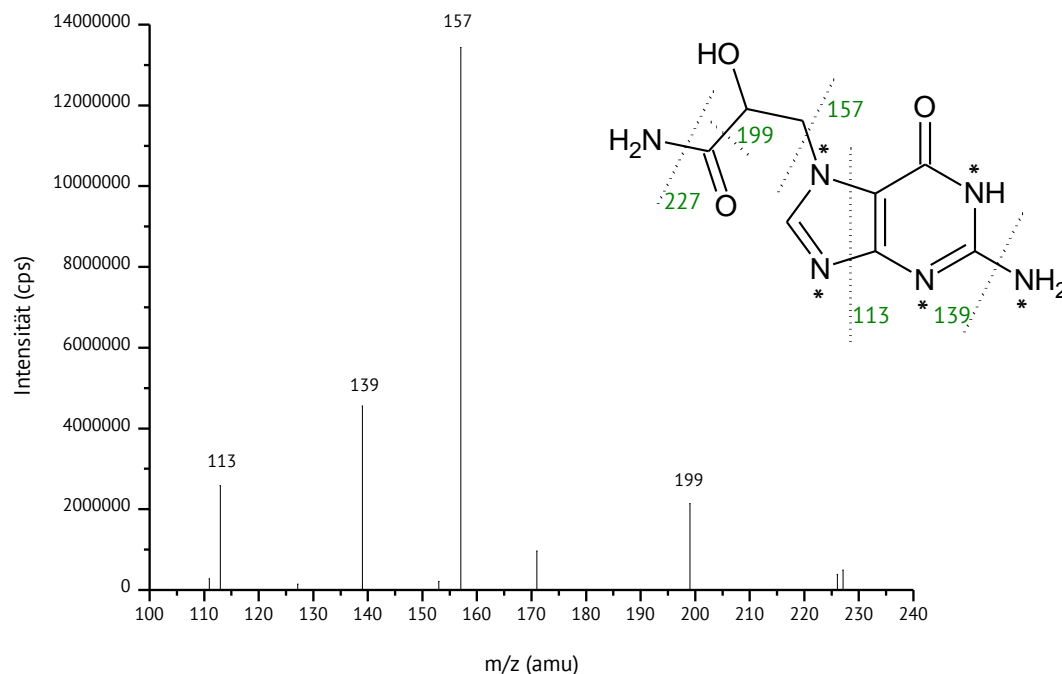


Abbildung 23: Fragmentierungsmuster der Verbindung [¹⁵N₅]N7-GA-Gua (mit * Stabilisotopenmarkierung).

Aufgrund der erhaltenen Fragmentierung konnte davon ausgegangen werden, das gewünschte Produkt ebenfalls erfolgreich synthetisiert zu haben, sodass es für spätere Versuche als IS verwendet werden konnte.

3.2 Bestimmung der Zytotoxizität von Acrylamid und Glycidamid mittels Resazurin-Reduktionstest

Nachdem sowohl GA als auch dessen DNA-Addukt *N7-GA-Gua* erfolgreich synthetisiert wurden, sollte die Zytotoxizität von AA und dessen Metaboliten GA untersucht werden. Die Bestimmung der Zellproliferation und Zytotoxizität in den in dieser Arbeit eingesetzten pRH erfolgte mittels Resazurin-Reduktionstest. Zweck dieser Untersuchungen war es Konzentrationen zu bestimmen, bei denen die Testsubstanzen eine zytotoxische Wirkung auf die getesteten Zellen hervorrufen. Es sollte dadurch ausgeschlossen werden, dass die Zellen in den weiterführenden Experimenten mit zytotoxischen Konzentrationen behandelt werden. Mögliche Beobachtungen bzw. Effekte wären dann evtl. nicht mehr erklärbar, da eine zytotoxische Wirkung der Substanz als Ursache nicht ausgeschlossen hätte werden können.

Das Prinzip des Resazurin-Reduktionstest in der Zellkultur beruht auf der Umsetzung des bläulich erscheinenden Resazurin zum fluoreszierenden pinkfarbenen Resorufin.

Es wurde ausschließlich eine 24h-Inkubation durchgeführt und auf eine 16h-Inkubation, wie sie bei den später beschriebenen Inkubationsversuchen verwendet wurde, verzichtet.

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Resazurin-Tests mit den getesteten Substanzen AA und oder GA dargestellt. Aufgetragen sind die Viabilitäten in % gegen die Konzentration des AA oder dessen Metaboliten GA in mM.

Der Test wurde mindestens in drei unabhängigen Experimenten wiederholt.

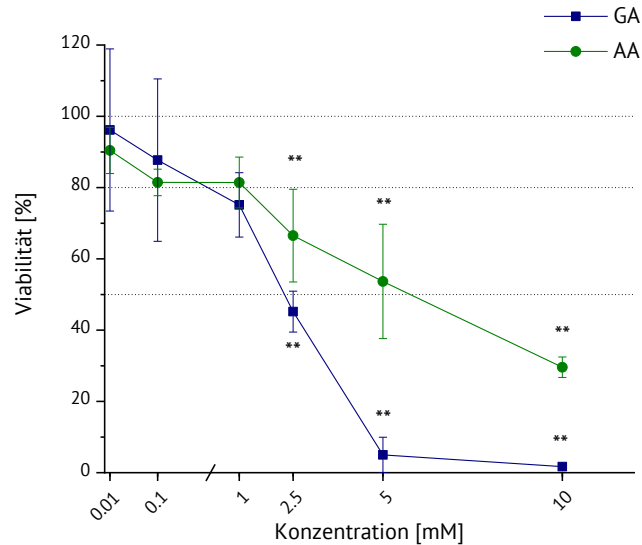


Abbildung 24: Zytotoxizität von AA und GA (jeweils 0,01; 0,1; 1; 2,5; 5 und 10 mM) in pRH nach 24h-Inkubation. Grün: Ergebnisse des Resazurin-Reduktionstests nach Inkubation der Zellen mit AA. Blau: Ergebnisse nach Inkubation der Zellen mit GA. Abgebildet sind die MW \pm Stabw; $n = 4$ in einer Doppelbestimmung. Die Bestimmung des Signifikanzniveaus erfolgte als Vergleich der behandelten Zellen mit der Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) (*Dunnet Test* * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$).

Wie in Abbildung 24 zu erkennen ist, nimmt mit zunehmender Konzentration der Testsubstanzen AA und GA die Viabilität der Zellen ab. Sowohl AA als auch GA führen in geringen Konzentrationen bis zu 1 mM zu keiner statistisch signifikanten Abnahme der Viabilität. Bei höheren Konzentrationen – ab 2,5 mM AA bzw. GA – ist die Abnahme der Viabilität statistisch hoch signifikant. Viabilitäten $< 80\%$ sind für AA bzw. GA ab einer Konzentration von 2,5 bzw. 1 mM zu beobachten. Eine Inkubation der Zellen mit GA führt zu stärkeren Viabilitätsverlusten als eine äquimolare Lösung an AA. Mit zunehmender Konzentration werden diese Effekte größer. GA wirkt daher zytotoxischer als AA. Bei höchster Konzentration an AA bzw. GA sinkt die Viabilität auf 30 ± 3 bzw. $2 \pm 1\%$ ab.

Aufgrund der konzentrationsabhängigen Effekte konnte eine sigmoidaler Kurvenanpassung durchgeführt und IC_{50} -Werte bestimmt werden. Die zugehörigen sigmoidalen Kurvenanpassungen sind nachfolgend in Abbildung 25 (sowie zusätzlich in Anhang 7.2) dargestellt.

3. Ergebnisse und Diskussion

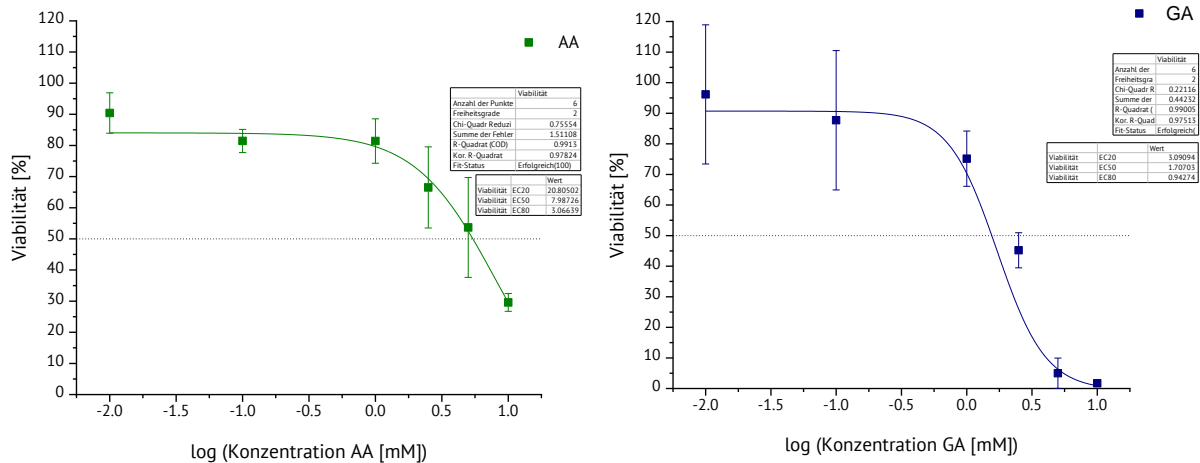


Abbildung 25: Ermittlung des IC_{50} -Wertes über die Konzentrations-Wirkungskurve (sigmoidaler Fit) nach Inkubation pRH mit AA (links; 0,01–10 mM) bzw. GA (rechts; 0,01–10 mM) für 24 h. Angegeben ist die Konzentration der Substanz und die Viabilität der Zellen in Prozent bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %). Dargestellt sind die MW \pm Stabw. Mit $n = 4$ (alle bis auf 0,1 mM mit $n = 3$). Signifikanzen wurden nicht eingezeichnet und sind der vorhergehenden Abbildung 24 zu entnehmen.

Wie in Abbildung 25 zu erkennen ist, unterscheiden sich die beiden Kurvenverläufe deutlich voneinander. Ein steilerer Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve ist nach GA-Inkubation zu beobachten. Für AA bzw. GA ergab sich nach Berechnung ein IC_{50} -Wert von 7,99 bzw. 2,62 mM.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse weichen von den Ergebnissen von Watzek (2012c) ab. Während in den Arbeiten von Watzek (2012c) eine Inkubation pRH mit 0,2–3000 μ M AA keine signifikanten Effekte zur Folge hatte und die Viabilität der Zellen über den ganzen Konzentrationsbereich hinweg oberhalb von 76 % lag, konnten in vorliegender Arbeit, sowohl hoch signifikante Effekte als auch Viabilitäten unterhalb von 80 % ab einer Inkubation der Zellen mit 2,5 μ M AA beobachtet werden. Weitere Versuche von Kurebayashi *et al.* (2006), in welchen ebenfalls pRH mit AA und GA inkubiert wurden, zeigten ausschließlich für GA – nicht jedoch AA – zytotoxische Effekte im Bereich von 1–3 mM [Kurebayashi und Ohno, 2006]. Diese Befunde deuten darauf hin, dass AA als Muttersubstanz zu keinen zytotoxischen Effekten der Zellen führt, bzw. wenn zytotoxische Wirkung sichtbar ist, diese erst in höheren Konzentrationen oberhalb 3 mM AA auftritt.

Ähnlich wie bei den Ergebnissen von Watzek (2012c) deuten somit auch die Ergebnisse von Kurebayashi *et al.* (2006) daraufhin, dass zytotoxische Effekte erst bei größer 3 mM AA auftreten. Im Widerspruch hierzu können in vorliegender Arbeit bereits ab 2,5 mM AA zytotoxische Effekte beobachtet werden. Während die bei den Studien von Kurebayashi *et al.* (2006) eingesetzten pRH aus SD-Ratten stammten, wurden in vorliegender Arbeit Leberzellen der Wistar-Ratte entnommen. Die Zellzahl lag bei den Versuchen Kurebayashi und Kollegen (2006) bei 10^6 Zellen pro ml Zellsuspension, während in der hier vorliegenden Untersuchung die Zellzahl auf 200 000 Zellen pro ml Zellsuspension eingestellt wurde. Die genannten Unterschiede könnten eine Erklärung für die leicht abweichenden Effekte liefern. Eine Erklärung für die Unterschiede zu Watzek (2012c), liefert möglicherweise zum einen die unterschiedliche Anzahl an Wiederholungen des Experiments (Watzek 2012c: $n = 3$; eigene Experimente: $n = 4$) zum anderen die Inkubationsdauer der Zellen mit Resazurin (Watzek 2012c: 1 h; eigene Experimente: 1,5 h).

Die Abnahme der Viabilität nach AA-Inkubation, wie sie in Abbildung 25 dargestellt ist, ist vermutlich nicht auf die Bildung von GA zurückzuführen. Die Bildung des Metaboliten GA als Ursache der Viabilitätsverluste nach Inkubation von 2,5 mM kann angesichts der weiteren Versuche von Watzek (2012c) weitgehend ausgeschlossen werden, da dieser nach 24h-Inkubation pRH mit 2 mM AA im Inkubationsmedium eine Konzentration von $13,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$ metabolisch gebildetem GA, und somit eine nicht zytotoxische Konzentration an GA, nachweisen konnte [Watzek, 2012c].

Anders als für AA, passen die gemachten Beobachtungen nach Inkubation der Zellen mit GA, besser mit bisher publizierten Daten überein. So konnte Watzek (2012c) nach GA-Inkubation pRH signifikante Viabilitätsverluste mit 56 % bereits ab 2 mM detektieren. Ab 3 mM sank die Vitalität der Zellen sogar auf 26 % ab. Der IC_{50} -Wert wurde mit 2,1 mM berechnet [Watzek, 2012c]. Eigene Untersuchungen ergaben nach Inkubation der Zellen mit 2,5 mM AA eine Viabilität von $45 \pm 6 \%$. Der IC_{50} -Wert lag bei 2,62 mM.

Insgesamt wurden in vorliegender Arbeit für AA als auch GA nach 24h-Inkubation von pRH ab 2,5 mM Substanz statistisch hoch signifikante Unterschiede zur NK bestimmt. Zusammenfassend konnte sowohl für AA als auch für dessen Metaboliten zytotoxisches Potential (Viabilität unterhalb 80 %) ab 2,5 bzw. 1 mM beobachtet werden. Bei äquimolaren Konzentrationen führt GA zu stärkeren zytotoxischen Effekten. AA erwies sich im unteren Konzentrationsbereich (bis ca. 2,5 mM) als nicht zytotoxisch und konnte somit für spätere DNA-Adduktbildungsversuche eingesetzt werden, in welchen als höchste Konzentration 2 mM gewählt wurde.

3.3 Entwicklung einer UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode zur Detektion von *N7-GA-Gua*

Nachdem die Zytotoxizität von AA und GA in pRH untersucht wurde, wurde eine sensitive UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode entwickelt. Ziel war es, eine Methode mit bislang nicht erreichter Genauigkeit zu entwickeln, mit welcher selbst in den Organen unbehandelter Versuchstiere (Ratte und Maus) und im Blut des Menschen, *N7-GA-Gua* quantitativ bestimmt werden konnten. Die Entwicklung der finalen Analytikmethode wird in den nachfolgenden Abschnitten ausführlicher beschrieben.

3.3.1 Chromatographie - Wahl der richtigen Trennsäule

In Folge wechselnder Fragestellungen, die in Zusammenhang mit der Probenaufarbeitung oder eines Geräte-Wechsels entstanden waren, musste die chromatographische Methode den Gegebenheiten angepasst werden. Aufgrund der Komplexität und des Umfangs dieser Entwicklung werden im nachfolgenden nur die wesentlichen Dinge dargestellt.

Chromatographie einzelner Nukleoside

Ganz zu Beginn der Arbeit sollte eine HPLC-Methode zur Detektion der vier Nukleoside, Deoxyadenosin (dA), Deoxyguanosin (dG), Deoxythymidin (dT) und Deoxycytosin (dC) entwickelt werden. Ein Chromatogramm der erfolgreichen Trennung der Nukleoside befindet sich im Anhang 7.3. Die Gewinnung von Nukleosiden aus Realproben erfolgte mittels enzymatischer Hydrolyse. Durch chromatographische Trennung der Nukleoside sollte zum einen die Menge an dG in der Probe quantifiziert werden können, zum anderen sollten eventuelle DNA-Addukte durch weitere Peaks ersichtlich sein. Die enzymatische Aufarbeitung von DNA wurde bereits im AK Schrenk für andere DNA-Addukte als das in vorliegender Arbeit betrachtete *N7-GA-Gua* etabliert. Der Vorteil der enzymatischen Hydrolyse besteht darin, dass bei dieser Art von Probenaufarbeitung DNA-Nukleoside freigesetzt werden [Tarun und Rusling, 2005]. Durch Bestimmung des Gehaltes an dG in der Probe ist es möglich, die analytisch bestimmte Menge an DNA-Addukt mit dem erfassten dG in Relation zu setzen und somit den Gehalt an Addukten in der DNA (Angabe als Anzahl DNA-Addukte pro 10⁸

Nukleoside) exakt zu bestimmen. Das Prinzip der enzymatischen Hydrolyse basiert auf der Freisetzung von DNA-Nukleosiden. Nukleoside bestehen aus der DNA-Base und einem Zuckerbaustein. *N7-GA-Gua* weist keinen Zucker-Baustein auf. Bei der Freisetzung des DNA-Adduktes aus der DNA entsteht eine Nukleosid-Zwischenstufe, welche jedoch aufgrund der positiven Ladung am *N7*-Stickstoffatom der Purin-Base instabil ist und durch Abspaltung des Zuckers zum *N7-GA-Gua* zerfällt (vereinfachte Darstellung siehe Schema 01 in Kapitel 2.1.2). Eine Erfassung des *N7-GA-Gua* nach enzymatischer Hydrolyse sollte daher möglich sein. Zwar konnte eine chromatographische Trennung der DNA-Nukleoside erzielt werden, jedoch kam es zu Problemen bei der enzymatischen Aufarbeitung, bei welcher eine definierte Menge an DNA mit unterschiedlichen Puffern und Enzymen (Micrococcale Nuklease, Phosphodiesterase II und alkalische Phosphatase) versetzt und im Anschluss daran der Reaktionsansatz mit Ethanol gefällt und der Alkohol per Vakuumzentrifuge entfernt wurde. Der Rückstand wurde in Fließmittel aufgenommen und zur massenspektrometrischen Messung eingesetzt. Trotz Variation der Fließmittelzusammensetzung ging der Rückstand nicht vollständig in Lösung. Eine Filtration war aufgrund des geringen Probenvolumens von 20–30 µl nicht möglich. Aufgrund dieser Problematik wurde die Möglichkeit der Verwendung der neutralen thermischen Hydrolyse (NTH) untersucht.

Im Gegensatz zur enzymatischen Hydrolyse führt eine NTH zur Freisetzung geschädigter Basen, insbesondere in Form von *N7-Gua*- sowie *N3*-Adenin-DNA-Addukten. Es wurde eine Methode zur Trennung der DNA-Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin entwickelt. Aufgrund der Polarität dieser Verbindungen gelang die Trennung auf der zuvor eingesetzten RP-Phase nicht. Eine zwitterionische HILIC-Phase brachte letztlich den gewünschten Erfolg. Eine Beschreibung der beiden stationären Phasen erfolgt im Theorieteil dieser Arbeit, siehe Kapitel 2.1.2. Ein Chromatogramm, sowie die hierfür nötigen Chromatographie-Bedingungen sind in Anhang 7.3 zu finden.

Chromatographie des *N7-GA-Gua*

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Bestimmung des *N7-GA-Gua* gelegt. Die Methodenentwicklung erfolgte an unterschiedlichen Modellen von UHPLC-Geräten und unter

Verwendung verschiedener Testtrennsäulen. Aufgrund der zuvor verwendeten HILIC-Säule und der guten Trennleistung polarer Verbindungen, sollte eine HILIC-UHPLC-Säule ein gutes Ergebnis liefern. Die Auswahl an HILIC-Säulen in UHPLC-Format war, im Gegensatz zu RP-Säulen, beschränkt, weshalb sowohl HILIC als auch RP-Materialien getestet wurden. Neben vollporösen Partikeln wurden auch core-shell Materialien geprüft. Durch den Einsatz dieser Technologie sollte bei größerer Partikelgröße, eine vergleichbare Trennleistung wie bei kleineren vollporösen Partikeln erzielt werden. Die eingesetzten Testsäulen sind in Tabelle 14 aufgeführt, die dazugehörigen Chromatogramme in Anhang 7.3 gezeigt. Entsprechend der Testsäule und des Verhaltens des Analyten *N7-GA-Gua* wurden die UHPLC-Bedingungen variiert, um ein optimales Ergebnis zu erhalten. Das Fließmittel bestand aus MeCN und 0,2 % Essigsäure. Trotz Optimierung der UHPLC-Parameter konnte nicht für jede Testsäule ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden. Gründe hierfür waren z. B.: ein breiter Peak, eine unsymmetrische Peakform (tailing, oder fronting), sehr späte oder sehr frühe Retention des Analyten oder eine geringe Peakintensität (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Verwendete Testsäulen.

Testsäule	Eigenschaften/Stationäre Phase	Unzureichendes Ergebnis da:
<u>VDS optilab:</u>		
VDSpher PUR®HILIC-Z (150 * 4,6 mm; 5 µm)	HILIC, <i>zwitterionic-phase</i>	Breiter Peak, späte Retention
<u>VDS optilab:</u>		
VDSpher PUR® C18-E (50 * 4,6 mm; 1,8 µm)	RP, <i>octadecylsilan-phase endcapped</i>	Peakform- leichtes Tailing
<u>Waters:</u>		
UPLC® HSS T3 (50 * 3 mm; 1,8 µm)	RP, <i>octadecylsilan-phase</i>	Breiter Peak, geringe Peakintensität
<u>Waters:</u>		
Acquity UPLC® BEH Amid (50 * 3 mm; 1,7 µm)	HILIC, <i>amide-phase</i>	Zufriedenstellendes Ergebnis

3. Ergebnisse und Diskussion

Fortsetzung Tabelle 14

<u>Restek:</u> Raptor Fluorophenyl (50 * 2,1 mm; 2,7 µm)	RP or HILIC, core-shell, <i>pentafluorophenyl propyl- phase</i>	breiter Peak- leichtes Tailing, sehr frühe Retention
<u>Restek:</u> Ultra C18 (50 * 2,1 mm; 2,7 µm)	RP, core-shell, <i>octadecylsilan- phase endcapped</i>	breiter Peak-leichtes Tailing, frühe Retention, geringe Peakintensität
<u>Phenomenex:</u> Kinetex HILIC (100 * 2,1 mm; 2,6 µm)	HILIC, core-shell, <i>silica gel</i>	sehr breiter Peak- leichtes Tailing

Das beste Trennergebnis wurde mit der Waters Acquity UPLC BEH Amid Säule erzielt und den durch die in Tabelle 15 aufgeführten Einstellungen umgesetzt. Durch Einstellung eines Gradienten konnte eine optimale Leistung hinsichtlich Retentionszeit, Peakbreite und Signalintensität erhalten werden.

Tabelle 15: Parameter und HPLC-Einstellungen zur Detektion von N7-GA-Gua.

Parameter	Einstellung
Säule (Hersteller)	ACQUITY UPLC BEH Amid (Waters)
(Partikelgröße, Länge*Innendurchmesser)	1,7 µm, 3,0*50 mm
Trennmodus	HILIC
Mobile Phase	A: 0,2 % Essigsäure B: MeCN mit 0,2 % Essigsäure
Fließmittelgradient	0 Min: 90 % B und 10 % A 1,50 Min: 90 % B und 10 % A 5,25 Min: 50 % B und 50 % A 5,50 Min: 20 % B und 80 % A 7,00 Min: 20 % B und 80 % A 7,50 Min: 90 % B und 10 % A 11,00 Min: 90 % B und 10 % A

Fortsetzung Tabelle 15

Injektionsvolumen	5 µl (Tierproben) oder 10 µl (Humanproben)
Flussrate	400 µl/Min
Säulenofentemperatur	24° C
HPLC-System	Agilent 1290
Retentionszeit	3,99 Min

Ein repräsentatives Chromatogramm einer Messung der Testsubstanz unter Verwendung der Acquity UPLC BEH Amid Säule ist in nachfolgender Abbildung 26 gezeigt. Um die Sensitivität der Methode weiter zu steigern wurde im MRM-Modus (*multiple reaction mode*) gearbeitet.

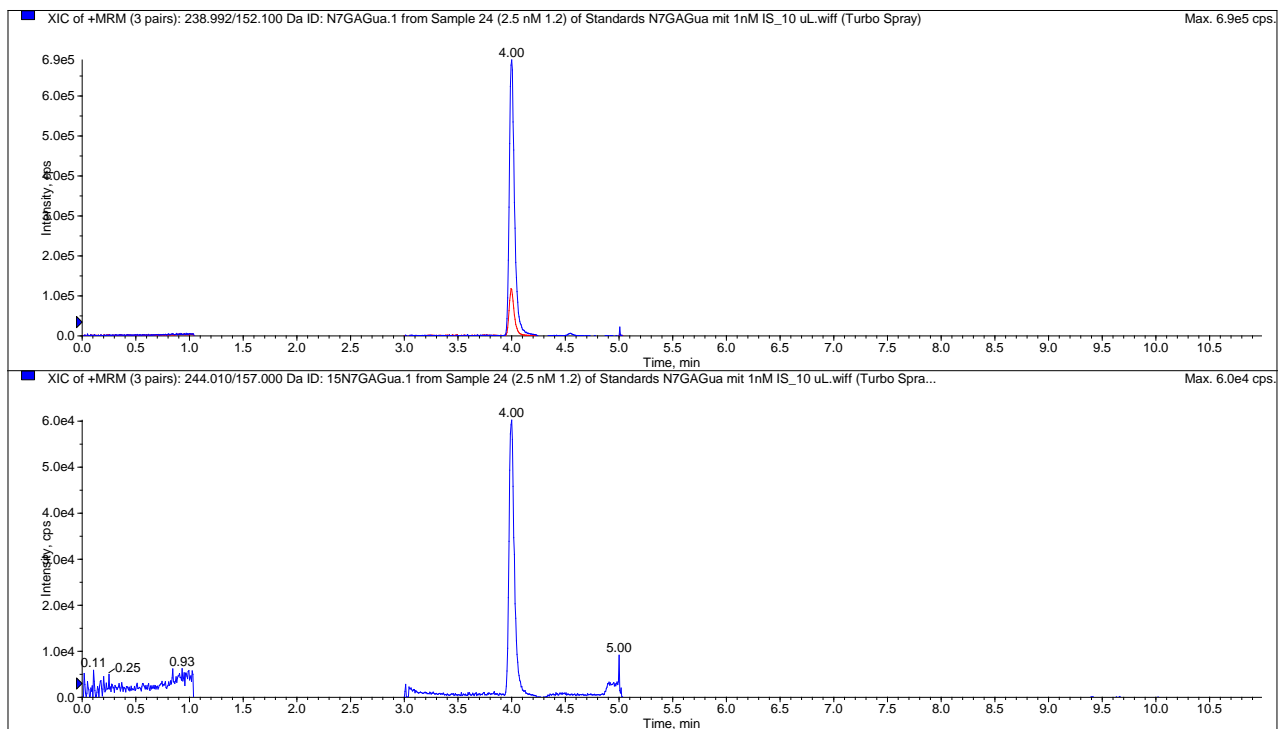


Abbildung 26: Repräsentatives UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Chromatogramm. Oben dargestellt: Spur des Analyten N7-GA-Gua, mit blau: erster Übergang (239→152) und rot: zweiter Übergang (239→110). Unten dargestellt: Spur des IS [¹⁵N₅]N7-GA-Gua (244→157). Die Retentionszeit der Substanzen beträgt 4,00 Min.

3.3.2 Methodvalidierung

Tuning Parameter

Nachdem die UHPLC-Bedingungen optimiert wurden, wurde an den Einstellungen des Massenspektrometers gearbeitet. Es erfolgte daher wie in Kapitel 5.6.3 beschrieben, die Kalibrierung der Tuning-Parameter. Die durch das Tunen erhaltenen Substanz- und Gerätespezifischen Parameter sind in nachfolgenden Tabellen, Tabelle 16 und Tabelle 17, aufgeführt. Die dwell time der Methode lag bei 120 msec.

Tabelle 16: LC-MS/MS-Bedingungen: Substanzspezifische Parameter. Mit .1: Erster Übergang, .2: Zweiter Übergang, Q1: Quadrupol 1 [m/z], Q3: Quadrupole 3 [m/z], DP: *declustering potential* [V], CE: *collision energy* [V], CXP: *cell exit potential* [V] und EP: *entrance potential* [V].

	Q1	Q3	DP	CE	CXP	EP
	[m/z]	[m/z]	[V]	[V]	[V]	[V]
N7-GA-Gua.1	238,992	152,1	111	27	10	10
N7-GA-Gua.2	238,992	110,0	51	47	4	10
[¹⁵N₅]N7-GA-Gua.1	244,010	157,0	131	27	12	10

Tabelle 17: LC-MS/MS-Bedingungen: Gerätespezifische Parameter. Mit .1: Erster Übergang, .2: Zweiter Übergang, Mit: CAD: *collisionally activated dissociation gas*, IS: *ionspray voltage* [V], TEM: *temperature* [°C], GS1: *nebulizer gas* [psi], GS2 *turbo heater gas* [psi] und CUR: *curtain gas* [psi].

Übergang	CAD	IS	TEM	GS1	GS2	CUR
		[V]	[°C]	[psi]	[psi]	[psi]
N7-GA-Gua.1	Medium	5500	550	55	60	60
N7-GA-Gua.2	Medium	5500	550	55	60	60
[¹⁵N₅]N7-GA-Gua.1	Medium	5500	550	55	60	60

Nachweis und Bestimmungsgrenzen

Nachweis und Bestimmungsgrenzen ergeben sich aus dem Verhältnis von Peakintensität des Analyten und dem Basisrauschen der Methode. Eine Peakintensität die dem 3fachen des Grundrauschens entspricht wird als Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) bezeichnet.

In vorliegender Arbeit lag das LOD bei 0,01 nM *N7-GA-Gua*. Als Bestimmungsgrenze (*limit of quantification*, LOQ) resultierte eine Stoffmenge von 0,025 nM *N7-GA-Gua*. In Abhängigkeit der eingesetzten DNA-Menge und des Probevolumen ergeben sich unterschiedliche LODs und LOQs, welche in Tabelle 18 aufgeführt sind.

Tabelle 18: LOD und LOQ in Abhängigkeit der DNA-Menge bei 0,01 nM und 0,025 nM.

DNA-Menge	Probevolumen	LOD [Anzahl an <i>N7-GA-Gua</i> - Addukten pro 10 ⁸ Nukleotiden]	LOQ [Anzahl an <i>N7-GA-Gua</i> - Addukten pro 10 ⁸ Nukleotiden]
200	20	0,03	0,08
200	30	0,05	0,12
50	20	0,13	0,33
50	30	0,20	0,5

Aufgrund der teilweise schwankenden Basislinie wurde auf eine mathematische Herleitung des LOD und LOQ-Wertes mittels Kalibriergeraden und Einsetzen des jeweiligen Grundrauschens in die Geradengleichung verzichtet.

Repräsentative Chromatogramme der 0,01 nM und 0,025 nM *N7-GA-Gua* Standards (mit je 1 nM [¹⁵N₅]*N7-GA-Gua*) bei einem Injektionsvolumen von 10 µl sind nachfolgend in Abbildung 27 und Abbildung 28 aufgeführt. Entsprechende Chromatogramme, resultierend aus einem Injektionsvolumen bei 5 µl und einer Molarität von 0,01 nM und 0,025 nM, sind im Anhang 7.3 enthalten.

3. Ergebnisse und Diskussion

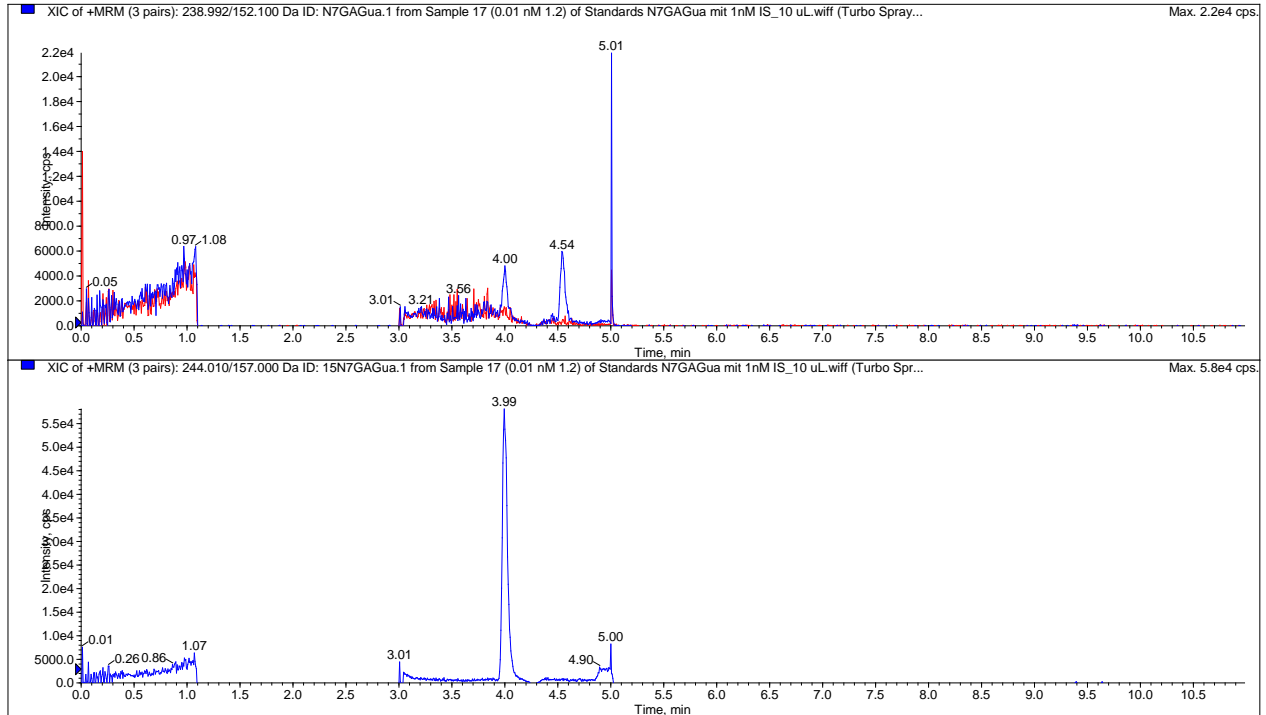


Abbildung 27: Repräsentatives UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Chromatogramm eines 0,01 nM Standards 10 μ l, $r = 4,00$ Min. Oben dargestellt: Spur des Analyten, mit blau: erster Übergang (239 \rightarrow 152) und rot: zweiter Übergang (239 \rightarrow 110). Unten dargestellt: Spur des IS (244 \rightarrow 157).

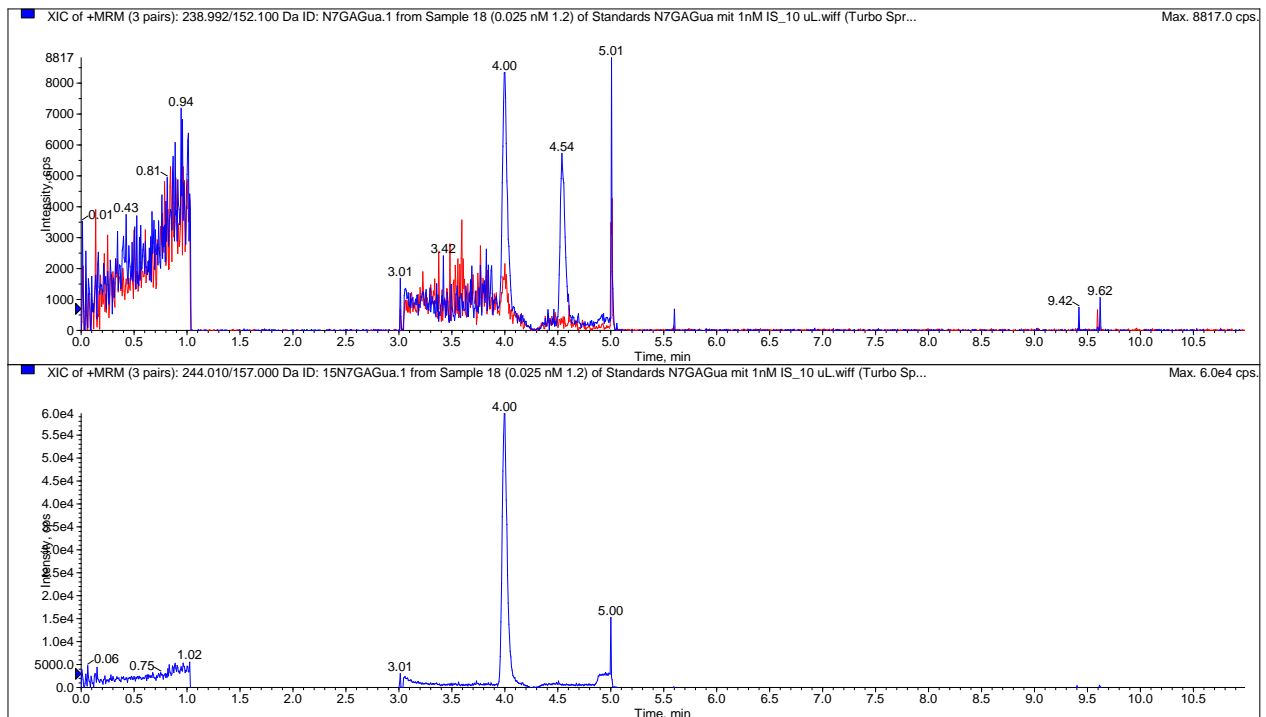


Abbildung 28: Repräsentatives UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Chromatogramm eines 0,025 nM Standards 10 μ l, $r = 4,00$ Min. Oben dargestellt: Spur des Analyten, mit blau: erster Übergang (239 \rightarrow 152) und rot: zweiter Übergang (239 \rightarrow 110). Unten dargestellt: Spur des IS (244 \rightarrow 157).

Linearität

Die Linearität einer Methode spiegelt die Sensitivität dieser innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches wider. Zur Bestimmung der Linearität werden Standards mit unterschiedlichen (ansteigenden) Konzentrationen an *N7-GA-Gua* und jeweils der gleichen Konzentration an [$^{15}\text{N}_5$]*N7-GA-Gua* (1 nM) angesetzt und vermessen. Durch Auftragen der Quotienten aus Stoffmenge (n) des Analyten und der Stoffmenge (n) des IS, gegen den Quotienten aus Peakarea des Analyten und der Peakarea des IS und anschließendem linearen FID kann die Linearität der Methode innerhalb eines definierten Konzentrationsbereichs bestimmt werden. Die dabei entstehende Regressionsgerade kann, sofern die Linearität zufriedenstellend ist, auch als Kalibriergerade zur Auswertung und Bestimmung der *N7-GA-Gua*-Gehalte verwendet werden. Eine Beispiel-Kalibriergerade, welche zur Quantifizierung von *N7-GA-Gua* in Humanproben verwendet wurde, ist in Abbildung 29 gezeigt. Weitere Kalibriergeraden sind in Anhang in Kapitel 7.3 aufgeführt.

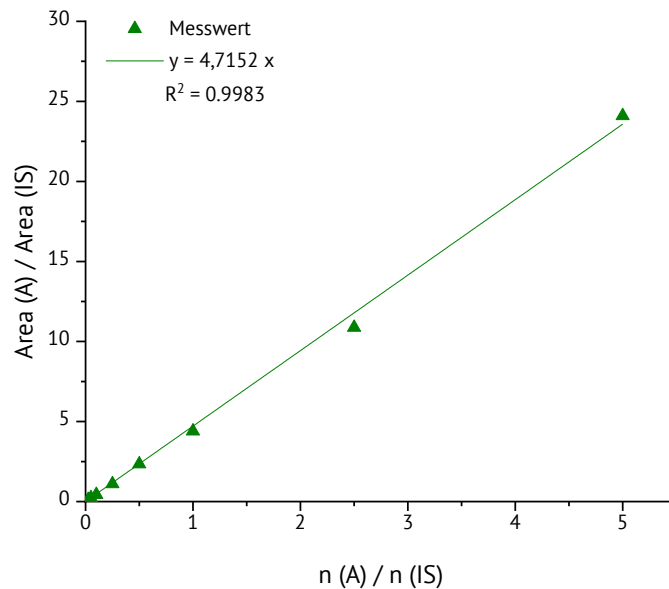


Abbildung 29: Kalibriergeraden zur Quantifizierung von *N7-GA-Gua* in Humanproben. Mit A: *N7-GA-Gua* und IS: [$^{15}\text{N}_5$]*N7-GA-Gua*. Injektionsvolumen 10 μl .

Lauf zu Lauf und Tag zu Tag Variabilität

Als nächstes erfolgte die Prüfung der Lauf zu Lauf und Tag zu Tag Variabilität. Das Vorgehen zur Bestimmung dieser Parameter erfolgt wie in Kapitel 5.6.7 beschrieben. Die Ergebnisse der Prüfung sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Lauf zu Lauf (A) und Tag zu Tag Variabilität (B) [%] bei einem Injektionsvolumen von 5 µl.

Standard [nM]	A [%]:		A [%]:			B [%]:
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	
0,05	2,64	3,08	3,03	3,77	4,62	0,1
0,1	2,17	1,88	3,82	2,54	2,81	0,2
0,5	1,44	2,06	3,28	3,28	2,55	0,8
1	1,54	1,57	2,09	1,61	2,13	1,9

Wie in Tabelle 19 zu sehen, liegt die Abweichung sowohl innerhalb eines Tages als auch während mehrerer aufeinander folgenden Tagen unterhalb 5 %. Die Schwankungen der Methode lagen damit in einem akzeptablen Bereich.

Wiederfindung

Zur abschließenden Validierung der Methode erfolgte die Bestimmung der Wiederfindung. Die Herstellung der Wiederfindungsproben ist in 5.6.8 beschrieben. Die Ergebnisse der Wiederfindung sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Absolute Wiederfindung.

Konzentration N7-GA-Gua [nM]	Wiederfindung in % ± Stabw.	Absolute Wiederfindung in % ±
	unter Berücksichtigung des IS bei 5 bzw. 10 µl Injektionsvolumen	Stabw. bei 5 bzw. 10 µl Injektionsvolumen
0,8	55 ± 6 bzw. 61 ± 8	12 ± 6 bzw. 16 ± 2
1	56 ± 4 bzw. 62 ± 4	17 ± 2 bzw. 17 ± 1
1,2	55 ± 2 bzw. 64 ± 5	16 ± 2 bzw. 18 ± 1

3.3.3 Optimierung der Probenaufarbeitung

Eine große Herausforderung im Zusammenhang mit der Entwicklung einer analytischen Methode bestand in der Probenaufarbeitung. Zum Zeitpunkt der Entstehung der vorliegenden Arbeit existierten mehrere UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methoden [Gamboa da Costa *et al.*, 2003; Doerge *et al.*, 2005c; Kurtz *et al.*, 2018]. Insbesondere im AK von Frau Prof. Richling der technischen Universität Kaiserslautern (TU KL) wurde bereits viel auf dem Gebiet Biomarker von AA geforscht [Watzek *et al.*, 2012b; Ruenz *et al.*, 2016; Goempel *et al.*, 2017]. Bei genauerer Betrachtung der in der Literatur veröffentlichten Methoden zur Bestimmung des N7-GA-Gua fiel auf, dass den UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methoden dieselben Probenaufarbeitungsschritte zugrunde lagen. Im ersten Schritt wird die DNA aus Zellen isoliert und dann mittels NTH das N7-GA-Gua freigesetzt. In einem weiteren Schritt wird die DNA mittels Festphasenextraktion (*solid state extraction*, SPE) oder mittels Zentrifugalfiltereinheiten aufgereinigt und schließlich *via* UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode vermessen. Eigene Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass diese Probenaufreinigung unzureichend war, da bei unbehandelten Proben N7-GA-Gua nicht detektiert werden konnte. Es lag die Vermutung nahe, dass durch unvollständige Probenaufreinigung der Probenmatrix, bestehend aus Pufferresten und DNA-Resten/-Bestandteilen, die Ionisierung des Analyten negativ beeinflusst wurde. Ein solcher Effekt wird auch als Matrixeffekt bezeichnet. Gelangt der Analyt zeitgleich mit anderen Matrixkomponenten in die Ionenquelle hinein, kann dies Einflüsse auf die Effizienz der Ionisierung des Analyten nehmen. Der Grund hierzu liegt in der Konkurrenz um die zur Verfügung stehenden Oberflächenladungen. Verglichen mit Messung des Analyten im Fließmittel, treten bei Messung des Analyten mit Probenmatrix Signalerhöhungen oder -suppressionen auf, welche mit einer Überschätzung bzw. Unterschätzung der Analytenkonzentration einhergehen können [Taylor, 2005]. Eine gängige Methode zur Aufreinigung großer lipohiler DNA-Addukte stellt die Butanol-Extraktion dar. Da der Analyt N7-GA-Gua aufgrund seiner chemischen Struktur sehr polar ist, wurden andere Aufreinigungsmethoden wie beispielsweise SPE ausprobiert. Ein zufriedenstellendes Ergebnis konnte damit nicht erzielt werden, sodass eine Butanol-Extraktion durchgeführt wurde. Eine einfache Version, bestehend aus nacheinander folgenden Extraktionen mit Butanol und einem abschließenden Waschschrift mit Butanol-gesättigtem Wasser, lieferte vergleichbare Ergebnisse, wie

ohne Butanol-Extraktion. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass der Analyt aufgrund seiner Polarität nicht in die Butanol-Phase übertritt bzw. im abschließenden Waschschriff mit Butanol-gesättigtem Wasser wieder in die wässrige Phase übergeht. Durch Ansäuern der wässrigen Phase zu Beginn (0,5 % Essigsäure) und Zugabe von Salzen (12 mg Ammoniumsulfat auf 125 µl Volumen), sowie eines Auslassens des Waschschriffes mit Butanol-gesättigtem Wasser, wurde eine Optimierung der Probenaufarbeitung ermöglicht. Hierdurch wurde auch in unbehandelten Proben, wie beispielsweise DNA aus pRH, N7-GA-Gua detektierbar.

Um die positiven Effekte der modifizierten Butanol-Extraktion genauer zu untersuchen bzw. darzustellen, wurde pRH-DNA aufgearbeitet, indem diese thermisch hydrolysiert und mittels Zentrifugalfiltereinheiten aufgereinigt wurde. Der zur Hydrolyse benötigte Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer) wurde nach Aufreinigung mittels Vakuumzentrifugation entfernt. Der Rückstand wurde in 85 % MeCN mit 0,5 % Essigsäure und 6 mM Ammoniumacetat aufgenommen. Zusätzlich wurden die Proben mit 1 nM Addukt sowie 1 nM IS versetzt. Weitere Reaktionsansätze, welche nicht in Lösemittel aufgenommen wurden, wurden einer Butanol-Extraktion mit nachfolgender Vakuumzentrifugation unterzogen. Am Ende wurde der Probenrückstand in 85 % Acetonitril mit 0,5 % Essigsäure und 6 mM Ammoniumacetat aufgenommen. Zusätzlich wurden die Proben mit 1 nM Addukt sowie 1 nM IS versetzt. Um die Ergebnisse besser interpretieren zu können, wurde neben den pRH-DNA-Proben auch ein Standard mitgeführt, welcher ähnliche Mengen an Addukt und IS enthielt, wie sie den Realproben zugesetzt wurde. Abbildung 30 zeigt die Chromatogramme des Referenzstandards (mit 1 nM Adduktes und 1 nM IS.) Im besten Falle sollten die Intensität in den Proben pRH mit denen des Standards vergleichbar sein.

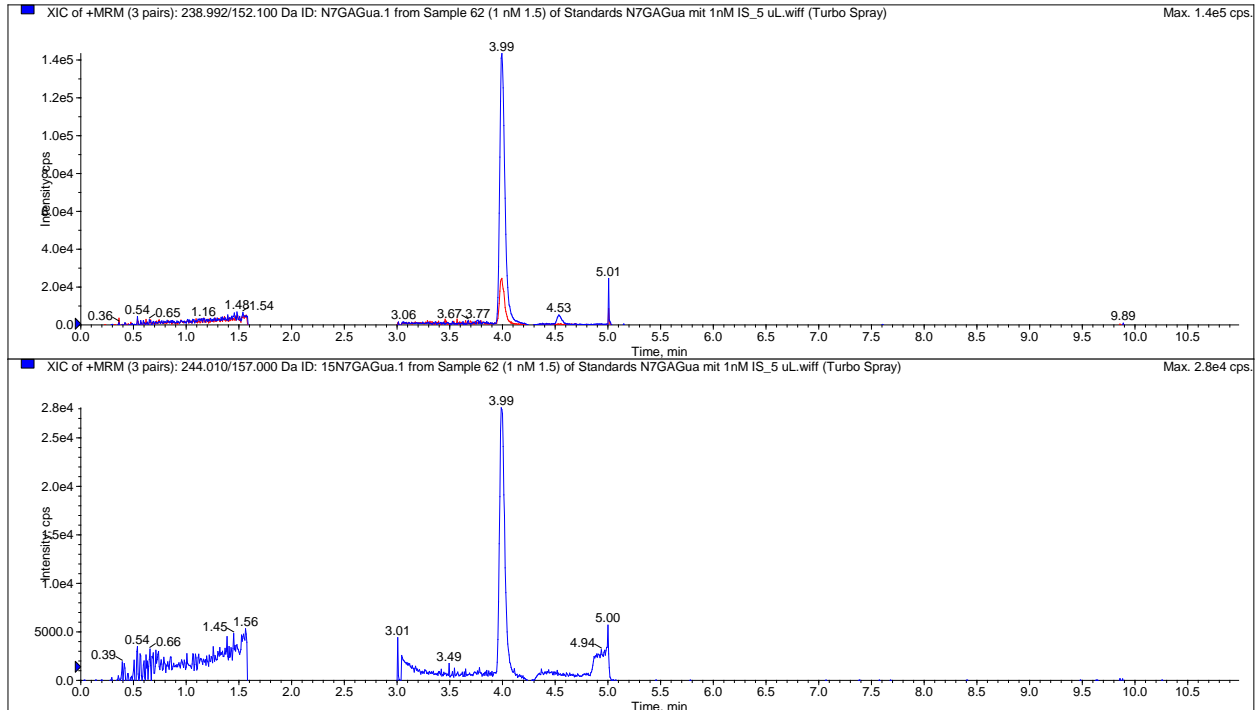


Abbildung 30: Repräsentatives UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Chromatogramm eines 1 nM Standards (aus 1 nM N7-GA-Gua mit 1 nM [¹⁵N₅]N7-GA-Gua) bei einem Injektionsvolumen von 5 µl, mit r = 3,99 Min. Oben dargestellt: Spur des Analyten, mit blau: erster Übergang (239→152) und rot: zweiter Übergang (239→110). Unten dargestellt: Spur des IS (244→157).

Wie in Abbildung 30 zu erkennen ist, liegt die Intensität des IS bei ca. $2,8 \cdot 10^4$ cps, während die des Analyten ca. $1,4 \cdot 10^5$ cps für den ersten Übergang und ca. $3 \cdot 10^4$ cps für den zweiten Übergang beträgt. Sowohl die Spur des IS als auch die des Analyten sind deutlich zu erkennen. Die Intensität hebt sich merklich von Hintergrund-Rauschen ab. Dies trifft nicht nur für den ersten Übergang des Analyten zu. Auch der zweite Übergang ist scharf zu erkennen.

Einen erkennbaren Unterschied zu den in Abbildung 30 gezeigten Chromatogrammen, weisen die Chromatogramme in Abbildung 31 auf. Es handelt sich dabei um eine Probe, bei welcher pRH-DNA thermisch hydrolysiert und mittels Vakkumzentrifugation aufgereinigt wurde. Eine Butanol-Extraktion wurde nicht durchgeführt.

3. Ergebnisse und Diskussion

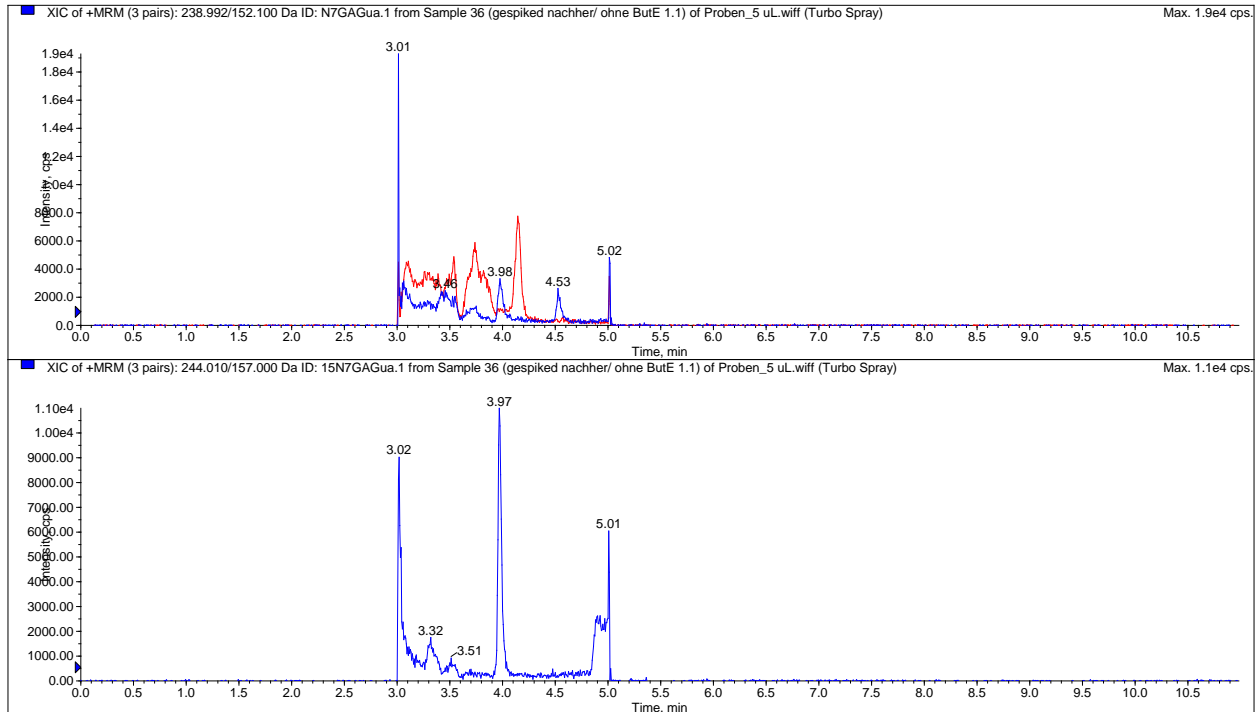


Abbildung 31: Repräsentatives UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Chromatogramm einer Realprobe, bei welcher Ratten-DNA thermisch hydrolysiert wurde und mittels Zentrifugalfiltereinheiten aufgereinigt wurde. Nach Vakkumzentrifugation wurde der Rückstand in Fließmittel aufgenommen und mit 1 nM N7-GA-Gua mit 1 nM [¹⁵N₅]N7-GA-Gua versetzt. Oberes Chromatogramm zeigt den ersten Übergang des Analyten in blau (239→152) und den zweiten Übergang des Analyten in rot (239→110). Unteres Chromatogramm zeigt die Spur des IS (244→157). Die Retentionszeit beträgt 3,98 Min (Addukt) bzw. 3,97 Min (IS).

Während die Intensität des IS in Abbildung 31 in einem ähnlichen Bereich wie die des IS aus Abbildung 30 liegt, ist die Spur des Analyten in Abbildung 31 mit knapp 4000 cps gegenüber der des Referenzstandards aus Abbildung 30 erniedrigt. Während somit die Intensität des IS verglichen mit dem Referenzstandard des Analyten und IS in Lösungsmittel (Abbildung 30) vergleichbar ist, ist die Intensität des Analyten in der Probenmatrix deutlich schlechter. Ein möglicher Grund für die geringere Intensität des Analyten könnte ein Matrixeffekt in Folge unzureichender Probenaufarbeitung sein. Für den IS scheint dies jedoch nicht zuzutreffen. Als mögliche Störkomponenten, welche die Ionisierung des Analyten in Folge eines möglichen Matrixeffektes negativ beeinflussen, wären TE-Puffer-Reste, sowie andere bei der thermischen Hydrolyse freigesetzte Nukleoside, Nukleotide oder DNA-Fragmente, welche kleiner als 3 kD sind und somit durch den Zentrifugalfilter passieren

können, denkbar. Verluste, welche aufgrund der Probenaufarbeitung z. B. in Folge von Pipettierschritten eintreten können, können ausgeschlossen werden, da die Zudotierung von Analyt und IS am Ende mit Aufnahme des Rückstandes in Lösungsmittel erfolgte.

Deutlich bessere Intensitäten des Analyten konnten nach Butanol-Extraktion erhalten werden. Ein repräsentatives Chromatogramm einer solchen Aufarbeitung ist in Abbildung 32 gezeigt.

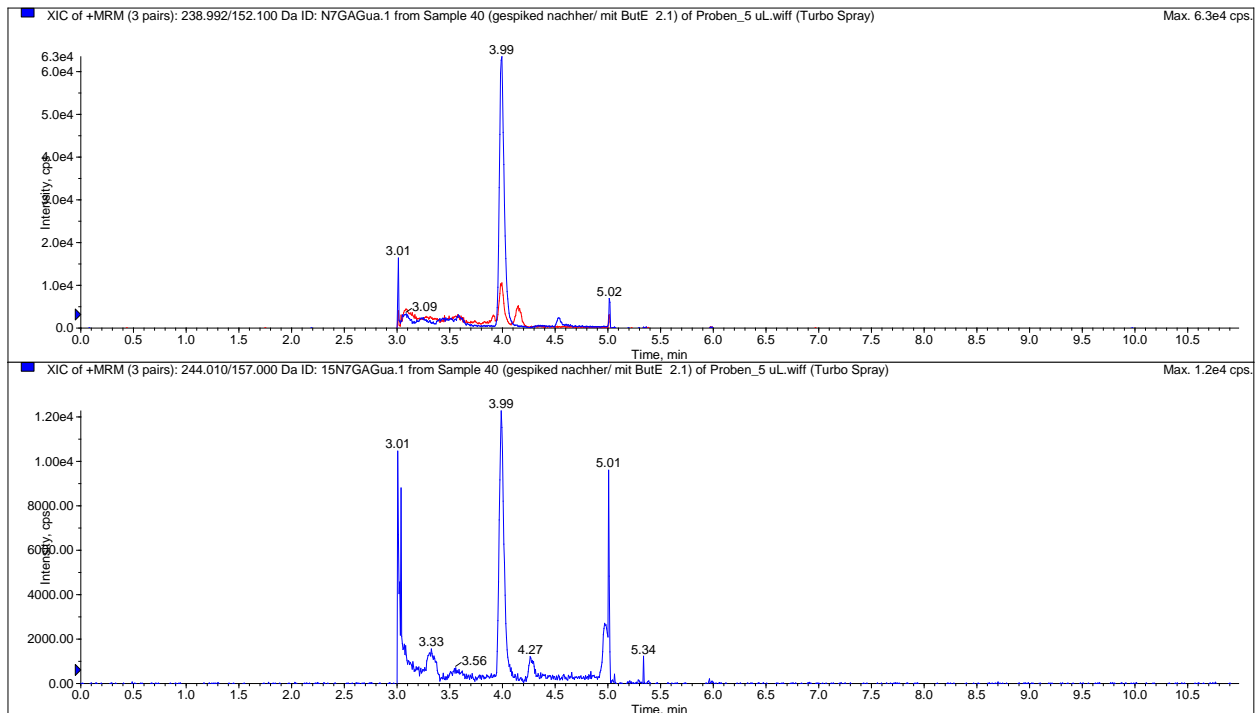


Abbildung 32: Repräsentatives UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Chromatogramm einer Realprobe, bei welcher Ratten-DNA thermisch hydrolysiert wurde und mittels Zentrifugalfiltereinheiten aufgereinigt und anschließend eine Butanol-Extraktion durchgeführt wurde. Nach der Extraktion wurde eine Vakkumzentrifugation durchgeführt und der Rückstand in Fließmittel aufgenommen und mit 1 nM N7-GA-Gua mit 1 nM [¹⁵N₅]N7-GA-Gua versetzt. Oberes Chromatogramm erster Übergang des Analyten in blau (239→152) und zweiter Übergang des Analyten in rot (239→110). Unteres Chromatogramm zeigt die Spur des IS (244→157). Die Retentionszeit beträgt 3,99 Min (Addukt) bzw. 3,99 Min (IS).

Wie in den vorhergehenden Abbildungen enthält auch Abbildung 32 zwei Chromatogramme. Das erste zeigt die Spur des Analyten, während das zweite, die des IS enthält. Es handelt sich bei Abbildung 32 um Chromatogramme, die aus Ansätzen pRH-DNA resultieren, welche neben einer

thermischen Hydrolyse und Aufreinigung mittels Zentrifugalfiltereinheiten auch einer Butanol-Extraktion unterzogen wurden. Sowohl der IS als auch die Spur des Analyten sind deutlich zu erkennen. Sowohl die Spur des IS als auch die des Analyten liegen mit ca. $1,20 \text{ e}^4 \text{ cps}$ bzw. ca. $6,3 \text{ e}^4 \text{ cps}$ in einem ähnlichen Bereich wie die des Referenzstandard. Auch der zweite Übergang des Analyten ist deutlich zu erkennen. Eine mögliche Erklärung für die gute Intensität des Analyten könnte sein, dass weniger Störkomponenten in der Probe enthalten sind, da diese bei der Extraktion mit organischen Lösemitteln nicht mit in die Butanol-Phase übergingen und somit die Ionisierung des Analyten nicht nachteilig beeinflussen konnten.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Butanol-Extraktion positive Effekte auf die Probenaufarbeitung hat, indem der in diesem Kapitel beschriebene Matrixeffekt reduziert wird. Bedingt durch die Extraktion mit Butanol ist in den Proben weniger Matrix enthalten, welche einen störenden Einfluss auf die Ionisierbarkeit des Analyten hat. Dadurch werden suppressive Effekte reduziert und die Ionisierung des Analyten verbessert. Die Intensität liegt bei vergleichbarer Molarität bei Proben mit Butanol-Extraktion deutlich über denen, bei welchen keine Butanol-Extraktion durchgeführt wurde.

3.4 DNA-Adduktgehalte in primären Rattenhepatozyten nach Inkubation mit Acrylamid

Nachdem die zuvor beschriebene HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode erfolgreich etabliert wurde, erfolgte im Anschluss eine Inkubation pRH mit der Substanz AA. Hierfür wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an AA (2; 20; 200; 500; 1000 und 2000 μM) für 1; 16 oder 24 h inkubiert. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Inkubation der Zellen mit AA dargestellt. Aufgetragen ist der Gehalt an *N7*-GA-Gua, angegeben als Anzahl an Addukten pro 10^8 Nukleotiden, gegen die Konzentration (in μM). Der Versuch wurde in mindestens drei unabhängigen Malen wiederholt. Insgesamt konnten für alle Messpunkte, Werte oberhalb des LOQ bestimmt werden. Bei einem Einsatz von 50 μg DNA und einem Probeendvolumen von 20 μl lag der LOQ der Methode bei 0,33 Addukten pro 10^8 Nukleosiden.

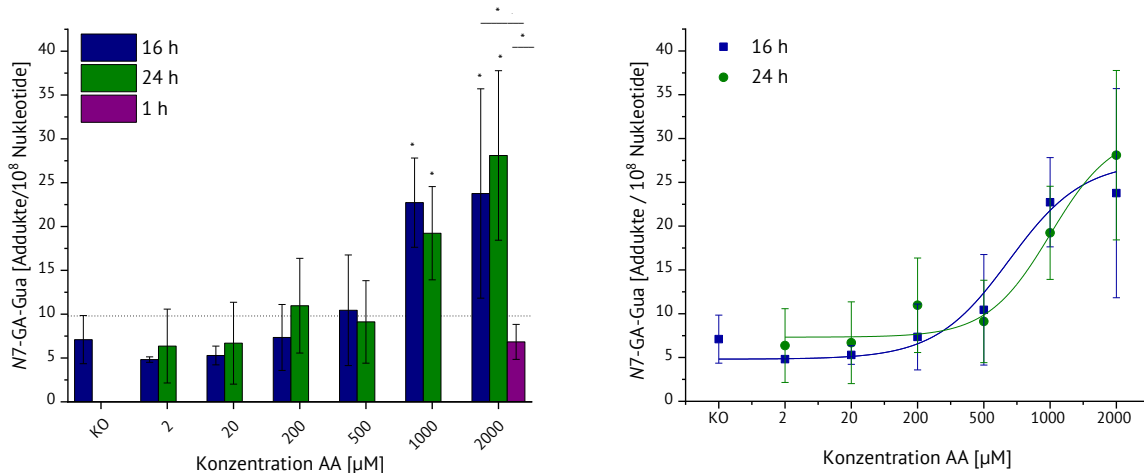


Abbildung 33: Ergebnisse der Inkubation pRH mit AA (2; 20; 200; 500; 1000 und 2000 μM) zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1; 16 oder 24 h) in Form unterschiedlicher Plot-Varianten. Links: Balken in blauer Farbe geben die Anzahl an Addukten nach 16h-Inkubation wieder, während Balken in grüner Farbe die Adduktgehalte nach 24h-Inkubation enthalten. Balken in lila Farbe enthalten die Ergebnisse nach 1h-Inkubation. Dargestellt sind die MW \pm Stabw. Ausreißer wurden mittels Nalimov-Tests bestimmt und gingen nicht in die Berechnung des MW ein $n = 3$ für 2 μM (16 und 24 h); 20 μM (16 und 24 h); 200 μM (16 und 24 h) 500 μM

3. Ergebnisse und Diskussion

(24 h); 1000 μM (16 h); und 2000 μM (24 h); $n = 4$ für 500 μM (16 h); 1000 μM (24 h) und 2000 μM (1 h); $n = 5$ für KO und 2000 μM (16 h). Die Bestimmung des Signifikanzniveaus erfolgte als Vergleich der behandelten Zellen mit der Kontrolle und als Vergleich einer Konzentration und unterschiedlichen Zeitpunkten mittels *Wilcoxon-Mann-Whitney-Test* (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$). Rechts: Wiederholte Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehung nach 16- und 24h-Inkubation mit AA. Eine Kurvenanpassung erfolgte mittels nichtlinearem Fit (Dose-Response). Signifikanzen wurden nicht eingezeichnet.

Abbildung 33 enthält die Ergebnisse des Inkubationsversuches, bei welchem pRH mit unterschiedlichen Konzentrationen an AA (2; 20; 200; 500; 1000; oder 2000 μM), für unterschiedliche Zeiträume (1; 16 oder 24 h) behandelt wurden. Nach einer Inkubationsdauer von 16 h nimmt mit zunehmender AA-Konzentration die Anzahl an N7-GA-Gua-Addukten zu. Im unterem Konzentrationsbereich (bis ca. 200 μM) liegen die Adduktgehalte im Bereich der unbehandelten Zellen. Nach Inkubation von 500 μM ist eine leichte Zunahme der Adduktgehalte auf $10,44 \pm 6,31$ N7-GA-Gua-Addukte pro 10^8 Nukleotide zu erkennen. Die gemessenen Gehalte sind damit gegenüber der Kontrolle (mit $7,10 \pm 2,75$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden) leicht erhöht. Mit zunehmender Konzentration an AA nimmt die Anzahl an N7-GA-Gua weiter zu und steigt bei höchster Testkonzentration von 2000 μM auf $23,77 \pm 11,94$ Addukten pro 10^8 Nukleotide an. Eine ähnliche Beobachtung kann nach einer 24h-Inkubation gemacht werden. In unterem Konzentrationsbereich liegen die Adduktgehalte im Bereich der Kontrolle. Bei 200 μM ist mit $10,97 \pm 5,40$ N7-GA-Gua Addukten pro 10^8 Nukleotiden in leichter Anstieg der Adduktgehalte zu beobachten. Anschließend sinkt die Anzahl an Addukten bei 500 μM auf $9,12 \pm 4,70$ Addukte pro 10^8 Nukleotide ab, steigt dann jedoch bei darauffolgender höherer Konzentration wieder an und erreicht nach Inkubation mit 2000 μM AA einen Wert von $28,10 \pm 9,67$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden. Verglichen mit den Ergebnissen nach 16 und 24 h, führt eine Inkubation von 1 h, mit Adduktgehalten von $6,84 \pm 2,00$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden, zu ähnlichen Addukt Mengen wie die der Kontrolle. Eine längere Inkubationszeit führt tendenziell zu höheren Adduktgehalten. Mit Ausnahme der 500 und 1000 μM Konzentration, liegen die Adduktgehalte nach 24 h, über denen der 16h- und 1h-Inkubation. Der rechte Teil der Abbildung dient der Veranschaulichung der Kurvenverläufe. Während bei 24h-Inkubation ein starker Anstieg der Adduktgehalte bei höheren Konzentrationen (ab 500 μM) zu

beobachtet ist, verläuft die Kurve der 16h-Inkubation bei 500–1000 μM ebenfalls steil, flacht dann allerdings bei 1000–2000 μM leicht ab.

Verglichen mit der Kontrolle weichen die erhaltenen Daten nach 24h-Inkubation mit 1000 und 2000 μM AA ($p = 0,014$ und $0,025$), sowie nach 16h-Inkubation mit 1000 und 2000 μM AA ($p = 0,025$ und $0,028$) signifikant von der Kontrolle ab. Neben signifikanten Ergebnissen nach Inkubation unterschiedlicher Konzentrationen verglichen mit der Kontrolle, können weitere signifikante Unterschiede zwischen unterschiedlichen Zeitspannen bei gleicher Konzentration beobachtet werden. Bei höchster Konzentration von 2000 μM weichen die Werte der 16h und 1h-Inkubation, sowie der 24h und 1h-Inkubation signifikant ($p = 0,027$ und $0,034$), voneinander ab. Die Ergebnisse der einzelnen Tiere finden sich in Anhang 7.4 wieder.

Anders als bei den Ergebnissen von Watzek (2012c), welcher ebenfalls eine zeitabhängige Inkubation (6; 8; 16 und 24 h) von pRH mit AA durchgeführt hatte und ausschließlich nach Inkubation der Zellen mit 2000 μM AA Addukte beobachten konnte, konnte in eigenen Untersuchungen gezeigt werden, dass bereits auch bei deutlich geringeren Konzentrationen als 2000 μM AA Addukte detektierbar sind. Eine mögliche Erklärung liefert die Methodenaufarbeitung. Zu Beginn der Arbeit wurde versucht eine ähnliche Probenaufarbeitung, wie sie von Watzek (2012c) oder Feld (2010) bzw. Gamboa da Costa (2003) gemacht wurde, durchzuführen [Watzek, 2012c; Feld, 2010; Gamboa da Costa *et al.*, 2003]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Probenaufarbeitung, wie in vorangehendem Kapitel beschrieben, um eine Butanol-Extraktion erweitert. Dadurch konnte die Ionisierung des Analyten und somit auch die Empfindlichkeit der Methode verbessert werden.

Ein weiterer Unterschied zwischen Watzek (2012c) und eigenen Untersuchungen besteht darin, dass die gemessenen Adduktgehalte nach 16h-Inkubation mit 127 ± 60 Addukte pro 10^8 Nukleotiden gegenüber der 24h-Inkubation mit 54 ± 18 Addukte pro 10^8 Nukleotiden erhöht waren. Entgegen den Ergebnissen von Watzek (2012c) liegen die Werte in vorliegender Arbeit nach 16h-Inkubation bei $23,77 \pm 11,94$ Addukten pro 10^8 Nukleotide unterhalb der Adduktgehalte nach 24h-Inkubation

mit $28,10 \pm 9,67$ Addukte pro 10^8 Nukleotiden. Bei genauerem Vergleich fällt auf, dass zum einen, in eigenen Experimenten, die Anzahl an Addukten nach Inkubation mit $2000 \mu\text{M}$ nach 16 und 24 h zwar voneinander abweichen, jedoch der Unterschied kleiner ausfällt als bei den Ergebnissen von Watzek (2012c). Selbst unter Berücksichtigung der Wiederfindung, mit > 52 und > 69 % (siehe Kapitel 3.1.7), wären ähnliche Gehalte der 24h-Inkubation von Watzek denkbar. Vergleichbare Gehalte wie die der 16h-Inkubation können allerdings nicht erzielt werden. Ein wesentlicher Unterschied in der Versuchsdurchführung in eigenen Untersuchungen und denen von Watzek (2012c) bestand in der in den Versuchen eingesetzten Zellzahl. Während in vorliegender Arbeit pro Petrischale 7 Mio Zellen ausgestreut wurden, wurde in den Versuchen von Watzek (2012c) mit 5 Mio Zellen pro Petrischale gearbeitet. Aus eigenen Vorversuchen wurde diese Zellzahl für zu gering erachtet, weshalb die Zellzahl auf 7 Mio Zellen angehoben wurde. Eine mögliche Ursache für die geringen Adduktgehalte in eigenen Untersuchungen, liefert die Lysemethode der pRH zur Gewinnung von der in den Zellen enthaltenen DNA. Verglichen mit anderen DNA-Addukten ist *N7-GA-Gua* recht instabil. Ein möglicher Grund für die Instabilität liefert die Bildung einer positiven Formalladung am *N7*-Atom nach Adduktbildung der DNA-Base dG mit GA. Gamboa da Costa und Kollegen (2003) konnten mittels Inkubationsversuchen mit isolierter Lachs-Hoden DNA und GA zeigen, dass die Halbwertszeit des *N7-GA-Gua* bei 21 bzw. 37 °C bei 750 bzw. 42 h liegt [Gamboa da Costa *et al.*, 2003]. Zu Beginn dieser Arbeit wurde versucht die thermische Hydrolyse der Zellen bei 37 °C durchzuführen. Selbst nach 24 h Lysezeit konnte keine oder nur eine sehr geringe Menge an DNA gewonnen werden, sodass die Temperatur auf 55 °C erhöht wurde. Dies erschien auch sinnvoll, da es sich hierbei um das Temperatur-Optimum der Proteinase K handelt. Das Enzym Proteinase K spaltet Peptidbindungen und wird für den Abbau von Proteinen in Zelllysaten zur Freisetzung von Nucleinsäuren eingesetzt. Die Lysezeit der thermischen Hydrolyse richtete sich nach den aufgearbeiteten Proben. Im Falle der pRH lag diese bei 4 h. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede könnte daher in der verlängerten Lysezeit bei höheren Temperaturen sein, welche mit einem möglichen Verlust des Adduktes einhergehen.

Ein weiterer Unterschied zu den Ergebnissen von Watzek (2012c) ist, dass dieser nach 16 h höhere Adduktgehalte als nach 24 h detektieren konnte. Als mögliche Erklärung des Rückgangs der Adduktanzahl mit steigender Inkubationszeit wurde u. a. eine effektivere DNA-Reparatur diskutiert [Watzek, 2012c]. Entgegen dem scheint in vorliegender Arbeit teilweise (mit Ausnahme der 500 und 1000 μM) eine längere Inkubationszeit auch zu einer vermehrten Addukt-Bildung, zum Teil statistisch signifikant, zu führen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen von Manière und Kollegen (2005), welcher männlichen Sprague-Dawley-Ratten einmalig eine AA-Dosis von 18 oder 54 mg/kg KG ($n = 4$; pro Gruppe) mittels Schlundsonde verabreichte und verschiedene Organe (Leber, Hoden und Gehirn) auf den Gehalt an *N7*-GA-Gua und *N3*-GA-Ade untersuchte. Die Organe der Tiere wurden 5; 24; 48 und 72 h nach Behandlung entnommen und auf den Gehalt an Addukten untersucht. Zwischen 5 und 24 h stieg die Anzahl an *N7*-GA-Gua-Addukten in der Leber an. Nach 24 h konnten die höchsten Gehalte des DNA-Addukten detektiert werden. Im weiteren Beobachtungszeitraum nahm die Anzahl an *N7*-GA-Gua ab. Die Halbwertszeit der gebildeten *N7*-GA-Gua Addukte in der Leber lag bei 50–70 bzw. 50–80 h nach Gabe von 54 bzw. 18 mg/kg KG [Manière *et al.*, 2005]. Allerdings handelt es sich bei dem Versuch von Manière und Kollegen (2005) um einen *in-vivo*-Versuch, weshalb zu beachten ist, dass *in-vivo*-Ergebnisse nicht ohne weiteres auf *in-vitro*-Daten übertragbar sind.

Bei weiterer Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass die gemessenen Adduktgehalte bei geringen Konzentrationen im Bereich Kontrolle liegen. Erst ab 200 μM (24h-Inkubation) bzw. 500 μM (16h-Inkubation) ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Adduktgehalte zu beobachten. Die nicht zu beobachtende Anstieg der Adduktgehalte bei geringen Konzentrationen lässt verschiedene Vermutungen zu. Zum einen könnte das Ausbleiben gentoxischer Effekte darauf zurückzuführen sein, dass das zu den Zellen hinzugegebene AA, bei geringen Konzentrationen im Medium verbleibt oder mit Bestandteilen des Mediums abreagiert und somit nicht in die Zellen gelangt und folglich auch keinen Schaden in der DNA induzieren kann. Um dies auszuschließen, wäre es ratsam gewesen, die Gehalte an AA im Medium zu messen. Die hierzu benötigte analytische Methode war im AK nicht verfügbar. Auch wäre denkbar, dass das AA zwar in die Zellen gelangt, jedoch die Zelle das Ausmaß

gentoxischer Ereignisse durch verschiedene Abwehrmechanismen, wie z. B. toxikokinetische Faktoren; enzymatische intrazelluläre Entgiftungsmechanismen oder ein effektives Reparatursystem, beschränkt [Greim und Albertini, 2015]. Es wäre denkbar, dass zwar *N7*-GA-Gua-Addukte entstehen, die Reparaturkapazität der Zelle jedoch ausreicht, um das Ausmaß des Schadens auf ein paar wenige Addukte pro 10^8 Addukte zu begrenzen. Da ein einziges Molekül eines gentoxischen Kanzerogens bereits zur Ausbildung eines DNA-Schadens führen kann, werden für gentoxische Kanzerogene, zu welchem auch AA und GA gezählt werden, bisher lineare Dosis-Wirkungsbeziehungen ohne Schwellenwert angenommen [Henderson *et al.*, 2000; Jenkins *et al.*, 2005; Jenkins *et al.*, 2010]. Neuere Studien stehen dem Schwellenwert-Konzept kritisch gegenüber [Doak *et al.*, 2007; Doak *et al.*, 2008; Jenkins *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2016]. Die Ergebnisse der Dosis-Wirkungsbeziehungen in vorliegender Untersuchung, insbesondere im Niedrigdosisbereich, deuten auf eine mögliche Wirkschwelle hin, unterhalb der die Anzahl an Addukten eine gewisse Anzahl an Addukten nicht überschreitet, wobei die Adduktgehalte im Bereich der Negativkontrolle liegen. Bei der Ermittlung einer Dosis-Wirkungsbeziehung werden in der Regel im Tierversuch die Dosen so gewählt, dass das Auftreten eines Effektes wahrscheinlich ist. Dies macht eine Extrapolation in geringe Dosisbereiche, bei denen eine Fortsetzung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung angenommen wird, notwendig. Eine lineare Extrapolation bei nicht linearem Verlauf kann zur möglichen Überschätzung oder Unterschätzung des Risikos führen [Europäische Kommission, 2003]. Eine andere Erklärung für den Verlauf der in Abbildung 33 dargestellten Konzentrations-Wirkungskurve im unteren Konzentrationsbereich wäre, dass ein gentoxischer Mechanismus über die Bildung von DNA-Addukten verstärkt erst bei höheren Konzentrationen auftritt und bei geringeren Konzentrationen ein weiterer Mechanismus zusätzlich greift. Die Möglichkeit eines nicht gentoxischen Wirkmechanismus, welcher nicht über die Bildung von DNA-Addukten induziert wird, wurde bereits in anderen Studien diskutiert. So konnten in V79-Zellen nach AA-Behandlung über 16 h Chromosomenabberationen detektiert werden. Aufgrund der geringen metabolischen Kompetenz dieser Zelllinie und der damit einhergehenden nicht oder nur verminderten Umsetzung des AA zu GA, liegt die Vermutung nahe, dass die Effekte nicht durch die Bildung von GA und nachfolgenden DNA-Addukten erklärbar sind [Martins *et al.*, 2007]. Als eine Ursache für die

gentoxische Wirkung von AA bei hohen Konzentrationen (mM) wird u. a. die Bildung von ROS und oxidativem Stress diskutiert [Jiang *et al.*, 07]. Möglicherweise tritt die Bildung von ROS und oxidativem Stress auch nach geringen Konzentrationen an AA auf, kann jedoch aufgrund des GSH-Status der Zellen kompensiert werden, sodass keine negativen Effekte erkennbar sind und diese erst bei höheren Konzentrationen auftreten. Eine solche konzentrationsabhängige Bildung von ROS konnte HepG2-Zellen nachgewiesen werden [Jiang *et al.*, 07]. Im Zusammenhang mit dem GSH-Status der Zellen konnte die fehlende Zunahme des N7-GA-Gua bei geringen Konzentrationen daraufhin deuten, dass zum einen das in den Zellen vorhandene AA mit GSH abgefangen wird und dadurch nicht mehr zu GA umgesetzt werden kann, zum anderen das dennoch gebildete GA teilweise zu N7-GA-Gua umgesetzt zum Teil jedoch auch mit GSH konjugiert wird. Folglich ist die Menge an gebildetem N7-GA-Gua beschränkt. Die effektive Konjugationsreaktion von GSH mit AA und GA in pRH wurde bereits von Watzek (2012c) bestätigt [Watzek, 2012c].

Die zeitabhängigen Kurvenverläufe unterscheiden sich leicht voneinander. Während im Falle der 24h-Inkubation die Kurve am Ende (ab 500 μM AA) steil ansteigt, ist der Anstieg nach 16h-Inkubation weniger steil. Dies könnte darauf hindeuten, dass bei höheren Konzentrationen möglicherweise mit einer Stagnierung oder einem Rückgang der Adduktgehalte zurechnen ist. Eine Stagnierung könnte auf eine Sättigung des CYP2E1-Metabolismus zurückzuführen sein. Untersuchungen zur Bildungskinetik von GA wurden von Watzek (2012c) durchgeführt, welche zeigen konnte, dass Inkubationskonzentrationen von 2000 μM AA über 24 h bei pRH auf eine Sättigung des CYP2E1-Metabolismus hindeuten [Watzek, 2012c]. Anders könnte auch der beobachtete Kurvenverlauf auf eine beginnende zytotoxische Wirkung des AA verweisen. Diese Vermutung deckt sich mit den Ergebnissen des durchgeführten Resazurin-Reduktionstest, bei welchem die Viabilität von pRH bei 24h-Inkubation mit 2,5 mM unter 80 % absank und ein IC_{50} -Wert von 7,99 mM berechnet werden konnte. Die Unterschiede zur 24h-Inkubation können auf eine möglicherweise effektivere DNA-Reparatur der Zellen schließen lassen, sodass die beschriebene Stagnierung oder der Rückgang der Adduktgehalte verzögert bzw. etwas verspätet eintreten.

Die insgesamt recht hohen Standardabweichungen lassen sich, wie bereits beschrieben, auf die Schwäche der Analysemethode (thermische Hydrolyse mit nachfolgender Aufarbeitung), die auf der Berechnung der Anzahl an Addukten in der gemessenen Probe anhand der Nukleotidanzahl in der eingesetzten DNA basiert, zurückführen. Bei der Berechnung der Gesamtnukleotide in der Probe wird davon ausgegangen, eine definierte Menge an DNA eingesetzt zu haben. Faktoren wie beispielsweise Ungenauigkeiten der Pipette werden dabei nicht berücksichtigt, gleichwohl diese bereits Einfluss auf die Höhe der Standard- oder Mittelwertabweichung haben können. Auch kann die Zellzahl einen Einfluss auf die Höhe der Standardabweichung ausüben. Durch Ungenauigkeiten bei der Zellzahlbestimmung, dem Ansetzen der zu verwendeten Zellsuspension und dem Ausstreuen der Zellen, kann die Zellanzahl in den ausgestreuten Petrischalen leicht variieren. Auch können die hohen Standardabweichungen daraus resultieren, dass pro Versuchsdurchführung Zellen unterschiedlicher Tiere verwendet wurden: Zum einen stammen die Zellen aus unterschiedlichen Tieren; die CYP-Gehalte in den pRH können daher von Tier zu Tier leicht schwanken. Zum anderen gelang die Gewinnung der Zellen aus voneinander unabhängigen Perfusionen, da für jedes Tier eine separate Perfusion durchgeführt werden musste. In Folge der durchgeführten, modifizierten Zwei-Stufen-Kollagenase-Perfusion nach Seglen (1976) wurden die Hepatozyten aus der Leber isoliert, wobei Zell-Zell-Kontakte gelöst wurden [Seglen, 1976; Schrenk *et al.*, 1992]. Ein Teil der Zellen geht dabei mittels Apoptose zugrunde, sodass die Viabilität stets zu prüfen war. Bei der durchgeführten Perfusion wurde darauf geachtet, dass diese oberhalb 90 % lag. Möglicherweise hatte die Perfusion auch Effekte auf die CYP2E1-Expression oder anderer Enzyme, wie dem GSH des Phase-II-Metabolismus. Möglicherweise kam es bedingt durch das Stehen der Zellsuspension zur Schädigung von einzelnen Zellen, was auch einen Einfluss auf die Enzym-Expression gehabt hätte. Es wurde daher immer versucht, die Zellsuspension schnell auf die gewünschte Zellzahl pro ml einzustellen und die Zellen auszustreuen.

Zusammenfassend konnte bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Inkubation pRH mit ansteigenden Konzentrationen an AA gezeigt werden, dass unabhängig der eingesetzten Konzentration bei jeder Testkonzentration, selbst in den unbehandelten Zellen, N7-GA-Gua bestimmt

werden konnten. Auch konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Adduktanzahl, insbesondere bei höheren Konzentrationen nachgewiesen werden. Tendenziell scheint eine längerer Inkubationsdauer zu höheren Addukt Mengen zu führen. Diese Ergebnisse unterscheiden sich deutlich von Watzek 2012c.

3.5 Hintergrundbelastung an DNA-Addukten in Ratte und Maus

Die Möglichkeit, sowohl nach Inkubation pRH mit AA als auch ohne AA-Inkubation Addukte in den Zellen detektieren zu können, gab Anlass zu weiteren Untersuchungen. Ziel war es, in den Geweben von verschiedenen Spezies (Wistar-Ratte, C57BL/6jRj-Maus und BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Maus) eine mögliche Hintergrundbelastung an AA festzustellen und diese mit Literaturdaten zu den Gehalten an N7-GA-Gua in unbehandelten Tieren zu vergleichen [Gamboa da Costa *et al.*, 2003; Doerge *et al.*, 2005abc; Von Tungeln *et al.*, 2009; Kurtz *et al.*, 2018].

Um die bisher publizierten Daten durch eigene Untersuchungen zu verifizieren und somit eine bessere Datenlage über die DNA-Adduktgehalte in unexponierten Tieren, zum einen unter Berücksichtigung der Spezies, sowie zum anderen unter Berücksichtigung des Geschlechtes und der Stoffwechsellage zu bekommen, wurden unterschiedliche Gewebe der Versuchstiere untersucht. Aufgrund der recht aufwendigen Probenaufarbeitung und Analytik war die Menge an untersuchten Geweben auf ausgewählte Organe begrenzt. Ein wichtiger Punkt für die Organ-Auswahl war die Menge der darin enthaltenen DNA. Die Untersuchung von Brustdrüse, Hoden und Schilddrüse, welche in Nagerstudien mit Ratten als mögliche Zielorgane der Verbindung AA identifiziert wurden, war daher aufgrund der nicht ausreichenden DNA-Menge nicht möglich.

Durch die hohe Empfindlichkeit der in vorliegender Arbeit entwickelten UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode, sollte es möglich sein, selbst in den unbehandelten Tieren Addukte zu detektieren und zu quantifizieren. Je höher die eingesetzte Menge an DNA und je geringer das Volumen nach Probenaufarbeitung, desto empfindlicher war die Methode. Bei einem Probenvolumen von 20 µl und einer (maximal) eingesetzten DNA-Menge von 200 µg DNA lag der LOD bzw. LOQ bei 0,03 bzw. 0,08 N7-GA-Gua Addukten pro 10⁸ Nukleotiden.

Für die Bestimmung der Hintergrundbelastung in Ratte und Maus wurden die Tiere nicht zusätzlich mit AA exponiert, obgleich die Tiere AA als natürliche LM-Kontaminante über das Futter aufnahmen.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Untersuchungen beschrieben und diskutiert. Je nach Spezies und Stamm stand den Tieren ein anderes Futter zur Verfügung. Mögliche Effekte in Folge des AA-Gehaltes im Futter konnten somit in den einzelnen Versuchen ausgeschlossen werden. Während die im Tierhaus der TU KL gezüchteten männlichen C57BL/6jRj-Mäuse und die von Janvier Labs gekauften männlichen Wistar-Ratten mit Altromin 1314TPF gefüttert wurden, erhielten die von Janvier Labs abstammenden männlichen und weiblichen C57BL/6jRj-Mäuse, sowie die ebenfalls von dort stammenden männlichen BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Mäuse ALIMENT S8189-S095 SNIFF als Futter. Der Gehalt an AA im Futter wurde extern durch Eurofins Lebensmittelanalytik Österreich GmbH mittels LC-MS/MS-Methode analytisch bestimmt. Die Bestimmungsgrenze der Methode lag bei 5 µg/kg. Als Ergebnis der Auftragsanalyse konnten höhere Gehalte an AA in Altromin 1314TPF gemessen werden. Der AA-Gehalt lag bei 31 µg/kg (31 ppb). Geringe Gehalte an AA wurden in dem zweiten Futter ALIMENT S8189-S095 SNIFF gemessen. Die Menge an AA lag bei 8 µg/kg (8 ppb). Ein freier Zugang zu Wasser wurde sichergestellt.

Sofern ausreichend DNA aus einem Organ eines Tieres zur Verfügung stand, wurden zwei Probenansätze DNA angesetzt und aufgearbeitet. Am Ende wurde jeder Ansatz einmal am Massenspektrometer vermessen. Lag der Wert zwischen LOD und LOQ wurde der LOQ-Wert zur Berechnung des MW verwendet.

3.5.1 DNA-Adduktbildung in Abhängigkeit der Spezies und des untersuchten Organs

Als erstes sollte die DNA-Adduktbildung, in Abhängigkeit der Spezies, als Unterschied zwischen Wistar-Ratte (männliche Tiere) und C57BL/6jRj-Maus (männliche Tiere) untersucht werden. Bei den hierzu eingesetzten C57BL/6jRj-Mäusen handelte es sich um im Tierhaus der TU KL gezüchtete Tiere.

Um die Anzahl an Tieren möglichst gering zu halten und dennoch ein potenzielles Signifikanzniveau bestimmen zu können, beschränkten sich diese Versuche auf drei Ratten und vier Mäuse. Es wurden Lunge und Nieren auf den Gehalt an *N7*-GA-Gua untersucht. Eine Aufarbeitung der Leber der Ratte war nicht möglich, da das Organ zur Perfusion zur Gewinnung von pRH Verwendung fand. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Messung der DNA-Adduktanzahl in Abhängigkeit der Spezies in Form eines Balkendiagrammes dargestellt. Die Einzeldaten pro Organ, welche von jedem Tier erhoben wurden, sind in Form einer Tabelle neben der grafisch dargestellten MW-Betrachtung aller Tiere enthalten.

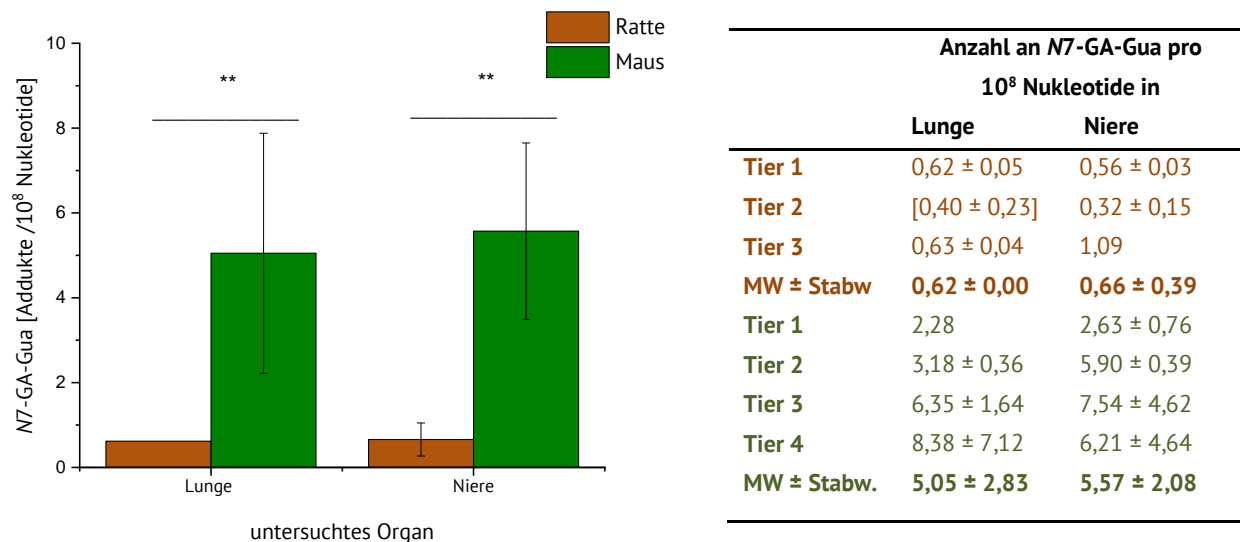


Abbildung 34: Links: *N7*-GA-Gua-Gehalte in Leber und Niere in Abhängigkeit der Spezies. Dargestellt sind die MW ± Stabw. Ausreißer wurden mittels Nalimov-Tests bestimmt und gingen nicht in die Berechnung des MW mit ein. Balken in brauner Farbe spiegeln die Gehalte an *N7*-GA-Gua in Leber und Lunge männlicher Wistar-Ratten ($n = 3$) wider, während Balken in grüner Farbe die Anzahl an Addukten in Leber und Lunge männlicher C57BL/6jRj-Mäuse ($n = 4$) wiedergeben. Die Bestimmung des Signifikanzniveaus erfolgte mittels *Wilcoxon-Mann-Whitney-Test* $* = p < 0,05$; $** = p < 0,01$; $*** = p < 0,001$). Rechts: Adduktgehalte in den einzelnen Untersuchungsorganen pro Tier. Die Farbkodierung entspricht der linken Graphik.

Wie in Abbildung 34 zu erkennen ist, sind die Gehalte an *N7-GA-Gua* in den Untersuchungsgeweben der Wistar-Ratte und C57BL/6Jrj-Maus unterschiedlich. Trotz der relativ hohen Standardabweichung, insbesondere bei den Ergebnissen der Maus überwiegen die Adduktgehalte in Leber und Niere dieser Tiere – deutlich erkennbar – gegenüber der Ratte. Die Adduktgehalte in der Ratte sind mit $0,62 \pm 0,00$ bzw. $0,66 \pm 0,39$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden in Lunge bzw. Niere gegenüber denen der Maus mit $5,05 \pm 2,83$ bzw. $5,57 \pm 2,08$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden in Lunge bzw. Niere hoch signifikant erniedrigt ($p = 0,003$). Während die Anzahl an *N7-GA-Gua* speziesabhängig voneinander abweicht, sind die Adduktgehalte innerhalb einer Spezies in den beiden untersuchten Organen sehr ähnlich. Weitere Untersuchungen zur Organabhängigkeit sind in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben. Unter Berücksichtigung der in Abbildung 34 dargestellten Ergebnisse liegt die Hintergrundbelastung an *N7-GA-Gua* (angegeben als Range zwischen MW-Stabw und MW+Stabw) in der Ratte bei den Testorganen in einem geschätzten Bereich von 0,3–1,0 Addukten pro 10^8 Nukleotiden. Die Hintergrundbelastung an Addukten der Maus hingegen liegt mit möglichen 2,2–7,9 Addukten pro 10^8 Nukleotiden gegenüber der Ratte erhöht.

Eine Erklärung für die tendenziell höhere Anzahl an Addukten in den Organen der Maus, liefert die erhöhte Empfindlichkeit der Maus – verglichen mit der Ratte – in Hinblick auf die DNA-Adduktbildung. Als Ursache hierfür wird der verstärkte oxidative Metabolismus, die Umsetzung von AA zu GA, diskutiert [EFSA, 2015]. Jedoch scheint dieser Unterschied mit der Dosis an AA in Zusammenhang zu stehen. Während geringe Dosen an AA zu ähnlichen *N7-GA-Gua*-Gehalten führen, werden bei höheren Dosen an Speziesunterschiede sichtbar [Doerge *et al.*, 2005abc]. Tatsächlich kann in vorliegender Arbeit eine statistisch signifikant höhere Anzahl an *N7-GA-Gua* in den Mäusen als in den Ratten gemessen werden. Diese Beobachtung einer Hintergrundbelastung von ca. kleiner 1 Addukt pro 10^8 Nukleotiden bei der Ratte, entspricht den Ergebnissen von Doerge und Kollegen (2005b). In Nagerstudien mit B6CF1-Mäusen (beide Geschlechter) und F344-Ratten (beide Geschlechter) lagen die Gehalte an *N7-GA-Gua* in der Leber der Kontrolltiere bei ca. 1 Addukt pro 10^8 Nukleotiden (Mäuse) bzw. kleiner 1 Addukt pro 10^8 Nukleotiden (Ratten) und somit unterhalb des durch die Methode festgelegten LODs. Während bei geringen Dosen an AA durch den Verzehr des

mit AA-haltigen Futters (ca. 10 µg/kg; 10 ppb) keine Speziesunterschiede beobachtet werden konnten, wurden jedoch Speziesunterschiede bei höheren Dosen AA beobachtet. Die Menge an N7-GA-Gua variierte in den Testgeweben (Leber; Lunge; Niere; Leukozyten und Hoden) von Ratten (beide Geschlechter; $n = 3-4$ pro Geschlecht) zwischen 270–960 N7-GA-Gua Addukten pro 10^8 Nukleotiden, während bei gleicher Dosierung an AA (einmalig 50 mg/kg *i. p.*) in den Mäusen (beide Geschlechter; $n = 3-4$ pro Geschlecht) in den Testorganen zwischen 840–2100 Addukte beobachtet werden konnten [Doerge *et al.*, 2005c].

In Bezug auf die unbehandelten Tiere in der hier vorliegenden Arbeit konnten geringe Mengen an N7-GA-Gua von Manière (2005) in männlichen Sprague-Dawley-Ratten detektiert werden. Die Adduktgehalte in den Testorganen der Kontrolltiere ($n = 4$) wurden in Leber, Hoden und Gehirn mit kleiner 0,5 Addukten pro 10^8 Nukleotiden beschrieben [Manière *et al.*, 2005]. Die hierin bestimmten Gehalte an N7-GA-Gua in Leber und Niere der Ratten liegen bei 0,3–1 Addukten pro 10^8 Nukleotide, und somit in einem ähnlichen Bereich wie von Manière (2005) und Doerge (2005bc) postuliert.

Deutlich höhere Gehalte an Addukten, zwischen 2,2–7,9 Addukten pro 10^8 Nukleotiden, konnten in der vorliegenden Arbeit in den Geweben der Maus detektiert werden. Verglichen mit den Ergebnissen von Doerge und Kollegen (2005a) sind diese Werte leicht erhöht, verglichen mit anderen publizierten Daten passen diese jedoch sehr gut zusammen. Untersuchungen von Gamboa da Costa und Kollegen (2003) ergaben in den Geweben unbehandelter Kontrolltiere von männlichen C3H/HeNMTV- und weiblichen C57B1/CN-Mäusen N7-GA-Gua-Gehalte von $7,3 \pm 1,1$; $5,4 \pm 0,6$ und $11 \pm 4,9$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden in Leber; Lunge und Niere. Ähnliche Gehalte mit $8,6 \pm 3,1$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden ergab die Untersuchung von Ganzkörper-DNA männlicher und weiblicher neonataler Mäuse. Ähnlich wie in vorliegender Arbeit, sind zum Teil recht hohe Standardabweichungen ersichtlich [Gamboa da Costa *et al.*, 2003]. Wie bereits in Kapitel 3.1 und Kapitel 3.4 genannt, sind solche enormen Standardabweichungen auf die Schwäche der Analysenmethode (thermische Hydrolyse mit nachfolgender Aufarbeitung) zurückzuführen.

Hinsichtlich der organabhängigen Menge an *N7-GA-Gua* konnte in den durchgeführten Untersuchungen kein klarer Trend beobachtet werden. Die erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass die Anzahl an *N7-GA-Gua* in den beiden Testorganen vergleichbar sind. Die Ergebnisse, ähnliche Adduktgehalte in unterschiedlichen Testorganen vorzufinden, wird durch weitere bereits publizierte Studien gestützt [Manière *et al.*, 2005; Doerge *et al.*, 2005abc; Gamboa da Costa *et al.*, 2003]. Eine leichte Erhöhung der *N7-GA-Gua*-Gehalte in der Niere spiegeln die Ergebnisse von Gamboa da Costa (2003) wider. Wie bereits beschrieben, lagen die Gehalte an *N7-GA-Gua* in der Lunge bzw. Niere bei $5,4 \pm 0,6$ und $11 \pm 4,9$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden. Jedoch ist zu beachten, dass diese Ergebnisse die MW aus den Addukt mengen weiblicher und männlicher Tiere darstellen. Verglichen hierzu stellen die in vorliegender Arbeit gezeigten Ergebnisse, die MW aus Einzeldaten männlicher Tiere dar. In Versuchen, bei welchen männlichen und weiblichen Tieren ($n = 3-5$; pro Geschlecht) einmalig 50 mg/kg AA *i. p.* verabreicht wurde und die Tiere 6 h nach Applikation getötet wurden, lag die Anzahl an gemessenen Addukten bei den männlichen Tieren in der Lunge höher als in der Niere. Bei den weiblichen Tieren hingegen übertrafen die Gehalte in den Nieren die der Lunge [Gamboa da Costa *et al.*, 2003]. Ähnliche Effekte konnte in den von Doerge (2005c) bereits beschriebenen Maus-Studie mit B6C3F₁-Mäusen beobachtet werden [Doerge *et al.*, 2005c]. Während in der Lunge die Menge an *N7-GA-Gua* in den männlichen Tieren gegenüber den weiblichen Tieren etwas erhöht war, lag die Anzahl an Addukt in den Nieren bei den weiblichen Tieren höher. Signifikante Unterschiede im Gehalt an *N7-GA-Gua* in Abhängigkeit der Untersuchungsorgane Lunge und Niere konnten ebenso wie bei Gamboa da Costa (2003) nicht beobachtet werden [Gamboa da Costa *et al.*, 2003].

Zusammenfassend kann somit die Beobachtung, der ähnlichen Addukt mengen in Lunge und Niere durch soeben beschriebene Studien bekräftigt werden. Als mögliche Ursache für die ähnlichen Gehalte an *N7-GA-Gua* in Niere und Lunge wären verschiedene Parameter denkbar. Zum Beispiel könnte die unterschiedliche Enzymausstattung von Nieren- und Lungen-Zellen einen Einfluss auf die Adduktmenge haben. Bei Ratten liegt die CYP2E1-Aktivität der Leber, 10fach über der der Lunge und 20fach über der der Niere [Zerilli *et al.*, 1995]. Verglichen dazu überwiegt die GST- und GSR-Aktivität, sowie der GSH-Status in der Niere gegenüber der Lunge [Langley-Evans *et al.*, 1996; Giannerini *et al.*,

2001; Konsue und Ioannides, 2008]. Des Weiteren wäre auch die Bildung eines organabhängigen Gleichgewichts zwischen DNA-Schädigung in Form der DNA-Addukte und DNA-Reparatur denkbar. Repeated Dose Studien mit B6C3F1-Mäusen ($n = 8$; beide Geschlechter) und F344-Ratten ($n = 4$; beide Geschlechter), die über das Trinkwasser täglich AA aufnahmen (1 mg/kg KG/Tag), zeigten die Einstellung eines *Steady State* Gehalte in der Niere nach 14 Tagen [Doerge *et al.*, 2005c]. Da die Tiere in vorliegender Arbeit kontinuierlich AA über das Futter aufnahmen, könnte eine *Steady State* Bildung vermutet werden.

3.5.2 DNA-Adduktbildung der Maus in Abhängigkeit des Geschlechts und des untersuchten Gewebes

Da ausschließlich männliche Wistar-Ratten bei der Perfusion eingesetzt wurden, konnte die DNA-Adduktbildung speziesübergreifend unter weiterer Berücksichtigung des Geschlechtes nicht zusätzlich untersucht werden. Zur Feststellung etwaiger geschlechtsabhängiger Effekte wurde die Lunge, die beiden Nieren und die Leber weiblicher und männlicher C57BL/6jRj-Mäuse untersucht und der Gehalt an *N7-GA-Gua* bestimmt. Anders als in vorherigem Kapitel, stammten die Tiere nicht aus der Zucht des Tierhauses der TU KL, sondern wurden von Janvier Labs käuflich erworben.

Um die Anzahl an Tieren möglichst gering zu halten und dennoch eine statistische Auswertung durchführen zu können, wurde die Anzahl auf fünf Tiere pro Geschlecht begrenzt. Neben der grafischen Darstellung sind die Einzeldaten in Form einer Tabelle neben der Grafik dargestellt.

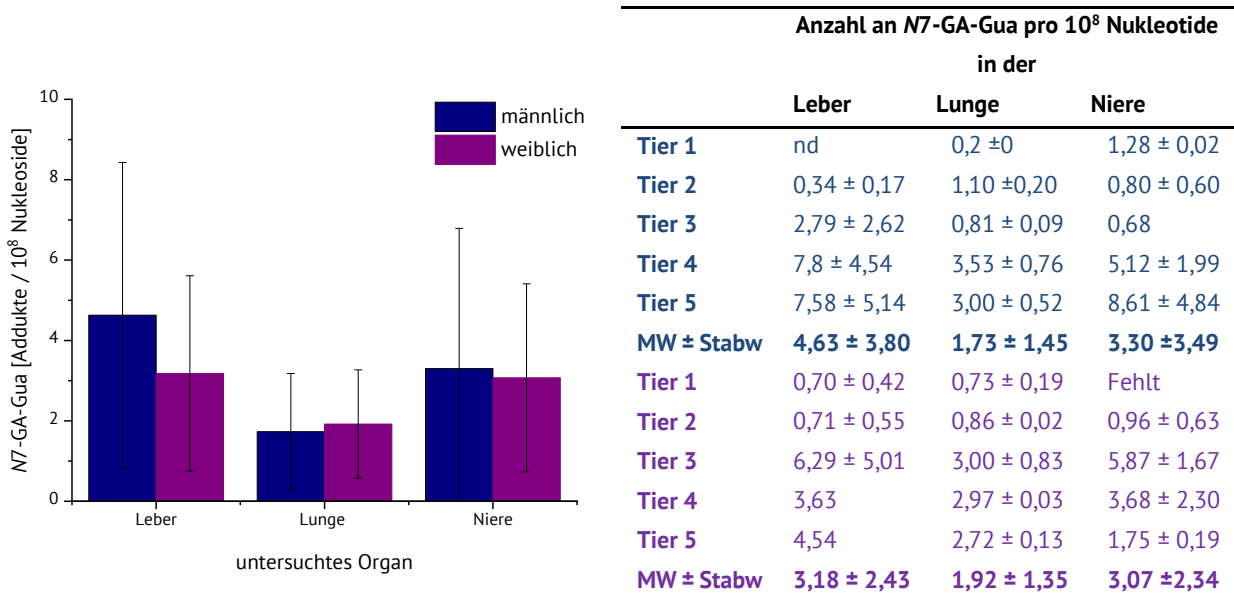


Abbildung 35: Links: Anzahl an N7-GA-Gua in Leber, Lunge und Nieren von männlichen und weiblichen C57BL/6jRj-Mäusen. Dargestellt sind die MW ± Stabw. Ausreißer wurden mittels Nalimov-Tests bestimmt und gingen nicht in die Berechnung des MW mit ein. Balken in blauer Farbe geben die Adduktanzahl in Leber, Lunge und den Nieren von männlichen C57BL/6jRj-Mäuse wieder, während Balken in lila Farbe die Anzahl an Addukten bei den weiblichen Tieren darstellen ($n = 5$; pro Geschlecht). Die Bestimmung des Signifikanzniveaus erfolgte mittels *Wilcoxon-Mann-Whitney-Test* * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). Rechts: Adduktgehalte in den einzelnen Untersuchungsorganen pro Tier. Die Farbkodierung entspricht der linken Graphik.

Wie in Abbildung 35 zu erkennen ist, ist die Standardabweichung in beiden Geschlechtern unabhängig des untersuchten Organs sehr hoch, was die Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse schwierig macht. Im Vergleich der untersuchten Organe, liegen die Adduktgehalte in der Lunge tendenziell am geringsten. Bei den weiblichen Tieren liegt die Anzahl an N7-GA-Gua bei $1,92 \pm 1,35$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden, bei den männlichen Tieren bei $1,73 \pm 1,45$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden. Etwas höhere Adduktgehalte können in der Niere mit $3,07 \pm 2,34$ bzw. $3,30 \pm 3,49$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden bei weiblichen Tieren bzw. männlichen Tieren detektiert werden. Die tendenziell höchsten Gehalte liegen mit $3,18 \pm 2,43$ bzw. $4,63 \pm 3,80$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden bei weiblichen bzw. männlichen Tieren in der Leber. Während die N7-GA-Gua-Gehalte in der Lunge bei den weiblichen Tieren etwas höher als bei den männlichen Tieren ausfällt, überwiegt die Anzahl an Addukten in Leber und Nieren andeutungsweise bei den männlichen Tieren. Statistisch

signifikante Ergebnisse konnten aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht bestimmt werden. Deutliche geschlechts- oder organspezifische Effekte sind daher auch nicht zu erkennen. Auch lassen sich dadurch keine klaren Trends ableiten. Die Anzahl an Addukten in den Organen ist kaum unterscheidbar. Signifikante Ergebnisse als Unterschied zwischen den Geschlechtern oder des untersuchten Organs innerhalb desselben Geschlechtes konnten somit nicht bestimmt werden.

Vergleichbare Adduktgehalte liefern die Ergebnisse von Gamboa da Costa (2003). Auch hier liegen die Gehalte an *N7-GA-Gua* in Abhängigkeit des untersuchten Gewebes zwischen 5–15 Addukten pro 10^8 Nukleotiden, ähnlich dem in vorliegender Arbeit detektiertem Bereich von mit bis zu 9 Addukten pro 10^8 Nukleotiden. Wie bereits beschrieben, lag dort die Anzahl an *N7-GA-Gua* in den Studien von Gamboa da Costa und Kollegen (2003) bei den unbehandelten Tieren bei $7,3 \pm 1,1$; $5,4 \pm 0,6$ und $11 \pm 4,9$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden in Leber; Lunge und Niere. Signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern wurden nicht beobachtet, weshalb die Adduktgehalte der unbehandelten Tiere sowohl aus den Ergebnissen männlicher als auch weiblicher Tiere stammen. Der AA-Gehalt im Futter wurde mit $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ (100 ppb) beschrieben [Gamboa da Costa *et al.*, 2003]. Die Adduktanzahl für unbehandelte Tiere in den Untersuchungen von Gamboa da Costa und Kollegen (2003) nimmt in folgender Reihenfolge ab: Niere > Leber > Lunge. Eine andere Reihenfolge ist nach einmaliger AA-Behandlung der Tiere mit $50 \text{ mg}/\text{kg}$ KG *i. p.* zu beobachten, zusammen mit einem deutlichen Anstieg der Adduktanzahl. Beispielsweise stiegen die *N7-GA-Gua*-Gehalte in der Leber bei den männlichen Tieren um das 160–240fache an. Während bei den männlichen Tieren die Gehalte im Anschluss der AA-Gabe in Leber und Lunge vergleichbar waren und gegenüber der Niere überwogen, war in den weiblichen Tieren die höchste Anzahl an *N7-GA-Gua* in den Nieren zu finden. Die Adduktmenge nahm in den weiblichen im Gegensatz zu den männlichen Tieren nach AA-Gabe wie folgt ab: Niere > Lunge > Leber. Bei Betrachtung der einzelnen Organe war in der Literatur die absolute Anzahl an *N7-GA-Gua* in Leber und Lunge bei den männlichen Tieren signifikant gegenüber den weiblichen Tieren erhöht. Im Gegenzug dazu überwog jedoch die Anzahl an Addukten in der Niere der weiblichen Tiere signifikant jener der männlichen Mäuse [Gamboa da Costa *et al.*, 2003].

Auch in der bereits des Öfteren beschriebenen Studie von Doerge (2005c) konnten signifikante Unterschiede nach einmaliger Applikation einer AA-Dosis von 50 mg/kg KG *i. p.* gemacht werden, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen der Adduktanzahl in weiblichen und männlichen Tieren beobachtet wurden. Als Ursache für das Ausbleiben von signifikanten Unterschieden wurde eine zu geringe Anzahl an Tieren sowie die geringe Dosis an AA diskutiert [Doerge *et al.*, 2005a].

Ebenso konnten von Tungeln und Kollegen (2009) signifikante Unterschiede in den Adduktgehalten in verschiedenen Testorganen (Leber, Lunge, Knochenmark und Milz) von B6C3F1/Tk1/1-Mäusen ($n = 4-11$; pro Geschlecht und Dosierung) feststellen, denen 0,14 mM oder 0,70 mM AA pro kg/KG Tag an Tag 1, 8 und 15 *postnatal i. p.* AA verabreicht wurde. Die höchsten Gehalte an N7-GA-Gua wurden in der Lunge beobachtet. Geringere Gehalte fanden sich in absteigender Reihenfolge in Leber, Milz und Knochenmark wieder. Signifikante geschlechterabhängige Effekte konnten allerdings wiederum nicht festgestellt werden. Eine ähnliche Beobachtung ergab sich, wenn die Tiere ($n = 1-11$; pro Geschlecht und Dosierung) an Tag 1–8 *postnatal* mit 0,14 oder 0,70 mM AA pro kg/KG *i. p.* behandelt wurden [Von Tungeln *et al.*, 2009].

Zusammenfassend lässt sich der beschriebene Vergleich mit der Literatur auf folgende Aussagen reduzieren: Bei unbehandelten Tieren konnten, in Übereinstimmung mit den genannten Quellen, keine signifikanten Unterschiede, weder bei den Gehalten in unterschiedlichen Geweben, noch zwischen den Geschlechtern, beobachtet werden. Sofern in den bekannten Vorarbeiten signifikante geschlechterabhängige Effekte beobachtet werden konnten, traten diese erst nach Behandlung der Tiere mit höheren einmaligen Dosen an AA (oftmals 50 mg/kg KG Tag) auf. In vorliegender Arbeit wurden die Tiere nicht mit AA behandelt; die Aufnahme erfolgte ausschließlich über das Futter. Eine mögliche Ursache der vorgenannten, nicht signifikanten Unterschiede bei den unbehandelten / Kontrolltieren ist die Bildung von *Steady State Levels*, vorrangig in der Leber. Dies wäre angesichts der kontinuierlichen Futteraufnahme der Nagetiere denkbar. Als zentrales Stoffwechselorgan nimmt die Leber eine besondere Rolle im Stoffwechsel von Substanzen ein. Abbauprodukte, die in der Leber gebildet werden, können je nach Struktur auf verschiedenen Wegen aus dem Körper ausgeschieden

werden. Hydrophobe Stoffe gelangen über die Gallenkapillaren in den Darm und werden anschließend mit dem Stuhl ausgeschieden. Hydrophile Verbindungen hingegen können mittels der in der Leber vorkommenden Lebersinusoide in den Blutkreislauf und damit in die Nieren gelangen und mit dem Urin ausgeschieden werden. Stoffe, die in den Blutkreislauf eintreten, können auch in die Lunge gelangen. Die Bildung von *Steady State Levels* in der Leber, könnte damit auch zur Bildung von *Steady State Levels* in den Nieren bzw. in der Lunge führen. Als Ursache für die Bildung von *Steady State Levels*, wäre ein organabhängiges Gleichgewicht zwischen DNA-Schädigung in Form von N7-GA-Gua-Addukten und DNA-Reparatur denkbar. Einen weiteren Einfluss auf die Addukt-Menge in den Testgeweben, könnte die unterschiedliche Enzymausstattung der Zellen liefern.

3.5.3 DNA-Adduktbildung in Abhängigkeit der Stoffwechsellage und des untersuchten Gewebes

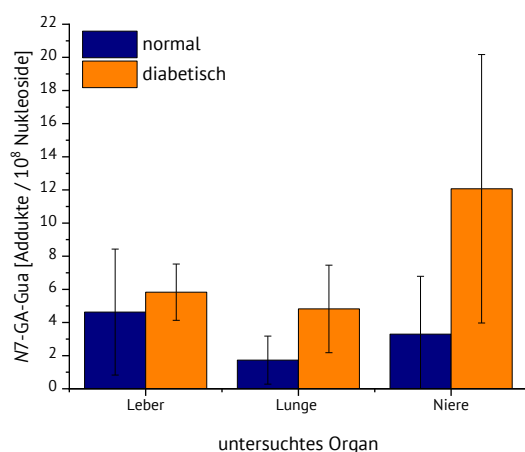
Als nächstes erfolgte die Bestimmung der DNA-Adduktgehalte abhängig von der Stoffwechsellage. Wie bereits in Kapitel 2.4.4 beschrieben, wird AA auch möglicherweise endogen gebildet [Tareke *et al.*, 2008; Watzek *et al.*, 2012a; Ruenz *et al.*, 2016; Goempel *et al.*, 2017]. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die Bildung von sogenannten *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs). Es handelt sich dabei um heterozyklische Verbindungen, die durch Glykation exogen oder endogen gebildet werden [Vistoli *et al.*, 2013]. Erhöhte AGE-Spiegel im Blut sind beispielsweise bei Diabetes Mellitus Erkrankten zu finden [Rhee und Kim, 2018]. Der Grund hierfür liegt in der veränderten Stoffwechsellage beim Diabetiker. Je nach Form der Erkrankung liegt absoluter (Typ1) oder relativer (Typ2) Insulinmangel vor [American Diabetes Association, 2017]. Während es sich beim Typ1 Diabetes um eine Autoimmunerkrankung handelt, welche sich in der Regel im Kindesalter manifestiert, entsteht der Typ2 meist im Erwachsenenalter und kann durch verschiedene Faktoren wie Übergewicht etc. erworben werden [Kahaly und Hansen, 2016; Heideman *et al.*, 2013]. Das Peptidhormon Insulin reguliert den Blutzuckerspiegel, indem es die Aufnahme von Glukose in die Zellen regelt. Ist diese Insulinausschüttung gestört, hat dies Auswirkungen auf den Blutzuckerspiegel. Generell neigen Diabetiker daher zu erhöhten Blutzuckerspiegeln, sowie tendenziell erhöhten AGE-Werten [Rhee und Kim, 2018]. Die Untersuchung der DNA-Adduktmenge in Abhängigkeit der Stoffwechsellage erfolgte in vorliegender Arbeit durch Untersuchung der Leber,

Lunge und den Nieren von BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR und C57BL/6jRj-Mäusen. Erstere wurden als Modellstamm für einen Typ2 Diabetes ausgewählt. Im nachfolgenden Ergebnisteil werden die BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Mäuse oftmals als diabetische Tiere oder Tiere mit veränderter Stoffwechsellage bezeichnet. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Tiere neun Wochen alt.

Die Anzahl der Tiere wurde auf fünf pro Gruppe beschränkt. Es handelte sich bei beiden Gruppen um ausschließlich männliche Tiere.

Eine Überprüfung der diabetischen Stoffwechsellage z. B. durch Messung des Blutzuckerspiegels bei den BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Mäusen konnte aufgrund fehlender Gerätschaften nicht durchgeführt werden. Aufgrund des Alters der Tiere zum Zeitpunkt der Untersuchung von neun Wochen wurde davon ausgegangen, dass die Tiere bereits eine diabetische Stoffwechsellage des Typ2 Diabetes entwickelt hatten. Im Gegensatz zu den Nichtdiabetes Tieren, wurde bei den diabetischen Tieren deutlich häufigere Flüssigkeitsaufnahme beobachtet. Dies könnte auf ein übermäßiges Durstgefühl hindeuten, was als Zeichen eines Diabetes gedeutet werden könnte. Auch waren die Tiere deutlich dicker als die gesunden Tiere und dadurch zum Teil in ihrer Bewegung eingeschränkt. Dies stützt die Annahme, dass ein Diabetes Mellitus Typ2 vorliegen könnte, da Übergewicht die Ausbildung dieser Erkrankung fördert.

3. Ergebnisse und Diskussion



	Anzahl an <i>N7</i> -GA-Gua pro 10 ⁸ Nukleotide in der		
	Leber	Lunge	Niere
Tier 5	nd	0,2 ± 0	1,28 ± 0,02
Tier 6	0,34 ± 0,17	1,10 ± 0,20	0,80 ± 0,60
Tier 7	2,79 ± 2,62	0,81 ± 0,09	0,68
Tier 8	7,8 ± 4,54	3,53 ± 0,76	5,12 ± 1,99
Tier 9	7,58 ± 5,14	3,00 ± 0,52	8,61 ± 4,84
MW ± Stabw	4,63 ± 3,80	1,73 ± 1,45	3,30 ± 3,49
Tier 15	5,97 ± 2,35	2,89 ± 2,93	6,23 ± 2,29
Tier 16	5,17 ± 0,63	3,02 ± 1,34	23,99
Tier 17	4,10 ± 0,91	[14,72 ± 11,21]	8,00 ± 5,90
Tier 18	8,10 ± 2,57	8,54 ± 4,18	10,11 ± 6,77
Tier 19	[17,80 ± 14,16]	4,81 ± 0,86	fehlt
MW ± Stabw	5,83 ± 1,70	4,82 ± 2,64	12,07 ± 8,10

Abbildung 36: Anzahl an *N7*-GA-Gua in Leber, Lunge und Nieren von männlichen C57BL/6jRj-Mäusen und männlicher BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR- Mäuse ($n = 5$; pro Stamm). Dargestellt sind die MW ± Stabw. Ausreißer wurden mittels Nalimov-Tests bestimmt und gingen nicht in die Berechnung des MW mit ein. Balken in blauer Farbe geben die Anzahl an Addukten in den Organen männlicher C57BL/6jRj-Mäuse wieder. Balken in orangener Farbe spiegeln die Adduktgehalte der Organe der männlicher BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Mäuse wider. Die Bestimmung des Signifikanzniveaus erfolgte mittels *Wilcoxon-Mann-Whitney-Test* * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$). Rechts: Adduktgehalte in dem einzelnen Untersuchungsorganen pro Tier. Die Farbkodierung entspricht der linken Graphik.

Wie in Abbildung 36 zu erkennen ist, sind die Standardabweichungen, wie in den vorhergehenden Untersuchungen, relativ groß. Aufgrund dieser Schwankungen sind Beschreibung und Auswertung der Daten schwierig. Tendenziell vergleichbare Adduktgehalte können in der Leber von diabetischen Tieren und den Kontrolltieren detektiert werden. Die Anzahl an *N7*-GA-Gua liegt bei $4,63 \pm 3,8$ bzw. $5,83 \pm 1,70$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden bei den gesunden bzw. bei den diabetischen Tieren. Ähnliche Gehalte sind auch in der Lunge der Tiere zu beobachten. Die Adduktgehalte in der Lunge liegen bei $1,73 \pm 1,45$ bzw. $4,85 \pm 2,64$ Addukten pro 10^8 Nukleotide bei den nicht diabetischen bzw. diabetischen Tieren. Die potenziell höchste Anzahl an *N7*-GA-Gua kann in den Nieren der BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Mäusen festgestellt werden. Die Adduktgehalte liegen hier bei $12,07 \pm 8,10$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden. Verglichen hierzu liegt die Anzahl an *N7*-GA-Gua in den C57BL/6jRj-Mäuse mit $4,85 \pm 2,64$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden erniedrigt. Die Anzahl an Addukten nimmt bei den C57BL/6jRj-Mäusen tendenziell in folgender Reihenfolge ab: Leber > Niere > Lunge. Eine andere

Reihenfolge ist bei den Tieren mit veränderter Stoffwechsellage zu beobachten. Die Reihenfolge nimmt hier tendenziell in folgender Auflistung ab: Niere > Leber > Lunge. Aufgrund der hohen Standardabweichungen konnten bei der durchgeführten Signifikanzanalyse keine signifikanten Ergebnisse ermittelt werden. Es konnten weder signifikante Unterschiede im selben Organ unterschiedlicher Tierstämme noch in unterschiedlichen Organen desselben Stammes ermittelt werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse des Versuches darauf hin, dass die Stoffwechsellage einen eher geringen Einfluss auf die Anzahl an Addukten hat. Tendenziell liegen die Adduktgehalten bei den BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR gegenüber den C57BL/6JrJ-Mäusen erhöht. Bei den Adduktgehalten der Niere ist dieser Unterschied am stärksten zu erkennen.

Eine mögliche Erklärung für die wie auch bei den anderen Versuchen zur Hintergrundbelastung großen Standardabweichungen, kann auf das bereits beschriebene Problem der Probenaufarbeitung zurückzuführen sein. Des Weiteren werden MW dargestellt, welche sich aus Ergebnissen einzelner Tiere zusammensetzen. Durch individuelle Unterschiede in der AA-Aufnahme oder im Metabolismus kann die Menge an *N7-GA-Gua* bei einem einzelnen Tier von der Anzahl an Addukten in einem anderen Tier unterschiedlich sein.

Bei den BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Mäusen ist tendenziell, wenn auch nicht signifikant, die Anzahl an *N7-GA-Gua* in der Niere gegenüber den anderen beiden Testorganen (Lunge und Leber) erhöht. Dies könnte möglicherweise auf Veränderungen der Niere in Folge einer Diabetes-Erkrankung erklärt werden. Aufgrund chronisch erhöhter Blutzucker-Werte kommt es zu Veränderungen der Nierenkörperchen, was mit einer Beeinträchtigung der Filtrationsrate und Konzentrationsfähigkeit der Nieren, der sogenannte diabetischen Nephropathie, einhergeht. Die Beeinträchtigung der Filterfunktion kann dabei verschiedene Ursachen haben. Eine Ursache ist die erhöhte Bildung von extrazellulärer Matrix, wie beispielsweise Kollagen und Fibronektin [Vallon und Thomson, 2012]. Auch trägt die Bildung von AGEs zur Schädigung der Niere z. B. durch Sklerose bei, indem durch Glykierung negativ geladener Proteoglykane die Barrierefunktion in Glomerulum herabgesetzt und die Permeabilität für Albumin gesteigert wird [Yamagishi und Matsui, 2010]. In wieweit bei den in

dieser Arbeit eingesetzten Tieren bereits eine diabetische Nephropathie vorlag ist unklar. Sofern eine Beeinträchtigung der Filterfunktion und Konzentrationsfähigkeit der Nieren in den Tieren gegeben war, könnte dies jedoch die erhöhten Adduktgehalte erklären. Durch die mögliche verringerte Filtrationsrate der Niere wäre es denkbar, dass das mit dem Blut in das Organ gelangte AA, in der Niere zum Teil im Organ verbleibt, in die Zelle gelang und dort an die DNA bindet. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass AA aufgrund der erhöhten Glc-Werte im Blut vermehrt endogen gebildet wird, wodurch die tendenziell höheren Adduktgehalte der BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Mäusen resultieren könnten. Als möglicher endogener AA-Bildungsmechanismus wird hierbei die Reaktion zwischen reduzierenden Zuckern und Aminoverbindungen, ähnlich einer Maillard-Reaktion, diskutiert [Goempel *et al.*, 2017; Vistoli *et al.*, 2013].

In der Leber ist der Unterschied der Adduktgehalte am geringsten. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Leber als zentrales Stoffwechselorgan eine ganze Reihe an Enzymen exprimiert u. a. auch GSH, welches durch Kopplung mit AA über die Bildung von Mercaptursäuren zur Entgiftung der Substanz führt. Durch Kopplung von AA mit GSH steht die Substanz nicht mehr zur Umsetzung mittels CYP2E1 zur Verfügung, sodass letztlich auch kein N7-GA-Gua gebildet werden kann. Weiterhin wäre es auch denkbar, dass die tendenziell höheren Mengen an N7-GA-Gua bei den Tieren mit diabetischer Stoffwechsellage auf die durch Hyperglykämie bedingten hohen Glukosewerte zurückzuführen sind: Ein Teil der vorhandenen Menge an Glukose wird zu Sorbitol und anschließend zu Fruktose unter Verbrauch der Cofaktoren NADPH+H⁺ und NAD⁺ umgesetzt. Es wäre möglich, dass somit ein Teil der endogenen AA-Bildung auf dem reduzierenden Zucker Fruktose anstelle Glukose basiert. In Modelversuchen konnte gezeigt werden, dass die AA-Bildung bei Einsatz von Fruktose, verglichen mit Glukose, erhöht war [Zyzak *et al.*, 2003; Becalski *et al.*, 2003; Stadler *et al.*, 2002+2004]. Allerdings geht die Umwandlung von Glukose in Fruktose über Sorbitol mit dem Verbrauch von NADPH+H einher, welches auch für die mittels CYP2E1 katalysierte Umsetzung von AA zu GA benötigt wird. Zwar könnte somit die Umsetzung von Glukose zu Fruktose zum einen die endogene Bildung von AA möglicherweise beschleunigen, gleichzeitig werden jedoch bei dieser Reaktion wichtige Cofaktoren verbraucht, welche unerlässlich für die Umsetzung der Substanz zu

GA, dem eigentlich reaktiven Metaboliten, sind. Damit *N7-GA-Gua* gebildet werden kann, muss die Umsetzung AA zu GA erfolgen. Es bleibt also fraglich, in wieweit eine mögliche Umsetzung zu Fruktose die Gehalte an *N7-GA-Gua* beeinflusst.

Eine weitere Erklärung für die Bildung von ähnlichen Adduktgehalten in den beiden Tierstämmen könnte die Bildung von *Steady States Levels* sein. Wie bereits in vorhergehenden Kapiteln beschrieben, konnten in Nagerstudien mit wiederholter Verabreichung von AA *Steady State Levels* beobachtet werden [Doerge *et al.*, 2005c]. Als Ursache für ein solches Level wäre ein Gleichgewicht zwischen DNA-Schädigung und DNA-Reparatur denkbar. Es könnte sein, dass die möglicherweise endogene Bildung von AA nur einen geringen Einfluss auf die DNA-Bildung nimmt, sodass die gebildeten Addukte insbesondere durch exogene Faktoren (z. B. Nahrung) beeinflusst werden. Beiden Stämmen stand dasselbe Futter zur Verfügung. Die Ausbildung von ähnlichen *Steady State Levels* wäre dadurch erklärbar.

Insgesamt konnten weder bei den C57BL/6jRj-Mäusen noch bei den BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Mäusen signifikante organabhängige Effekte beobachtet werden. Das Ausbleiben derartiger organabhängiger Effekte bei C57BL/6jRj-Mäusen wurde bereits in vorhergehenden Kapiteln zur Hintergrundbelastung in Abhängigkeit der Tierspezies und des Geschlechtes der Tiere (siehe Kapitel 3.5.1 und 3.5.2) ausführlich diskutiert.

3.6 Hintergrundbelastung DNA-Addukt im Blut des Menschen

Im letzten Projekt dieser Dissertation sollte die Hintergrundbelastung an *N7-GA-Gua* im Blut des Menschen bestimmt werden. Aufgrund der beschränkten Zugänglichkeit zu humanem Gewebe, lag es nahe auf Blut als leicht zugängliches Biomaterial zurückzugreifen. Anders als bei der Gewinnung von DNA aus Zielgeweben der AA-vermittelten Kanzerogenese, ist bei der Gewinnung aus Lymphozyten eine Gewinnung im Rahmen einer Biopsie oder Autopsie nicht nötig.

Ziel dieser Untersuchung war es, das Blut von gesunden Freiwilligen auf den Gehalt an *N7-GA-Gua* Addukten zu untersuchen. Eine solche Studie wurde bis zur vorliegenden Arbeit noch nicht durchgeführt. Entgegen bisheriger Annahmen ließen die im Vorfeld dieser Humanstudie gemachten Versuche zur Inkubation pRH und zur Hintergrundbelastung an *N7-GA-Gua* im Nager darauf schließen, dass es möglich sein könnte, das gesuchte Guanin-Addukt auch in niedrigster Konzentration in Humanblut nachweisen zu können.

Die Durchführung einer Humanstudie wurde bei der Ethikkommission Rheinland-Pfalz beantragt. Nachdem die Studie durch die Kommission bewilligt wurde, wurde diese an der TU KL durchgeführt. Insgesamt wurde das Blut von 60 Probanden (26 Frauen, davon 2 Raucherinnen, und 34 Männer, davon 6 Raucher) auf den Gehalt an *N7-GA-Gua* untersucht.

Zwar deuteten die zuvor erhaltenen Ergebnisse der diabetischen Mäuse daraufhin, dass eine diabetische Stoffwechsellage zu keiner Erhöhung der Adduktgehalte führt. Um dennoch mögliche Effekte auf die Ergebnisse in Folge einer veränderten Stoffwechsellage auszuschließen, wurde das Blut der Probanden auf den Gehalt an HbA1c untersucht. Die Untersuchung erfolgte in Kooperation mit dem Med. Versorgungszentrum MVZ synlab (Neustadt an der Weinstraße) unter Leitung von Herrn Dr. Michael Püttmann. Die Bestimmung des HbA1c-Wertes diente der Erfassung einer möglichen diabetischen Stoffwechsellage. Als Referenzwert für Nicht-Diabetiker wurde ein Wert von 4–6 % herangezogen. Bei allen Probanden lagen die ermittelten HbA1c-Werte innerhalb dieses

Referenzwertes. Weiterhin wurde das Blut der Probanden auf den nüchtern Glukosegehalt untersucht. Nüchtern Glukosewerte von mehr als 126 mg/dl deuten auf einen Diabetes Mellitus hin. Bei allen Probanden lag der ermittelte nüchtern Glukosewert unterhalb von 126 mg/dl. Neben dem Blut wurde auch der Urin der Freiwilligen durch das Med. Versorgungszentrum MVZ Synlab auf den Gehalt an Cotinin untersucht. Die Bestimmung von Cotinin als Metabolit des Nikotins, einem natürlichen Inhaltsstoff von Tabakpflanzen und Bestandteil daraus hergestellter Produkte wie Zigaretten, liefert Hinweise auf den Raucherstatus eines Probanden.

Als Nichtraucher galt jeder, der zum Zeitpunkt der Studie und mindestens drei Monate vor Studienbeginn keine Tabak-Zigarette geraucht hatte. Als Raucher wurden Personen rekrutiert, welche mindestens eine Tabak-Zigarette am Tag rauchten. Der Raucherstatus wurde mittels Fragebogen erfasst. Auch wurde die Menge an Cotinin im Urin gemessen. Als Nichtraucher wurden dabei alle Personen definiert, deren Cotiningehalt bei kleiner 5 µg/l lag. Als Passivraucher wurden diejenigen identifiziert, deren Cotiningehalte zwischen 5–85 µg/l lagen. Als Raucher galten Personen mit Cotiningehalten von größer 200 µg/l. Unter den insgesamt 60 Teilnehmern waren 8 Raucher und 5 Passivraucher. Bei einem der Raucher konnten nur sehr geringe Cotiningehalte im Blut detektiert werden, welche eigentlich auf einen Passivraucher hindeuten. In der statistischen Auswertung wurde dieser jedoch als Raucher gewertet.

Während im primären Fokus dieser Untersuchung die Detektion von Addukten im Blut der Probanden stand, sollte in einem weiteren Schritt geprüft werden, ob es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen Adduktanzahl und Raucherstatus, BMI, Geschlecht, Blutzuckerwerten, HbA1c-Wert oder Ernährungsgewohnheiten gibt. Das Kollektiv der Studie wurde möglichst breit gewählt, um ggf. eine Korrelation zwischen Adduktmenge und anderen Parametern zu erfassen. Rekrutiert wurden Männer und Frauen im Alter von 18–65 Jahren. Das Körpergewicht unterlag keiner Einschränkung, ebenso nicht der BMI. In Anlehnung an die Klassifikation der WHO lagen die BMI-Werte bei Untergewicht bei kleiner 18,5; bei Normalgewicht zwischen 18,5 und 24,99; bei Übergewicht zwischen 25 und 29,99 und Adipositas bei größer 30 [WHO, 2000].

Im nachfolgenden werden die Ergebnisse der Untersuchung dargestellt. Sofern ausreichend DNA zur Verfügung stand, wurden von jedem Probanden zwei Ansätze mit je 50 µg DNA vorbereitet und aufgearbeitet. Anschließend wurde jeder Ansatz einmal am Massenspektrometer vermessen.

Bei der Auswertung der Daten wurden folgende Regeln festgesetzt: Lag das erhaltene Signal zwischen LOQ (0,5 N7-GA-Gua pro 10^8 Nukleotide bei 50 µg DNA) und LOD (0,20 N7-GA-Gua pro 10^8 Nukleotide bei 50 µg DNA), wurde der LOQ-Wert zur MW-Berechnung herangezogen. War das Signal kleiner als LOD aber dennoch als Peak erkennbar, wurde mit der LOD-Wert für die MW-Berechnung verwendet.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels unterschiedlicher statistischer Tests. Die statistische Auswertung wurde von Frau Selina Hemmer unter Hilfe von Herrn Jean-Pierre Stockis (Akad. Oberrat, Fachbereich Mathematik, Uni KL) durchgeführt.

Die nachfolgend gewählten Probandennummern stellen nicht die Nummern dar, welche in der Studie verwendet wurden, damit eine Anonymisierung der Daten gewährleistet wird. Daher werden im Folgenden sowohl männliche als auch weibliche Probanden als Probanden bezeichnet.

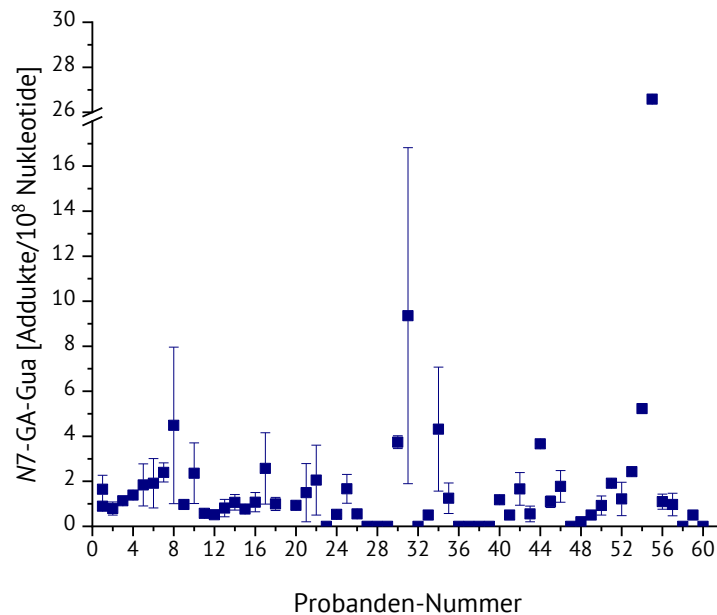


Abbildung 37: Ergebnis der durchgeführten Humanstudie als Anzahl an *N7-GA-Gua* jedes einzelnen Probanden. Dargestellt ist der MW \pm Mittelwertabweichung. In manchen Fällen kam es vor, dass nicht genügend DNA gewonnen werden konnte, sodass nur eine Aufarbeitung mit 50 μ g oder gar weniger DNA pro Probanden möglich war. Eine Mittelwertabweichung war in diesen Fällen nicht möglich. Auf eine Einzeichnung des LOD und LOQs wurde verzichtet, da der Einsatz geringerer DNA-Mengen einen Einfluss auf diese Grenzen zur Folge hatte.

Wie in Abbildung 37 zu sehen ist, variiert die Anzahl an Addukten in den gemessenen Humanproben leicht voneinander. Je nach Probanden ist die Mittelwertabweichung recht hoch. Insbesondere bei Probanden 8; 31 und 34 ist dies der Fall. Bei 12 der insgesamt 60 Personen (Probanden 23; 27; 28; 29; 32; 36; 37; 38; 39; 47; 58 und 60) konnten keine *N7-GA-Gua* detektiert werden. Bei den restlichen Probanden konnten DNA-Addukte im Bereich des LODs und darüber hinaus bestimmt werden. Tendenziell liegt ein Großteil der gemessenen *N7-GA-Gua*-Addukte in einem Bereich von ca. 1–3 Addukten pro 10^8 Nukleotiden (Probanden 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 24; 25; 26; 35; 40; 41; 42; 43; 45; 46; 48; 49; 50; 51; 52; 56; 57 und 59). Bei anderen Probanden liegt die Anzahl an Addukten zwischen 3–8 Addukten pro 10^8 Nukleotiden (Probanden 8; 30; 34; 44 und 54). Höhere Adduktgehalte können in den Probanden 31 und 35 beobachtet werden. Maximale Adduktgehalte liefern die Ergebnisse der Blutuntersuchung des Probanden 55 mit

26,59 ± 0,01 N7-GA-Gua pro 10⁸ Nukleotiden. Insgesamt liegen die in den Humanproben gemessenen Adduktgehalte in einem ähnlichen Bereich wie die in vorangehenden Kapiteln beschriebenen N7-GA-Gua-Gehalte in den Nager-Gewebeproben.

In den durchgeführten Korrelationsanalysen nach Spearman konnte keine Korrelation zwischen der Anzahl an N7-GA-Gua und Geschlecht, Alter, Größe, Raucher, Zigarettenkonsum/Tag, NEM, Konsum hoherhitze stärkehaltiger Produkte, HbA1c-Wert, nüchtern Glukosewert, Kreatinin [g/l], Cotinin [µg/l] oder Cotinin [µg/g Kreatinin] bestimmt werden. Verglichen hierzu konnte jedoch eine leichte Abhängigkeit zwischen der Anzahl an N7-GA-Gua und dem Gewicht (Korrelationskoeffizient = 0,29 und $p = 0,03$), sowie zwischen Adduktanzahl und BMI (Korrelationskoeffizient = 0,33 und $p = 0,01$), ermittelt werden. Im nachfolgend durchgeführten *Wilcoxon-Mann-Whitney*-Test konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Adduktanzahl in verschiedenen Populationsgruppen (Raucher *versus* Nichtraucher mit $p = 0,66$; Verzehrer hoherhitze LM *versus* Nichtverzehrer solcher LM mit $p = 0,25$; NEM-Konsumenten *versus* nicht NEM-Konsumenten mit $p = 0,29$) bestimmt werden. Auch die abschließend durchgeführten Varianzanalysen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen verschiedenen Populationsgruppen. So konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Probanden bestimmt werden. Auch konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Alters (20–29 Jahre mit $n = 45$; 30–39 Jahre mit $n = 10$; 40–54 Jahre mit $n = 5$; $p = 0,969$), des Geschlechtes (männliche mit $n = 3$; weiblich mit $n = 26$; $p = 0,519$) des BMIs (BMI kleiner 25,3 mit $n = 35$; BMI ab 25,3 mit $n = 14$; BMI ab 31 mit $n = 11$; $p = 0,559$) und des Gewichtes (KG von 48–69 kg mit $n = 24$; KG 70–89 kg mit $n = 17$; KG 90–110 kg mit $n = 19$; $p = 0,724$) festgestellt werden.

Um mögliche Rückschlüsse auf eventuelle Einflussfaktoren auf die Gehalte an N7-GA-Gua zu erhalten, werden nachfolgend diejenigen Probanden näher betrachtet, bei welchen die Adduktgehalte gegenüber den restlichen Probanden tendenziell erhöht liegen. Maximale Adduktgehalte mit 26,59 ± 0,01 N7-GA-Gua pro 10⁸ Nukleotiden konnten in Proband 55 detektiert werden. Ein erhöhter BMI, sowie ein erhöhter HbA1c-Wert oder erhöhte Cotinin-Werte lagen nicht

vor. Der Proband gab an Magnesium und Proteinpulver als NEM zu sich zu nehmen, täglich 8–10 Tassen Kaffee zu trinken und 2mal pro Woche Knäckebrot zu verzehren. Der verstärkte Konsum AA-haltiger LM könnte möglicherweise einen Einfluss auf die Höhe der Adduktgehalte haben. Wie im Theorieteil dieser Arbeit beschrieben, handelt es sich bei den eben genannten LM um besonders AA-haltige LM (siehe Kapitel 2.4.3, Tabelle 06). Neben der verstärkten Aufnahme AA-haltiger LM könnte auch die regelmäßige Aufnahme von Proteinen einen Effekt auf die Höhe der Adduktmenge haben, indem das Proteinpulver eine wichtige Quelle für Aminosäuren liefert, welche zur endogenen Bildung von AA beitragen könnten. Auch Proband 44, dessen Adduktgehalte mit $3,66 \pm 0,02$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden tendenziell gegenüber den anderen Probanden erhöht lag, gab an regelmäßig Magnesium, sowie zusätzlich verschiedene Vitamine zu sich zu nehmen. Des Weiteren gab dieser an regelmäßig Pommes frites und gelegentlich Cornflakes zu verzehren. Auffälligkeiten, wie ein erhöhter BMI, erhöhte HbA1c- oder Cotinin-Werte, konnten nicht festgestellt werden. Wenngleich die Ergebnisse möglicherweise vermuten lassen, dass die Einnahme von Vitaminen und Mineralstoffen zu höheren Adduktgehalten führt, so gibt es doch auch weitere Probanden, die ebenfalls solche NEM zu sich nahmen und bei welchen derartiges nicht zu beobachten war. So gab Proband 28 an Magnesium und Calcium zu sich zu nehmen, während Proband 29 angab neben Magnesium auch Vitamin D zu supplementieren. Weiterhin gab Proband 28 an 3mal wöchentlich Cornflakes, Müsli und Kekse zu verzehren, während Proband 29 angab täglich 2 Tassen Kaffee zu trinken und einmal pro Tag AA-haltige LM in Form von Chips, Bratkartoffeln, Keksen oder Knäckebrot zu verzehren. Bei beiden Probanden (28 und 29) konnte kein *N7-GA-Gua* im Blut detektiert werden. Tendenziell höhere Adduktgehalte wiesen auch die Probanden 54 und 34 auf. Bei beiden handelte es sich um Raucher, auf welche im weiteren Verlauf dieser Diskussion eingegangen werden soll. Proband 31 wies mit $9,36 \pm 7,46$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden tendenziell auch eine erhöhte Anzahl an *N7-GA-Gua* im Blut auf, wobei die Mittelwertabweichung sehr hoch ist. Der BMI dieses Probanden war mit 31,2 im Bereich „adipös“. Die tägliche Aufnahme von Kaffee wurde mit 3–4 Tassen angegeben. Proband 30 gab an regelmäßig Pommes frites zu verzehren und 1 Tasse Kaffee am Tag zu trinken. Der BMI dieses Probanden lag im Normalbereich, die Anzahl an Addukten wurde mit $3,74 \pm 0,29$ *N7-GA-Gua* pro 10^8 Nukleotiden bestimmt. Auch Proband 8 wies mit $4,48 \pm 3,48$ Addukten pro

10⁸ Nukleotiden eine erhöhte Adduktanzahl auf. Der BMI des Probanden lag im Normalbereich. Der Proband gab an, regelmäßig AA-haltige LM 2–3mal pro Woche Kekse und 1–2mal in der Woche Pommes frites zu konsumieren. Während die Ergebnisse tendenziell daraufhin deuten, dass ein Konsum AA-haltiger LM zu erhöhten Adduktgehalten führt, gab es jedoch auch weitere Probanden, bei welchen trotz hohem Verzehr AA-haltiger LM, die Anzahl an N7-GA-Gua dennoch gering war. Ein solcher Proband war beispielsweise Proband 51, welcher angab täglich eins der im Fragebogen angegebenen AA-haltigen LM zu sich zu nehmen und 2 Tassen Kaffee zu trinken. Der BMI dieses Probanden lag bei 29,8. Die Anzahl an Addukten im Blut lag bei $1,91 \pm 0,02$ N7-GA-Gua pro 10⁸ Nukleotiden.

Tendenziell deuten die erhaltenen Daten der vorliegenden Studie darauf hin, dass ein erhöhter BMI (oberhalb von Normalgewicht, insbesondere im Bereich adipös), einen Einfluss auf den Gehalt an N7-GA-Gua hat. In den nachfolgenden durchgeführten Korrelationsanalyse nach Spearman konnte ein leichter Zusammenhang zwischen der Anzahl an N7-GA-Gua und dem Gewicht ($p = 0,026$), sowie zwischen Adduktanzahl und BMI ($p = 0,011$) ermittelt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine endogene Bildung von AA aus Acrolein sein. Acrolein kann exogen im LM ausgehend von Triglyceriden, Kohlenhydraten oder Aminosäuren gebildet werden. Des Weiteren kann Acrolein auch endogen entstehen. Eine Möglichkeit der endogenen Bildung stellt die Lipidperoxidation dar [Stevens und Maier, 2008]. Eine weitere Möglichkeit ist die Acrolein-Bildung ausgehend von Glycerin. Verschiedene Darmbakterien (Gattungen *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Eubacterium hallii* und *Clostridium Lactobacillus*) sind in der Lage Glycerin zu 3-Hydroxypropionaldehyd umzubauen, aus welchem durch Wasserabspaltung Acrolein gebildet werden kann [Engels *et al.*, 2016]. Ein Grund für Übergewicht kann ein falsches Essverhalten – insbesondere eine fettreiche Ernährung – sein. Da Acrolein beim Erhitzen von Fetten entsteht, ist eine erhöhte Acrolein-Aufnahme bei fettreicher Ernährung durchaus denkbar. Weiterhin ist auch durch die verstärkte Aufnahme von Triglyceriden und nachfolgender endogener Bildung von Acrolein, eine AA-Bildung denkbar.

Anders als die getroffene Erwartung, Unterschiede in den Adduktgehalten zwischen Rauchen und Nichtrauchern zu beobachten, konnten keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Signifikante Unterschiede zwischen der Anzahl an *N7-GA-Gua* im Blut von Rauchern und Nichtrauchern wurden nicht bestimmt. Auch konnte keine Korrelation zwischen dem Gehalt an Cotinin und der Anzahl an *N7-GA-Gua* ermittelt werden. Zwei von acht Rauchern (Probanden 34 und 54) wiesen allerdings tendenziell höhere Adduktgehalte auf. Proband 34 gab an täglich 10–20 Zigaretten zu rauchen. Der gemessene Cotinin-Wert lag bei 777 µg/l, die Anzahl an *N7-GA-Gua* lag bei $4,32 \pm 2,75$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden. Des Weiteren war der BMI des Probanden mit 31,4 deutlich oberhalb des Normalbereichs. Der Proband gab an täglich 9 Tassen Kaffee zu trinken und regelmäßig Pommes frites und Bratkartoffeln zu verzehren, was ebenfalls einen Einfluss auf die Adduktmenge haben kann. Proband 54 gab an, täglich 10–15 Zigaretten zu rauchen. Der gemessene Cotinin-Wert lag bei 1190 µg/l, die Anzahl an *N7-GA-Gua* bei $5,23 \pm 0,20$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden. Darüber hinaus lag der BMI ebenfalls im Bereich von Adipositas, ähnlich wie bei Proband 34. Der Kaffeeconsum wurde mit 2 Tassen pro Tag angegeben. Während die Adduktgehalte in den eben beschriebenen Rauchern recht hoch waren, lagen die Adduktgehalte bei den restlichen Rauchern im Bereich der Nichtraucher. So konnte beispielsweise bei einem weiteren Raucher (Proband 56), welcher angab täglich 20 Zigaretten zu rauchen, eine Anzahl an *N7-GA-Gua* von $1,90 \pm 1,10$ Addukten pro 10^8 Nukleotide quantifiziert werden. Als Cotinin-Wert wurde ein Wert von 1160 µg/l bestimmt. Der BMI lag noch in einem Bereich von Übergewicht, jedoch recht nahe an der Grenze zu Adipös. Der Proband gab an täglich 6 Tassen Kaffee zu trinken und 2–3mal wöchentlich Pommes frites oder Bratkartoffeln zu verzehren. Bei einem weiteren Raucher, welcher angab täglich 5–10 Zigaretten zu rauchen, Nahrungsergänzungsmittel (Eisen, Zink und Vitamin H) einzunehmen, täglich 5 Tassen Kaffee zu trinken und 3–4mal die Woche Pommes frites und Knäckebrot zu verzehren, konnten trotz Rauchen und dem Verzehr AA-haltiger LM nur $0,77 \pm 0,15$ *N7-GA-Gua* pro 10^8 Nukleotide bestimmt werden. Der Cotiningehalt lag bei 804 µg/l. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass der Raucherstatus keinen Einfluss auf die Höhe der Adduktgehalte nimmt. Wenngleich es tendenziell Raucher mit höheren Adduktgehalten gab, lagen die restlichen Raucher in einem ähnlichen Bereich wie die der Nichtraucher. Auch mittels

statistischer Analysen konnte weder ein Zusammenhang zwischen Cotinin- und Adduktgehalt, noch ein Unterschied der Anzahl an *N7-GA-Gua* in Rauchern und Nichtrauchern beobachtet werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der Studien von Huang und Kollegen (2014), in welcher der Urin von Rauchern ($n = 30$; Konsum von 2–40 Zigaretten am Tag) und Nichtrauchern ($n = 33$) auf den Gehalt an Cotinin, AAMA und *N7-GA-Gua* untersucht wurde. Der ermittelte Cotiningehalt (Median 5–95tes Perzentil) lag bei den Rauchern bei 906 $\mu\text{g/g}$ Kreatinin (4,49–1678 $\mu\text{g/g}$ Kreatinin), bei den Nichtrauchern bei 6,46 $\mu\text{g/g}$ Kreatinin (1,73–23,1 $\mu\text{g/g}$ Kreatinin). Das Studienkollektiv wurde so gewählt, dass BMI, Alter, Lebensgewohnheiten und Einnahme von Medikamenten in beiden Gruppen vergleichbar waren. Ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen bestand allerdings darin, dass – wie in Taiwan gängig – die Raucher vermehrt Betelnüsse kauen und Tee tranken. Die bestimmte Menge an *N7-GA-Gua* (Median 5–95tes Perzentil) lag bei den Rauchern bei 1,41 $\mu\text{g/g}$ Kreatinin (0,61–6,22 $\mu\text{g/g}$ Kreatinin), bei den Nichtrauchern bei 0,93 $\mu\text{g/g}$ Kreatinin (0,36–2,97 $\mu\text{g/g}$ Kreatinin). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kohorten konnten nicht ermittelt werden. Zum einen kann, je nach Herstellung, die Menge an AA in den Zigaretten variieren. Auch kann die Menge an *N7-GA-Gua* in jedem einzelnen Probanden durch genetische Polymorphismen beeinflusst werden. Weiterhin kann, bedingt durch den hohen Siedepunkt von AA, die Aufnahme beim Rauchen gegenüber AA aus Nahrungsquellen geringer ausfallen [Huang *et al.*, 2015]. Im Gegensatz zu der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Humanstudie, in welcher die gemessenen DNA-Addukte auf die im entnommenen Blut vorhandenen weißen Blutzellen zurückgeführt werden können, ist die Herkunft der DNA-Addukte im Urin bei der Studie von Huang und Kollegen nicht eindeutig (2014). So wäre es denkbar, dass die Addukte im Urin, aus AP-Stellen im DNA-Rückgrat oder als Folge von DNA-Reparatur mittels DNA-Glycosylasen oder spontaner Depurinierung entstehen und dann mit dem Urin aus dem Körper ausgeschieden werden [Huang *et al.*, 2014]. Insgesamt ist die Studie daher kritisch zu betrachten. Da es jedoch keine weiteren Studien über den Gehalt an *N7-GA-Gua* gibt, ist sie dennoch erwähnenswert.

Ein Grund für die in vorliegender Arbeit im Vorfeld getroffene Annahme, dass Raucher tendenziell höhere Adduktgehalte aufweisen sollten, lag darin, dass AA u. a. auch im Tabakrauch enthalten ist

[Diekmann *et al.*, 2008]. Weiterhin zeigten die Ergebnisse anderer Humanstudien und anderer AA-Biomarker, dass Raucher bis zu 3–4fach höhere Gehalte an Hb-Addukten aufwiesen als Nichtraucher [Schettgen *et al.*, 2004; Vesper *et al.*, 2008; von Stedingk *et al.*, 2011; Phillips und Venitt, 2012]. Für die Bildung von AA im Zigarettenrauch werden unterschiedliche Bildungsmechanismen diskutiert. Zum einen kann AA durch eine reversible Reaktion zwischen Ammoniak mit Acrylsäure und Essigsäure, zum anderen durch Oxidation von Acrolein zur Acrylsäure, welche wiederum mit Ammoniak reagieren kann, gebildet werden. Auch ist die Bildung von AA durch die Maillard-Reaktion vorstellbar [Diekmann *et al.*, 2008]. Eine weitere mögliche Ursache für die Beobachtung der Unterschiede im AA-Metabolismus bei Rauchern und Nichtrauchern könnte sein, dass das im Zigarettenrauch vorhandene Nikotin bzw. dessen Metabolit Cotinin Einfluss auf die Induktion von CYP2E1 haben [Micu *et al.*, 2003; Czekaj *et al.*, 2005; Bjellaas *et al.*, 2007b; Hukkanen *et al.*, 2010]. Weiterhin sind jedoch im Zigarettenrauch auch andere Substanzen enthalten, die zu einer Veränderung der CYP2E1-Expression beitragen. Beispielsweise enthält Zigarettenrauch Acrylnitril, welches mittels CYP2E1 zum Epoxid 2-Cyanoethylenoxid oxidiert wird [Smith *et al.*, 2001; Whang *et al.*, 2002; IARC, 2004]. Auch Nitrosamine, wie beispielsweise Dimethylnitrosamin, sind im Zigarettenrauch vorhanden und werden mittels CYP2E1 metabolisch aktiviert [Smith *et al.*, 2001; IARC, 2004; Chowdhury *et al.*, 2012]. Weiter wurde die Vermutung, dass Raucher und Nichtraucher unterschiedliche Adduktgehalte aufweisen sollten, durch Studien zu Mercaptursäure-Ausscheidung von AA, in welchen ähnlich wie bei den Hb-Addukten gezeigt werden konnte, dass Raucher tendenziell (teils signifikant) höhere Mengen an Mercaptursäuren ausscheiden, gestärkt [Bjellaas *et al.*, 2005; Bjellaas *et al.*, 2007a; Li *et al.*, 2005; Boettcher *et al.*, 2005; Kellert *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007; Schettgen *et al.*, 2008]. So konnten beispielsweise im Urin von Probanden AAMA-Konzentrationen von 124 nmol/l (Median; Nichtraucher; $n = 76$) und 1438 nmol/l (Median; Raucher; $n = 11$) bzw. GAMA-Konzentrationen von 68 nmol/l (Median; Nichtraucher; $n = 76$) und 444 nmol/l (Median; Raucher; $n = 11$) gemessen werden [Bjellaas *et al.*, 2005]. Ein möglicher Grund für die in vorliegender Studie fehlenden signifikanten Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern könnte die geringe Größe der Rauchergruppe sein. Von 60 Probanden waren lediglich 8 Raucher (6 Männer und 2 Frauen). Eine weitere Erklärung für die fehlende Korrelation zwischen

Adduktgehalt und Raucherstatus könnte die Metabolisierung von AA sein. Studien von Schettgen und Kollegen (2004) konnten zeigen, dass das Verhältnis von GA-Val zu AA-Val im Median bei Nichtrauchern gegenüber Rauchern, mit 0,96 gegenüber 0,73, tendenziell erhöht ist. Die kann auf eine Verschiebung des Verhältnisses von oxidativem und reduktivem Metabolismus hin zu einem verstärkten reduktiven Pfad und einem verringerten oxidativen Pfad (Umsetzung AA zu GA) hindeuten [Schettgen *et al.*, 2004]. Eine weitere mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass in vorliegender Humanstudien keinerlei Korrelation festgestellt werden konnte, könnte sein, dass gemäß des Studiendesigns keine kontrollierte AA-Exposition stattfand. Ernährungsgewohnheiten, wie der reichhaltige Verzehr AA-haltigen LM können einen wesentlichen Einfluss auf die Adduktmenge haben. So wäre es denkbar, dass beispielsweise ein Nichtraucher, der sehr viel solcher AA-haltiger LM verzehrt, ähnliche Adduktgehalte wie ein Raucher aufweist, der nur sehr wenig dieser Produkte konsumiert. Ein Beispiel hierfür ist der Vergleich zwischen Proband 18 und 51 mit $1,0 \pm 0,29$ N7-GA-Gua pro 10^8 Nukleotiden und $1,91 \pm 0,02$ N7-GA-Gua pro 10^8 Nukleotiden. Die Anzahl an N7-GA-Gua der beiden Probanden liegt in einem Bereich, in welchem auch der Großteil der anderen Probanden liegt. Bei Proband 18 handelte es sich um einen Raucher, welcher angab, täglich 5–10 Zigaretten zu rauchen, 1–2 Tassen Kaffee zu trinken und 1–2mal wöchentlich Pommes frites und Chips zu verzehren. Der BMI des Probanden lag bei 23,1. Der Cotiningehalt im Blut lag bei 659 $\mu\text{g/L}$. Bei Probanden 51 hingegen handelt es sich um einen Nichtraucher, welcher täglich 2 Tassen Kaffee und mindestens eins der im Fragebogen enthaltenen AA-haltigen LM verzehrt. Der BMI-Wert lag bei 29,8. (Tabak-)Rauchen stellt eine wesentliche Expositionsquelle von AA dar. Ausgehend von einem Gehalt von 2 $\mu\text{g/Zigarette}$, ergibt sich bei einem Starkraucher mit 20 Zigaretten pro Tag eine AA-Belastung von 40 $\mu\text{g/Tag}$. Bei einem 70 kg schweren Erwachsenen entspricht dies einer Dosis von 0,57 $\mu\text{g/kg KG/Tag}$ [SKLM, 2012]. Verglichen damit wird die mittlere tägliche Exposition mit AA durch LM auf 0,4–1,9 $\mu\text{g/kg KG}$ und im 95. Perzentil der Exposition auf 0,6–3,4 $\mu\text{g/kg KG/Tag}$ geschätzt [EFSA, 2015]. Die AA-Exposition kann somit wesentlich durch das Rauchen gesteigert werden. Ein Grund warum die gesteigerte AA-Exposition durch Tabakrauchen dennoch nicht zu signifikant erhöhten DNA-Adduktgehalten führen könnte, könnten die vorangehenden bereits beschriebenen Punkte, wie beispielsweise physikalisch chemische Eigenschaften (hoher Siedepunkt

und Dampfdruck) der Substanz sein, welche eine inhalative Aufnahme erschweren. Auch eine gute Entgiftung der Substanz durch Kopplung mit GSH, wäre als Ursache denkbar. Durch die effektive Entgiftung des AA durch Kopplung mit GSH oder Reaktion mit Hb, wäre es denkbar, dass nicht mehr so viel AA zur Reaktion mit AA zur Verfügung steht und daher die Menge an Addukten limitiert ist.

Bei der Risikobewertung werden Hb-Addukte als Surrogatmarker für DNA-Addukte eingesetzt [Boogaard, 2002]. Im Tierversuch mit F344-Ratten und B6C3F1-Mäusen, welche einmalig mittels Schlundsonde 0,1 mg/kg KG AA oder äquimolare Dosen an GA erhalten haben, konnte ein linearer Zusammenhang zwischen GA-Hb-Addukten im Blut und N7-GA-Gua-Addukten in der Leber beobachtet werden [Tareke *et al.*, 2006]. Auch in weiteren Tierversuchsstudien konnte eine solche positive Korrelation gezeigt werden [Angerer *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2008]. Tierstudien mit geringeren Konzentrationen an AA (im Bereich der geschätzten täglichen Exposition des Menschen) fehlen. In wieweit Hb-Addukte somit im Niedrigdosis-Bereich als Surrogatmarker geeignet sind, bleibt offen [Rietjens *et al.*, 2018]. Auch fehlen Humanstudien, welche wichtige Informationen liefern könnten. Während Hb-Addukte sich über die Lebenszeit eines Erythrozyten anreichern und keinen Reparaturprozessen unterliegen, können DNA-Addukte diversen Reparaturmechanismen unterliegen. N7-Guanin-Addukte reichern sich oftmals bei kontinuierlicher Exposition in der DNA an und erreichen nach einiger Zeit ein Plateau [Koskinen und Plna, 2000]. Im Tierversuch konnte für N7-GA-Gua ein solches Plateau nach 14 Tagen beobachtet werden [Doerge *et al.*, 2005c]. Auch für Hb-Addukte konnte in Nagerstudien derartiges nach ca. 28 Tagen beobachtet werden [Tareke *et al.*, 2006]. In weiteren Nagerstudien konnte gezeigt werden, dass AA-Hb und GA-Hb in unterschiedlichen Mengen gebildet werden. Während die Anzahl an AA-Hb über die gesamte Expositionsdauer von 9 Tagen in männlichen SD-Ratten zunahm, konnte keine Zunahme der GA-Hb-Addukte festgestellt werden. Als Ursachen für diese Beobachtung wurde die effektive Kopplung des gebildeten GA an GSH während des *First-Pass*-Effektes der Leber diskutiert. Das Blut der Tiere wurde auf den Gehalt an AA und GA untersucht. Gestützt wurde dies durch die Untersuchung des Blutes, welches mit AA-Konzentrationen zwischen 0,5–2 µM gegenüber maximalen GA-Konzentrationen von kleiner 0,06 µM höhere Konzentrationen an AA aufwies [Berger *et al.*, 2011]. Die Ergebnisse von Berger und

Kollegen (2011) deuten darauf hin, dass GA-Hb-Addukte bei geringer AA-Belastung nicht als Biomarker für eine solche AA-Exposition geeignet sind.

Zusammenfassend konnte in vorliegender Studie gezeigt werden, dass zum einen DNA-Addukte im Blut von Probanden (ohne gezielte Exposition) nachweisbar sind, zum anderen, dass sich die Mengen an Addukten in Rauchern und Nichtrauchern wider Erwarten nicht signifikant voneinander unterscheiden. Dennoch konnte eine, wenn auch schwache, Korrelation zwischen der Anzahl an DNA-Addukten im Blut und dem Körpergewicht beobachtet werden.

3.7 Zusammenführende Diskussion aller Ergebnisse

Nachdem die einzelnen Ergebnisse in den vorhergehenden Kapiteln ausführlich beschrieben und diskutiert wurden, soll in diesem Kapitel eine abschließende zusammenhängende Diskussion der Ergebnisse, insbesondere der DNA-Addukt-Untersuchungen, geführt werden. Auch werden nachfolgend Diskussionspunkte aufgeführt, welche zuvor noch nicht angesprochen wurden.

Nachdem im Resazurin-Reduktionstest die zytotoxische Wirkung von AA und dessen Metaboliten GA untersucht wurde, konnte mit der Inkubation pRH mit AA und nachfolgender Bestimmung der Gehalte an *N7-GA-Gua* in den Zellen begonnen werden. Anders als im Vorfeld erwartet konnte, unabhängig der Inkubationsdauer und AA-Konzentration, in allen Proben *N7-GA-Gua* nachgewiesen werden. In den nicht mit AA-behandelten Zellen, welche als Kontrollgruppe bei jedem Testdurchlauf der Inkubation pRH mit AA mitgeführt wurden, lag die Anzahl an *N7-GA-Gua* bei $7,10 \pm 2,75$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden. Verglichen hierzu lag die Anzahl an *N7-GA-Gua* in den darauffolgenden Untersuchungen zur Hintergrundbelastung bei den Testgeweben der Wistar-Ratte mit Gehalten von $0,62 \pm 0,00$ bzw. $0,66 \pm 0,39$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden in Lunge bzw. Niere geringer. Die Gehalte der pRH lassen sich daher schwierig mit den Gehalten aus Niere und Lunge der Tiere vergleichen. An dieser Stelle wäre es sinnvoll gewesen, das Organ selbst zur DNA-Isolation zu verwenden und die Gehalte an Addukt im Organ zu bestimmen. Leider stand die Leber der Tiere für eine solche Untersuchung nicht zur Verfügung, da das Organ zur Gewinnung von pRH für andere Versuche des Arbeitskreises benötigt wurde. Die Leber selbst besteht neben Hepatozyten, welche einen Großteil der Zellen ausmachen (ca. 70 % der gesamten Zellmasse), auch aus anderen Zellen wie beispielsweise Kupfferzellen oder Endothelzellen [Ding *et al.*, 2016]. Als stoffwechselaktive Zellen sind Hepatozyten in der Lage, CYPs zu exprimieren und so AA zu GA umzusetzen, welches dann an die DNA binden kann. Während die Leber als Organ selbst somit aus einer ganzen Reihe von Zellen unterschiedlicher Funktionen und unterschiedlicher Fähigkeit zur Expression diverser Enzyme besteht, handelt es sich bei den im Folge der Perfusion gewonnen Zellen nahezu vollständig um Hepatozyten, welche in der Lage sind, das für die Umsetzung von AA zu GA relevante CYP2E1 zu

exprimieren. Es wäre denkbar, dass die in der Zellkultur bestimmten Gehalte an *N7-GA-Gua* deswegen so hoch sind. Weiterhin wäre möglich, dass Bestandteile des Zellmediums, insbesondere reduzierende Zucker und Aminosäuren, zur AA-Bildung in den Zellen beitragen. Eine weitere Ursache der höheren Adduktgehalte in pRH gegenüber den Gehalten der Leber der Tiere, könnte in der unterschiedlichen DNA-Extraktion liegen. Während die Lysezeit bei den pRH bei 4 h lag, lag diese bei der DNA-Extraktion der Organe bei bis zu 24 h. Möglicherweise kam es zu Verlusten an Addukten während der Lyse, sodass eine erhöhte Lysezeit mit einer erniedrigten Adduktanzahl einhergeht. Es wurde versucht, die Lysezeit zu verkürzen, allerdings waren die DNA-Ausbeuten unzureichend, sodass die Zellen über 24 h lysiert wurden. Die eben genannten Erläuterungen liefern daher eine mögliche Erklärung für die tendenziell erhöhten Gehalte an *N7-GA-Gua* in den pRH. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Zellen aus Niere und Leber besteht darin, dass die primären Zellen, während der Kultivierung und Inkubation, Zeit zur DNA-Reparatur hatten. Es bleibt unklar, warum die in den unbehandelten pRH detektierten Mengen an *N7-GA-Gua* gegenüber den Gehalten in Niere und Lunge der Tiere erhöht sind. Eine Untersuchung der Leber hätte womöglich Aufschluss gegeben.

Verglichen mit den Adduktgehalten in unterschiedlichen Geweben (Lunge und Niere) der Wistar-Ratten waren die Adduktgehalte in den C57BL/6Jrj- und BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Mäusen erhöht. Eine Ursache hierfür ist, dass wie in Kapitel 2.4.5 beschrieben die Maus die sensitivere Spezies darstellt. Ein Grund hierfür ist u. a. die Umsetzung von AA zu GA, welche in folgender Reihenfolge abnimmt: Maus > Ratte > Mensch [Fennel *et al.*, 2005; Paulsson *et al.*, 2003, siehe Kapitel 2.4.5]. Hinsichtlich der Stoffwechsellage konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den C57BL/6Jrj- und BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Mäusen festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass noch keine diabetische Stoffwechsellage bei den BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Mäusen vorlag. Eine Überprüfung des Blutzuckerwertes wäre daher sinnvoll gewesen. Gemäß den Angaben von Janvier Labs, von welchem die Tiere gekauft wurden, sollten die Tiere bereits eine diabetische Stoffwechsellage entwickelt haben. Auffällig bei diesen Tieren war, dass diese Tiere öfter tranken als die C57BL/6Jrj-Mäuse, was ebenfalls auf einen Diabetes Mellitus hindeuten könnte. Auch das deutliche Übergewicht dieser Tiere kann eine solche Stoffwechselentgleisung fördern.

Ein Vergleich der Daten der Nagerstudien mit den Ergebnissen der Humanstudie ist schwierig. Zum einen, da sich der Metabolismus von AA im Nager von dem im Menschen unterscheidet. Zum anderen, da in vorliegender Humanstudie, das Blut auf den Gehalt an *N7*-GA-Gua untersucht wurde, während in den Tierstudien Organe wie Leber, Lunge und Niere untersucht wurden. Unterschiede in der Toxikokinetik der Substanz wurden bereits in Kapitel 2.4.5 ausführlich erläutert. Bedingt durch die interspeziesunterschiede und die unterschiedlichen Untersuchungsmaterialien ist ein Vergleich der Ergebnisse nicht möglich. Eine Untersuchung des Blutes der Nager wäre daher sinnvoll gewesen. Allerdings war dies aufgrund der geringen Blutmenge nicht durchführbar.

Bei genauerer Betrachtung der Adduktgehalte in den Humanproben, sowie den Adduktgehalten im Nager bzw. den inkubierten pRH fällt auf, dass die Hintergrundbelastung an *N7*-GA-Gua unabhängig der Spezies und des Untersuchungsgewebes in einem ähnlichen Bereich liegt. Die Hintergrundbelastung der in vorliegender Arbeit durchgeführten Studien am Nager als auch in der Humanstudie liegt bei bis zu 10 Addukten pro 10^8 Nukleotiden. Die tendenziell geringsten Adduktgehalte mit 0,3–1 Addukt pro 10^8 Nukleotide wurden in den Organen der Ratte festgestellt. Etwas höher mit 2,2–7,9 *N7*-GA-Gua pro 10^8 Nukleotiden und 0,3–7,7 Addukten pro 10^8 Nukleotiden liegen die Gehalte in den C57BL/6Jrj und BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Mäusen. In Blut des Menschen konnten nur teilweise DNA-Addukte nachgewiesen werden. Die Anzahl an Addukten variierte zwischen dem LOD und bis zu 10 Addukten pro 10^8 Nukleosiden.

Vergleichbare Adduktgehalte wurden in verschiedenen anderen Studien zur Hintergrundbelastung beobachtet. So konnten beispielsweise in humanen Lebergewebe $0,84 \pm 0,86$ 7-Ethyl-Gua-Addukten pro 10^8 Nukleotiden (gebildet durch ethylierende Verbindungen) [Chen *et al.*, 2007] und 7,46 7-Carboxyethyl-Gua-Addukte (gebildet durch Metabolisierung von Nitrosaminen wie *N*-Nitrososarcosine und 3-(Methylnitrosoamino)-Propionsäure quantifiziert werden [Cheng *et al.*, 2010]. Im Lebergewebe von Wistar-Ratten wurden als Folge von oxidativem Stress und/ oder Lipidperoxidation, Etheno-dG und Etheno-dC von $0,6 \pm 0,06$ und $3,46 \pm 0,77$ pro 10^8 Nukleotiden festgestellt [Navasumrit *et al.*, 2001]. In humanen Lymphozyten wurden Acrolein-DNA-Addukte bei

Rauchern bzw. Nichtrauchern mit $0,74 \pm 0,34$ bzw. $0,98 \pm 0,55$ N^2 -Propano-dG Addukten pro 10^8 Nukleotide nachgewiesen werden [Zhang *et al.*, 2011]. In weiteren Nagerstudien enthielten Leber, Herz und Dickdarm der Tiere $0,27$ – $2,38$ N^7 -(2-Hydroxyethyl)-Gua pro 10^8 Nukleotide. In einer zusätzlichen Untersuchung wurde in Leber, Herz, Dickdarm, Lunge, Nieren, Milz und Magen eine Hintergrundbelastung an N^7 -(2-Hydroxyethyl)-Gua, einem DNA-Addukt des Ethylenoxids, von $1,06$ – $3,52$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden bestimmt [Marsden *et al.*, 2007]. Weitere Studien gehen von einer Anzahl von 10 bis über 1000 DNA-Läsionen pro 10^8 Nukleotiden in humanem Gewebe, induziert durch alkylierende Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht bzw. oxidativer DNA-Schädigung, aus [De Bont und Van Larebeke, 2004]. Des Weiteren wurde in humanem Lebergewebe eine Anzahl von 800–900 AP-Läsionen pro 10^8 Nukleotiden festgestellt [Nakamura und Sewnberg, 1999]. Pottenger und Kollegen gehen in allen Geweben von einem endogenen Level an DNA-Addukten, AP-Läsionen und Strangbrüchen in Folge von Depurinierung, endogener Alkylierung und ROS, von 100 pro 10^8 Nukleotiden, aus [Pottenger *et al.*, 2004]. Demgegenüber schätzen Gupta und Litz die Anzahl der Hintergrundbelastung an DNA-Schäden in humanem Lebergewebe auf 1000–1300 Läsionen pro 10^8 Nukleotiden, wobei die Hälfte des endogenen DNA-Schadens auf AP-Stellen zurückgeführt wird [Gupta und Litz, 1999].

Eine Expertengruppe, welche sich mit der biologischen Signifikanz von DNA-Addukten beschäftigt hatte, kam zu nachfolgenden Schlussfolgerungen: Zum einen wurde eine Anzahl von einem Addukt pro 10^9 bis 10^{10} Nukleotiden als niedrige Belastung an DNA-Addukten gewertet. Zum anderen wurde vermutet, dass durch spezifische Chemikalien induzierte Adduktgehalte kleiner als 1 pro 10^8 Nukleotiden zu einer Aktivierung der DNA-Reparatur führen, wodurch der DNA-Schaden repariert wird, sodass keine Mutationen entstehen [Pottenger *et al.*, 2004]. Die in vorliegender Arbeit identifizierten Adduktgehalte liegen unterhalb einem Addukt pro 10^9 Nukleotiden und sind in einem Bereich niedriger Belastung.

DNA-Addukte stellen ein wichtiges Schlüsselereignis im Prozess der Mutagenese und Kanzerogenese dar. Die Manifestation einer Mutation durch DNA-Addukte hängt jedoch von verschiedenen Faktoren

ab. Ein wichtiger Faktor ist hierbei die Position der strukturellen Veränderung innerhalb der DNA-Base [Jarabek *et al.*, 2009]. Strukturelle Änderungen an wasserstoffbrückenausbildenden Regionen, wie z. B. am O⁶-Atom des Guanins wirken misskodierend und dadurch mutagen [Wyatt und Pittman, 2006]. Gemäß den Chargaff-Regeln paart Guanin mit Cytosin. Eine Methylierung am O⁶-Atom des Guanins verhindert jedoch die Ausbildung der Wasserstoffbrücke, sodass O⁶-Methyl-Guanin vermehrt mit Thymin (> 80 %) anstelle von Cytosin (< 20 %) paart und es so zur GC AT Transitions-Mutation kommt. Verglichen hierzu liegt die Mutationsfrequenz bei N7-Alkyl-Guanin-Addukten, welche als nicht mutagene DNA-Läsion betrachtet werden, bei kleiner 0,1 %. [Tretyakova *et al.*, 2007; Boysen *et al.*, 2009; Philippin *et al.*, 2014]. Das mutagene Potential von N7-Addukten ist daher als gering anzusehen. Allerdings gilt dies nicht für alle N7-Guanin-Addukte. Eine Ausnahme bilden DNA-Addukte des Aflatoxin B₁, welches bereits 1993 durch die IARC als humanes Karzinogen klassifiziert wurde [IARC 1993]. Sterisch anspruchsvolle DNA-Addukte („*bulky adducts*“), wie beispielsweise N7-Guanin Addukte des Aflatoxins, führen zu starken Verzerrungen der DNA-Struktur, in Folge deren Mutationen entstehen können [Greim, 2017].

Verglichen mit anderen DNA-Addukten sind N7-Guanin-Addukte, aufgrund ihrer positiven Formalladung am N7-Guanin-Atom, chemisch instabil [Gates, 2009]. Wegen der Instabilität von N7-Guanin-Addukten können jedoch weitere (promutagene) Läsionen, wie beispielsweise FAPy-Addukte und AP-Stellen gebildet werden [Boysen *et al.*, 2009; Gates, 2009]. Die Halbwertszeit des N7-GA-Gua *in vivo* beträgt je nach Spezies und Untersuchungsorgan 2,6 Tage in der Leber der Maus, 4,1 bzw. 4,5 Tage in der Leber von weiblichen Mäuse bzw. männlichen Ratten und 6,7 bzw. 7,4 Tage in den Leukozyten weiblicher bzw. männlicher Ratten [Tareke *et al.*, 2006]. Während Mercaptursäuren als Kurzzeitbiomarker und Hb-Addukte als Langzeitbiomarker der AA-Belastung verwendet werden, eignen sich DNA-Addukte wie beispielsweise das in vorliegender Arbeit untersuchte N7-GA-Gua aufgrund der beschriebenen Instabilität zur Untersuchung der mittelfristigen Exposition mit AA. Weiterhin zeichnen sich N7-Gua-Addukte dadurch aus, dass sie sich bei kontinuierlicher Exposition in der DNA anreichern und dann nach einiger Zeit ein Plateau erreichen [Koskinen und Plna, 2000]. Doerge und Kollegen (2005c) konnten ein solches *Steady State Level* in

Nagerstudien, bei welchen B6C3F1-Mäuse und F344-Ratten, über das Trinkwasser wiederholt AA verabreicht wurde, nach 14 Tagen beobachten [Doerge *et al.*, 2005c]. Da in vorliegender Arbeit die Tiere nicht gezielt mit AA exponiert wurden, die Tiere allerdings dennoch einen gewissen Teil AA über das Futter aufnehmen, sind die gemessenen Adduktgehalte auf solche Plateaus zurückzuführen. Ebenso können die in vorliegender Arbeit quantifizierten Adduktgehalte im Blut des Menschen auf einen solche *Steady State Levels* zurückgeführt werden.

Ein wesentlicher Vorteil der Bestimmung von *N7*-Guanin-Addukten liegt darin, dass aufgrund der hohen Nukleophilie, sowie der sterisch gut zugänglichen Position des *N7*-Guanins, chemisch reaktive Verbindungen bevorzugt an dieser Position angreifen und somit in höheren Konzentrationen als andere DNA-Addukte in der Zelle vorhanden sind. Auch können solche Addukte aufgrund ihrer geringeren Mutagenität als Surrogat Marker für andere promutagene Addukte betrachtet werden [Gates, 2009]. Obwohl *N7*-Guanin-Addukte als nicht mutagene Läsion beurteilt werden, ist deren Untersuchung dennoch von Interesse. Verglichen mit anderen GA-DNA-Addukten, überwiegt die Anzahl an *N7*-GA-Gua. *In vivo* konnten bis zu 100fach höhere Gehalte an *N7*-GA-Gua gegenüber *N3*-GA-Gua quantifiziert werden [Gamboa da Costa *et al.*, 2003]. Insbesondere bei den in vorliegender Arbeit untersuchten Humanproben, war die Anzahl an Addukten teilweise sehr gering oder gar nicht detektierbar. Eine Detektion anderer GA-DNA-Addukte erschien daher unmöglich und wurde nicht weiterverfolgt.

Aufgrund der benötigten Menge an Untersuchungsmaterial war die Auswahl der Gewebe beim Nager auf Nicht-Zielorgane der durch AA-vermittelten Kanzerogenese begrenzt. Auch beim Menschen konnte lediglich das Blut untersucht werden, da dies am besten zugänglich war. Als Zielorgane konnten in Kanzerogenitätsstudien an F344-Ratten hormonabhängige Organe (Brustdrüse, Hoden und Schilddrüse) anhand von Tumorbildung identifiziert werden [Friedman *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 2008]. Inwieweit ein nicht gentoxischer Mechanismus für die AA-vermittelte Kanzerogenese verantwortlich ist, ist noch unklar. In Kanzerogenitätsstudien an B6C3F1-Mäusen wurden neben hormonabhängigen Organen weitere Organe wie die Lunge als Zielorgan bestimmt [NTP, 2012;

Beland *et al.*, 2013]. Die Untersuchung von Nicht-Zielorganen erschien dennoch sinnvoll, da in anderen Nagerstudien eine ähnliche Verteilung von N7-GA-Gua auf Ziel- und Nichtzielorgane der durch AA-vermittelten Kanzerogenese, beobachtet wurde [Segeberäck *et al.*, 1995; Gamboa da Costa *et al.*, 2003; Doerge *et al.*, 2005c; Ghanayem *et al.*, 2005a]. Möglicherweise ist dies auf die Struktur und das niedrige Molekulargewicht von AA, sowie den damit einhergehenden physikalisch-chemischen Eigenschaften der Verbindung zurückzuführen. Auch andere Epoxide führen zu einer ähnlichen Verteilung von DNA-Addukten auf Zielorgan und Nicht-Zielorgan-Gewebe [Walker *et al.*, 1992; Koskinen und Plna, 2000]

4. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine sensitive analytische Methode zum Nachweis von *N7*-GA-Gua zu entwickeln. Mit dieser Methode sollten die Adduktgehalte in unterschiedlichen Matrices untersucht werden. Im letzten Teil dieser Arbeit wurde eine Humanstudie durchgeführt, in der erstmals das Blut von gesunden Probanden auf den Gehalt an *N7*-GA-Gua untersucht wurde. Entgegen der Annahme, dass die Gehalte an *N7*-GA-Gua in Humanblut zu gering für einen Nachweis sind, konnte die instrumentelle analytische Bestimmung realisiert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Humanstudie sollte einen Einblick in die Hintergrundbelastung an *N7*-GA-Gua im Querschnitt der Bevölkerung liefern und damit auch für die Risikobetrachtung des AA von Interesse sein.

Zu Beginn dieser Promotionsarbeit stand die Synthese aller nötigen Substanzen im Vordergrund, beginnend mit der Verbindung GA, dem reaktiven Metaboliten von AA. Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Synthesevorschrift von Payne und Williams (1961). Bei der Durchführung der Synthese kam es immer wieder zur Polymerisation und somit zu einem Abbruch der Synthese. Durch Modifikationen der Synthesevorschrift gelang es, GA-Kristalle zu erhalten. Es erfolgte eine Analyse der Kristallstruktur, welche bereits 2016 veröffentlicht wurde [Hemgesberg *et al.*, 2016]. Die bei der Synthese gebildeten Enantiomere kristallisieren in zwei unabhängigen Molekülen innerhalb der asymmetrischen Einheit. Die dreidimensionale Struktur bildet sich durch starke Wasserstoffbrückenbindungen. Inter- und intramolekulare Bindungen tragen zur Stabilität und Ausbildung einer β -Faltblattstruktur bei. Die Anordnung der einzelnen β -Faltblätter erfolgt parallel zueinander. Nachdem GA erfolgreich synthetisiert und charakterisiert wurde, wurde mit der Synthese des *N7*-GA-Gua begonnen. Verglichen mit der aufwendigen Syntheseroute des GA, war die Synthese des DNA-Adduktes relativ einfach und erfolgte gemäß der Vorschrift von Gamboa da Costa und Kollegen (2003). Die erfolgreiche Synthese der Substanz konnte *via* NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie und Elementaranalyse bestätigt werden.

Als interner Standard für die Untersuchung der DNA-Adduktbildung in pRH, sowie für die Untersuchung der Gewebeproben aus Ratte und Maus, wurde das isotoopenmarkierte DNA-Addukt hergestellt. Hierzu wurde die eine leicht modifizierte Variante der Synthese von Gamboa da Costa (2003) gewählt. Wegen der geringen verfügbaren Mengen an Substanz erfolgte die Identifikation nur mittels massenspektroskopischer Untersuchungen. Hier konnte der Erhalt des isotoopenmarkierten DNA-Adduktes [$^{15}\text{N}_5$]N7-GA-Gua bestätigt werden.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde eine sehr sensitive UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode entwickelt. Der entscheidende Faktor der Sensitivität der Methode resultierte dabei aus der eingesetzten DNA-Menge. Je höher die eingesetzte Menge an DNA war und je kleiner das Probevolumen am Ende, desto kleiner war der resultierende LOD und LOQ. Bei einer maximalen Menge von 200 µg DNA (z. B. bei den Untersuchungen der Hintergrundbelastung in Ratte und Maus) und einem Probeendvolumen von 20 µl, konnte ein LOD von 0,03 und ein LOQ von 0,08 Addukten pro 10⁸ Nukleotiden erzielt werden. Damit wurde es möglich, auch in den unbehandelten Zellen N7-GA-Gua Addukte qualitativ und bestenfalls quantitativ zu bestimmen. Je nach erwartetem Adduktgehalt und verfügbarer Menge an DNA, variierte die eingesetzte Menge an DNA in den unterschiedlichen Untersuchungen.

Parallel zur Methodenentwicklung wurde auch mit der Durchführung eines Resazurin-Reduktionstest, einem *in-vitro*-Testsystem zur Bestimmung der Zytotoxizität, begonnen. Um zu gewährleisten, dass in nachfolgenden Inkubationsversuch pRH, keine zytotoxischen Konzentrationen verwenden wurden, wurde ein solcher Test durchgeführt. Als Testsystem wurde hierbei mit pRH gearbeitet. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 h mit AA oder GA in unterschiedlichen Konzentrationen (10–10000 µM) behandelt. Viabilitäten unterhalb von 80 % konnten für GA ab einer Konzentration von 1000 µM beobachtet werden. Aufgrund der sehr hohen Inkubationskonzentrationen an Substanz wurden auch für AA zytotoxische Effekte mit Viabilitäten unterhalb 80 % ab einer Konzentration von 2500 µM AA beobachtet. Der errechnete IC₅₀-Wert für AA

bzw. GA lag bei 7990 bzw. 2620 μM . Zusammenfassend konnte für beide Substanzen zytotoxische Effekte beobachtet werden, wobei GA eine stärkere zytotoxische Wirkung auf die Zellen ausübt.

Nachdem die zytotoxische Wirkung von AA im Resazurin-Reduktionstest ermittelt wurde, wurde mit der Inkubation pRH begonnen. In vorliegender Arbeit wurden pRH mit 2–2000 μM AA über einen Zeitraum von 16 oder 24 h inkubiert. Neben diesen Langzeituntersuchungen fand auch eine Kurzzeitbehandlung der Zellen über eine Stunde mit 2000 μM AA statt. Unabhängig der Testkonzentration und Inkubationsdauer konnten über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg, einschließlich der unbehandelten Zellen, Addukte in den Zellen nachgewiesen werden. Als Hintergrundbelastung wurden in den unbehandelten Zellen *N7-GA-Gua*-Gehalte von $7,10 \pm 2,75$ Addukte pro 10^8 Nukleotide detektiert. Eine ähnliche Anzahl an Addukten konnte auch nach einstündiger Inkubation der Zellen mit 2000 μM AA festgestellt werden. Bei der 16h-Inkubation lagen die Adduktgehalte im unteren Konzentrationsbereich bis ca. 200 μM im Bereich der Kontrolle. Mit Zunahme der Konzentration der Substanz stieg die Anzahl an *N7-GA-Gua* an, sodass die höchsten Gehalte bei maximaler Konzentration mit $23,77 \pm 11,94$ Addukte pro 10^8 Nukleotide bestimmt werden konnten. Ähnliche Beobachtungen wurden nach 24h-Inkubation gemacht, wobei maximale Adduktgehalten von $28,10 \pm 9,67$ *N7-GA-Gua* Addukte pro 10^8 Nukleotide ermittelt wurden. Insgesamt konnte kein klarer Trend hinsichtlich der zeitabhängigen Bildung von AA beobachtet werden.

In einem weiteren Projekt dieser Arbeit wurde der Gehalt an *N7-GA-Gua* in Ratte und Maus in Abhängigkeit unterschiedlicher Aspekte untersucht. Die Auswahl der Organe war, bedingt durch die benötigte Menge an Untersuchungsmaterial, erneut beschränkt. In verschiedenen Studien zur DNA-Addukt-Menge in Ratte und Maus wurden in unterschiedlichen Geweben ähnliche *N7-GA-Gua*-Gehalte detektiert, sodass die Untersuchung der Nichtzielorgane in vorliegender Arbeit sinnvoll erschien und mit den Ergebnissen von bereits publizierten Daten verglichen wurde. Als Untersuchungsorgan zur Speziesabhängigkeit wurde bei männlichen Wistar-Ratten die Nieren und die Lunge untersucht. Um Speziesunterschiede zu ermitteln, wurden die Nieren und die Lunge, sowie

für einen weiteren Versuch auch die Leber von männlichen C57BL/6Jrj-Mäusen untersucht. Wie erwartet lag dabei der Gehalt an *N7-GA-Gua* in den Mäusen höher als bei den Ratten. Es wurden signifikante Speziesunterschiede festgestellt: Die Anzahl an *N7-GA-Gua* lag bei den Testorganen der Ratte (unter Berücksichtigung der Standardabweichung) zwischen 0,3–1 Addukten pro 10^8 Nukleotiden, die der Maus (unter Berücksichtigung der Standardabweichung) hingegen zwischen 2,2–7,9 Addukten pro 10^8 Nukleotiden. Organabhängige Effekte konnten nicht beobachtet werden, Gleiches gilt für den Vergleich der Adduktgehalte in männlichen und weiblichen C57BL/6Jrj-Mäusen, bei denen Lunge, Nieren und Leber untersucht wurde; es gab keine signifikanten geschlechter- oder organabhängige Effekte.

Im letzten Projekt zur Hintergrundbelastung im Nager wurden die Organe von männlichen BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Mäusen untersucht und die Menge an Addukten mit der Anzahl an *N7-GA-Gua* in den entsprechenden Organen männlicher C57BL/6Jrj-Mäusen verglichen. Als Modell für einen Typ2 Diabetes Mellitus wurden die Leber, die Lunge und die Nieren von BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Mäusen untersucht. Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren die Tiere neun Wochen alt, sodass bereits eine diabetische Stoffwechsellage vorlag. Auch in dieser Untersuchung wurden keine organabhängigen Effekte, weder bei den Tieren mit unveränderter noch mit veränderter Stoffwechsellage, beobachtet. Bei den C57BL/6Jrj-Mäusen lag die Anzahl an Addukten (unter Berücksichtigung der Standardabweichung) bei 0,3–7,7 *N7-GA-Gua* pro 10^8 Nukleotiden. Tendenziell nahm die Menge an Addukten in folgender Reihenfolge ab: Leber > Niere > Lunge.

Bei den BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Mäusen lag die Anzahl an *N7-GA-Gua* (unter Einbeziehung der Standardabweichung) zwischen 0,8–20,2 Addukten pro 10^8 Nukleotiden. Tendenziell nahm die Anzahl an Addukten in folgender Reihenfolge ab: Niere > Leber > Lunge. Die in dieser Untersuchung höchsten Adduktgehalte wurden mit $12,07 \pm 8,10$ Addukten pro 10^8 Nukleotiden in den Nieren der Tiere festgestellt. Die Addukt mengen in den Untersuchungsorganen beider Spezies waren ähnlich, mit Ausnahme der Niere, bei welcher die diabetischen Tiere tendenziell höhere Adduktgehalte

aufwiesen. Signifikante Unterschiede wurden jedoch weder in Bezug auf die verschiedenen Organe einer Spezies, noch beim Vergleich eines Organ beider Spezies, gefunden.

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde das Blut von insgesamt 60 Probanden und Probandinnen auf den Gehalt an *N7-GA-Gua* untersucht. Bei 12 dieser 60 Probanden waren keine Addukte im Blut detektierbar. Bei 48 Probanden konnten *N7-GA-Gua*-Addukte quantifiziert werden. Insgesamt ähnelten die Adduktgehalte denen aus den zuvor durchgeführten Nagerstudien. Am häufigsten konnten in der Humanstudie *N7-GA-Gua*-Gehalte zwischen dem LOD und 3 Addukten pro 10^8 Nukleotiden bestimmt werden. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Adduktgehalten in Rauchern und Nichtrauchern ermittelt. Dies könnte darauf schließen lassen, dass andere Biomarker wie beispielsweise Hb-Addukte, welche in bisherigen Humanstudien bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern erhöht lagen, möglicherweise doch nicht als Surrogatmarker (zumindest im Niedrigdosis-Bereich) geeignet sind [Schettgen *et al.*, 2004; Vesper *et al.*, 2008; von Stedingk *et al.*, 2011; Phillips and Venitt, 2012]. Eventuell war in vorliegender Studie die Anzahl an Rauchern mit 8 von 60 Probanden zu gering, um signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kohorten zu beobachten. Zwei der acht Raucher wiesen tendenziell höhere Adduktgehalte auf. Des Weiteren wurde keinerlei Korrelation zwischen Adduktgehalt und anderen Parametern wie Alter, HbA1c-Wert, Cotinin-Wert und weiteren gemacht werden. Einzig eine geringe Korrelation zwischen der Anzahl an *N7-GA-Gua* und BMI bzw. *N7-GA-Gua* und Körpergewicht wurde ermittelt.

Insgesamt liefert die vorliegende Arbeit Erkenntnisse über die Gehalte an *N7-GA-Gua* sowohl *in vitro* in pRH, als auch *in vivo* in Organen von Ratte und Maus, sowie im Blut des Menschen. Die Ergebnisse tragen zur Verbesserung der Datenlage über AA bei. Insbesondere die Ergebnisse der durchgeführten Humanstudie liefern Einblicke in die Hintergrundbelastung an *N7-GA-Gua* im Querschnitt der Bevölkerung und können daher auch für die Risikobetrachtung von AA von Interesse sein.

In Hinblick auf die Tierstudien wäre es sicherlich interessant, mehr Organe – im Idealfall auch Zielorgane der Substanz – zu untersuchen. Durch noch sensitivere Methoden sollte die Nachweis-

und Bestimmungsgrenze weiter gesenkt werden können. Die Auswahl der Organe in vorliegender Arbeit richtete sich nach Verfügbarkeit und DNA-Menge. Ideal wäre es gewesen, zum einen die Leber von Ratte und Maus vergleichend zu untersuchen, zum anderen wäre auch ein Vergleich des Bluts der Nager und des Menschen in Bezug auf die Adduktgehalte lohnend. Erste orientierende Versuche zur DNA-Gewinnung aus Nagervollblut wurden zu Beginn dieser Arbeit unternommen. Es konnten maximal 1 ml Blut aus Mäusen und 2 ml Blut aus Ratten gewonnen werden. Die anschließende Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung der Lymphozyten lieferte nicht die für die Probenaufarbeitung notwendige Menge an DNA (mind. 50 µg). Möglicherweise wäre die Ausbeute an DNA ausreichend, wenn das Blut direkt zur DNA-Gewinnung mittels diverser extra für diesen Zweck kommerziell erwerblichen Kits gewonnen wird. Ein solches Kit stand zu damaliger Zeit aus Kostengründen nicht zur Verfügung. In zukünftigen Studien könnten zudem die Adduktgehalte in diabetischen Tieren (z. B. BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Maus oder ZDF-Ratte) mit denen nicht diabetischer Tiere (z. B. C57BL/6JR-Maus oder Wistar-Ratte) unter Kontrolle der AA-Aufnahme und des Stoffwechsels untersucht werden. Auf eine Untersuchung der Stoffwechsellage der diabetischen Tiere sollte dabei nicht verzichtet werden, eine Untersuchung der Blutzuckerwerte wäre anzuraten. Durch eine kontrollierte AA-Aufnahme könnten Unterschiede in Folge einer unterschiedlichen AA-Aufnahmemenge ausgeschlossen werden.

Bezogen auf die durchgeführte Humanstudie sollte eine mögliche Hintergrundbelastung im Querschnitt der Bevölkerung untersucht werden. Das Studienkollektiv wurde möglichst vielseitig ausgewählt, weshalb keine Einschränkung hinsichtlich Geschlechtes, BMI oder Raucherstatus gemacht wurde. Um ein vollständiges Bild über alle Biomarker zu bekommen, sollten daher in zukünftigen Untersuchungen sämtliche Biomarker inklusive Hb-Addukte und Mercaptursäuren erfasst werden, um dann ggf. eine mögliche Korrelation einzelner Biomarker zueinander zu untersuchen. Anders als erwartet scheint in vorliegender Humanstudie weder der Raucherstatus noch der Blutzuckerwert einen Einfluss auf die Adduktgehalte zu haben. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von AA z. B. in LM und Zigarettenrauch, sowie einer möglichen endogenen Bildung, wäre die Bestimmung der AA-Aufnahme ratsam gewesen. Weiterhin wäre eine Auswertung in

Abhängigkeit verschiedener Aspekte wie Raucher *versus* Nichtraucher oder Diabetiker *versus* Nichtdiabetiker interessant. Idealerweise sollten künftige Studien unter kontrollierten Bedingungen stattfinden, so dass alle Probanden die gleiche AA-Menge aufnehmen. Die Umsetzung einer solchen Studie war zum damaligen Zeitpunkt nicht möglich. Zudem lag der Fokus der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Humanstudie auf der Erfassung der Hintergrundbelastung. Eine weitere Schwierigkeit bei der Erfassung von Hb-Addukten und DNA-Addukten ist, dass es sich, anders als bei den Mercaptursäuren, um Langzeit-Biomarker handelt. Die Dauer der Studie müsste dementsprechend angepasst werden. Hb-Addukte reichern sich über die Lebenszeit eines Erythrozyten an; diese beträgt ca. 4 Wochen. Die Umsetzung einer kontrollierten Studie über einen solchen Zeitraum scheint allerdings nicht realistisch.

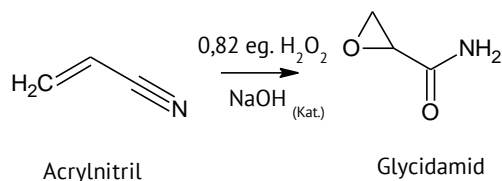
Die Ergebnisse der in vorliegender Arbeit durchgeführten Untersuchungen tragen zu einer Verbesserung der Datenlage über N7-GA-Gua bei und liefern, dank der Sensitivität der hier vorgestellten UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode, erstmals auch Einblicke in die Hintergrundbelastung des Menschen, welche für die Risikobetrachtung von AA interessant sein kann. Gleichzeitig besteht Anlass zu weiteren u. a. in diesem Kapitel beschriebenen Studie.

5. Material und Methoden

5.1 Synthese von Glycidamid und N7-Glycidamid-Guanin

Nachfolgend werden die einzelnen Synthesen der Verbindungen GA, N7-GA-Gua und [$^{15}\text{N}_5$]N7-GA-Gua ausführlich beschrieben. Die Überprüfung der Synthese erfolgte mittels unterschiedlicher Charakterisierungsmethoden. Neben Kernresonanzspektroskopie (^{13}C -NMR und ^{13}C - $\{^1\text{H}\}$ -NMR) und Elementaranalyse, wurde für GA auch eine Kristallstrukturanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.1.1 ausführlicher beschrieben. Das Reaktionsschema ist in Schema 08 dargestellt.

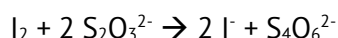
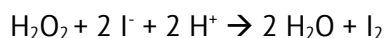
5.1.1 Darstellung des Glycidamids



Schema 08: Synthese der Verbindung GA.

Die Synthese der Verbindung GA erfolgt in Anlehnung an die Synthesevorschrift von Payne und Williams [Payne und Williams, 1961]. Wasser (500 ml) und 30%ige H_2O_2 -Lösung (30 ml; 1 mol) werden in einen Vierhalskolben vorgelegt und mit einem Blasenähler, Tropftrichter, Thermometer und pH-Elektrode bestückt. Mit Hilfe eines Wasserbads wird die Temperatur auf 35–37 °C eingestellt und vorsichtig Acrylnitril (80,1 g; 1,22 mol) hinzugegeben. Der Tropftrichter wird mit 1 M Natronlauge (60 ml) befüllt. Die Reaktion wird durch vorsichtiges Zutropfen der Natronlauge durchgeführt. Sehr wichtig ist hierbei, dass sowohl das pH-Intervall als auch die Temperatur in oben genannten Bereichen liegen. Andernfalls kommt es zu einer Polymerisation des Acrylnitrils und die Synthese funktioniert nicht. Nach ca. 12 h ist die Reaktion beendet. Um überschüssiges H_2O_2 abzufangen, wird der Lösung mit 10 Gew.-% Palladium versetzte Aktivkohle hinzugegeben und der Ansatz über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wird mittels Iodometrie der H_2O_2 -

Gehalt bestimmt. Ein Volumenanteil Reaktionslösung wird hierzu mit einem Volumenanteil Kaliumiodidlösung (1 M) versetzt und gegen Natriumthiosulfat (0,1 M) titriert. Als Indikator dient Stärkelösung. Die jodometrische Bestimmung des möglicherweise noch im Reaktionsansatz befindlichen H_2O_2 soll sicherstellen, dass keine H_2O_2 mehr vorhanden ist, welches zu Acetonperoxid (explosiv!) umgesetzt werden kann.



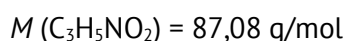
Schema 09: Reaktionsgleichung zur Bestimmung des Wasserstoffperoxidgehaltes.

Ist kein H_2O_2 nachweisbar wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und anschließendem Ölpumpenvakuum entfernt. Dabei bildet sich ein leicht gelb gefärbtes viskoses Öl, welches in Aceton aufgenommen wird. Der entstehende Niederschlag wird mittels Faltenfilter entfernt. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer und Ölpumpenvakuum eingengt. Als Rohprodukt entsteht ein gelb gefärbter Feststoff. Das Rohprodukt wird in trockenem Aceton gelöst und die Lösung bei $-30\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Nach 3–5 Tagen werden farblose Kristalle erhalten. Eine Fotoaufnahme dieser Kristalle ist in Abbildung 38 gezeigt.



Abbildung 38: GA-Kristalle im Synthesekolben.

Ausbeute: 15 g (172 mmol, farblose Kristalle)



Charakterisierung: Die Ergebnisse der NMR-Untersuchung, sowie der Kristallstrukturanalyse sind im Ergebnisteil dieser Arbeit, unter Kapitel 3.1.1, ausführlicher beschrieben.

Anhand der NMR-Spektroskopie wird der Gehalt an Verunreinigungen bestimmt. Eine typische Verunreinigung ist AA, welches als Nebenprodukt bei der Synthese gebildet wird. Eine weitere Verunreinigung ist Acrylnitril, welches bei unvollständiger Umsetzung am Ende der Reaktion noch vorliegen kann. Zeigen die durchgeführten Analysen eine Verunreinigung auf, wird das GA erneut in Lösung gebracht und in der Kälte umkristallisiert.

Die nachfolgend aufgeführte Tabellen 21 enthält eine Auflistung der zur Durchführung der Reaktion und der Analytik benötigten Geräte und Software-Programme. Die benötigten Chemikalien zur Herstellung von AA sind in Tabelle 22 enthalten.

Tabelle 21: Benötigte Geräte und Software-Programme zur Charakterisierung der Substanzen.

Analyse	Geräte und Software
Kernresonanzspektroskopie	Avance-III, 400 MHz, Bruker
	Bruker Avance-II, 600 MHz, Bruker
	TopSpin, Bruker.
Kristallstrukturanalyse	Xcalibur Diffraktometer (Sapphire3, Gemini ultra), Rigaku
	CrysAlis PRO (Rigaku Oxford Diffraction)
	SIR2014, SHELXL2014, Mercury, PLATON.
Elementaranalyse	Elementa Analysetechnik Mikro-
	Elementaranalysator Vario MIROCUBE.

Tabelle 22: Benötigte Chemikalien zur Synthese von Glycidamid.

Chemikalie	Herstellung
Aceton	Gebrauchsfertig; Lagerung bei RT.
Acrylnitril	Gebrauchsfertig; Lagerung bei 4 °C.
Aktivkohle mit 10 % Pd	Feststoff; Lagerung bei RT.
Deuteriumoxid (D ₂ O)	Gebrauchsfertig; Lagerung bei RT im Dunkeln.
Dimethylsulfoxid-d ₆ (DMSO-d ₆)	Gebrauchsfertig; Lagerung bei RT im Dunkeln.
Kaliumiodid	1 M (1,66 g) KI ad 10 ml bidest. H ₂ O; Lagerung bei RT.
Natriumthiosulfat	0,1 M (158 mg) Na ₂ S ₂ O ₃ ad 10 ml l bidest. H ₂ O; Lagerung bei RT.
Stärke-Lösung (1 %)	Gebrauchsfertig; Lagerung bei 4 °C.
Wasserstoffperoxidlösung (30 %)	Gebrauchsfertig; Lagerung bei 4 °C.

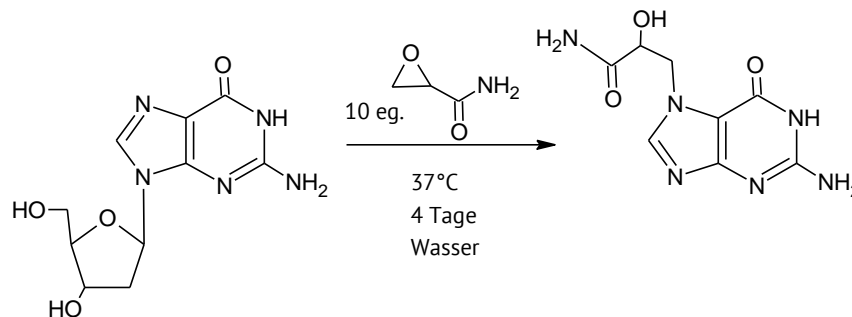
5.1.2 Darstellung des *N7*-GA-Gua und [¹⁵N₃]*N7*-GA-Gua

5.1.2.1 *N7*-GA-Gua

Zur Darstellung des *N7*-GA-Gua wurden verschiedene Syntheserouten getestet. Im nachfolgenden wird die finale Syntheseroute beschrieben. Es handelt sich bei dem hergestellten DNA-Addukt um einen, wie in Abbildung 39 gezeigten, farblosen kristallinen Feststoff. Schema 10 zeigt das Reaktionsschema der Synthese.



Abbildung 39: Aufnahme des im Labor hergestellten und in ein Glasgefäß überführten *N7*-GA-Gua.



Schema 10: Reaktionsschema zur Synthese des DNA-Adduktes *N7*-GA-Gua.

In Anlehnung an die Synthesevorschrift von Gamboa da Costa und Kollegen (2003) wird dG (281 mg; 985 μ M) in 40 ml bidest. H_2O gelöst und GA (789 mg; 9,1 mM) hinzugegeben. Dies entspricht einem ca. 10fachen molaren Überschuss an GA. Das Reaktionsgemisch wird bei 37 °C vier Tage lang gerührt. Das Produkt fällt als farbloser Niederschlag mit 11 % Ausbeute aus. Der Niederschlag wird vorsichtig mit kochendem Wasser gewaschen. Nicht umgesetztes GA verbleibt in Lösung, sodass am Ende ein sauberes Produkt entsteht.

Ausbeute: 25 mg (105 μ mol, farbloser kristalliner Feststoff)

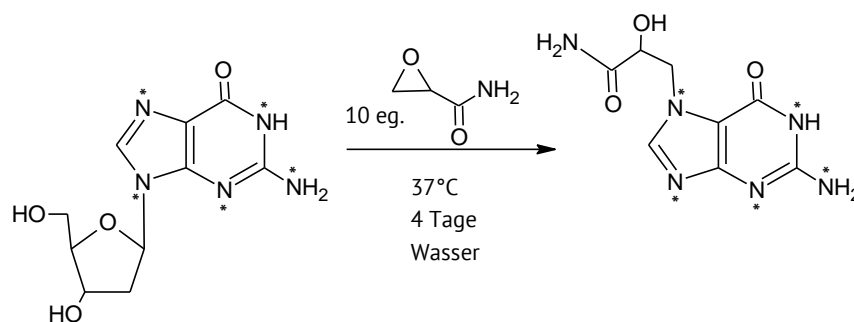
$M(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_3) = 238,3 \text{ g/mol}$

Charakterisierung: Die Ergebnisse massenspektrometrischen Untersuchung, sind im Ergebnisteil dieser Arbeit, unter Kapitel 3.1.2, ausführlicher beschrieben.

Die Reinheit der Verbindung wird mit den für GA erwähnten Methoden (Kernresonanzspektroskopie, Elementaranalyse) bestimmt. Des Weiteren wurde die Substanz massenspektrometrisch untersucht. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen sind im Ergebnisteil dieser Arbeit unter Kapitel 3.1.2 aufgeführt.

Als Massenspektrometer wurde eine QTrap 5500 (ABSciex) verwendet. Bei der dazugehörigen Software handelte es sich um Analyst Software Version 1.6.1. Zur Aufnahme und Auswertung der NMR-Analyse wurden die in Kapitel 5.1.1 aufgeführten Geräte und Software-Programme genutzt.

5.1.2.2 [¹⁵N₅]N7-GA-Gua



Schema 11: Reaktionsschema zur Synthese des [¹⁵N₅]N7-GA-Gua (mit * Stabilisotopenmarkierung).

Für die Synthese eines isotopenmarkierten Standards (IS), wie sie in Schema 11 dargestellt ist, wird [¹⁵N₅]dG (1,4 mg; 5,2 μM) mit GA (7,1 mg, ca. 16facher Überschuss; 82 μM) vier Tage bei 37 °C in 500 μl bidest. H₂O gerührt. Das ausgefallene Produkt (Ausbeute 38 %) wird wie oben beschrieben aufgereinigt und die Reinheit überprüft. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mittels HPLC über eine externe Kalibriergerade des nicht isotopenmarkiertem N7-GA-Gua.

Ausbeute:	2 μmol , gelöster Stoff $M(\text{C}_8\text{H}_{10}^{14}\text{N}^{15}\text{N}_5\text{O}_3) = 243,3 \text{ g/mol}$
Charakterisierung:	Die Ergebnisse massenspektrometrischen Untersuchung, sind im Ergebnisteil dieser Arbeit, unter Kapitel 3.1.2, ausführlicher beschrieben.

Aufgrund des kleinen Reaktionsansatzes war die Menge an erhaltenem Produkt sehr gering, sodass keine NMR-Aufnahmen möglich waren und lediglich eine massenspektrometrische Charakterisierung erfolgte. Die im Massenspektrometer erhaltenen Daten sind in Kapitel 3.1.2 aufgeführt.

Als Massenspektrometer wurde eine QTrap 5500 (ABSciex) verwendet. Bei der dazugehörigen Software handelte es sich um Analyst Software Version 1.6.1.

Eine Zusammenstellung aller zur Herstellung und Analyse der benötigten DNA-Addukte verwendeten Chemikalien ist in Tabelle 23 enthalten.

Tabelle 23: Benötigte Chemikalien zur Synthese von *N7*-GA-Gua und $^{15}\text{N}_5$ *N7*-GA-Gua.

Chemikalie	Herstellung
2'-Desoxyguanosin (dG)	Feststoff; Lagerung bei RT.
$^{15}\text{N}_5$ dG	Feststoff; Lagerung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.
Glycidamid (GA)	Feststoff; Lagerung unter Argon bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.
Dimethylsulfoxid- <i>d6</i> (DMSO- <i>d6</i>)	Gebrauchsfertig; Lagerung bei RT.

5.2 Isolation ausgewählter Zellen und einzelner Organe

Alle Schritte der Zellkultivierung pRH werden mit sterilen Medien, Lösungen und Materialien unter einer Sterilwerkbank durchgeführt, um mögliche Verunreinigungen durch Pilze und Bakterien zu vermeiden. Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Die Isolation und Aufarbeitung von Organen der Nager, sowie die Aufarbeitung von humanen Blutproben, erfolgt unter nicht sterilen Bedingungen.

Alle Arbeiten wurden mindestens unter S1-Bedingungen durchgeführt. Für den Umgang mit Humanblut wurde unter S2-Bedingungen gearbeitet.

5.2.1 Isolation von Lymphozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation

5.2.1.1 Allgemeines Prinzip

Eine Isolationsmethode zur Isolation von peripheren mononuklearen Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) stellt die Dichtegradientenzentrifugation dar. Zu den PBMCs zählen Lymphozyten, Monozyten und dendritische Zellen. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, unterschiedliche Blutzellen entsprechend ihrer Dichte mittels eines auf eine Dichte von 1,077 g/ml eingestellten Gradientenmediums zu trennen. Zellen, deren Dichte größer als das des Trennmediums ist, passieren dieses. Beispiel hierfür sind Erythrozyten [Kleiveland, 2015]. Während die im peripheren Blut vorkommenden (reifen) Erythrozyten keinen Zellkern aufweisen, besitzen Leukozyten einen Zellkern. Die mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Lymphozyten sind daher für DNA-Untersuchungen von Interesse. Die Dichtegradientenzentrifugation stellt ein physikalisches Trennverfahren dar, mit welchem Partikel anhand ihrer unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten getrennt werden. Dabei hängt die Sedimentationsgeschwindigkeit von unterschiedlichen Faktoren, wie z. B. Dichte und Viskosität des Lösungsmittels ab. Man unterscheidet zwischen zwei Klassen der Dichtegradientenzentrifugation,

welche sich hinsichtlich der maximalen Dichte des verwendeten Mediums in Bezug zur Dichte der trennenden Partikel unterscheiden. Während bei der sogenannten Zonenzentrifugation die maximale Dichte des Mediums die maximale Dichte der Partikel unterschreitet, wird die Dichte des Mediums die maximale Dichte der Partikel im Falle einer isopyknischen Zentrifugation überschreiten. Um mononukleäre Zellen, wie z. B. Leukozyten aus Blut zu isolieren, wird eine modifizierte isopyknische Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, bei welcher die maximale Dichte des Mediums die maximale Dichte einiger Zellpopulationen (wie z. B. Granulozyten und Erythrozyten) unterschreitet, sodass diese zum Boden pelletieren. Die Dichten der einzelnen Zellkomponenten sind in Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 24: Dichtebereiche und mittlere Dichten humaner Blutkomponenten [Luttmann *et al.*, 2014].

Komponente	Dichtebereich [g/cm³]	Mittlerer Dichtebereich [g/cm³]
Plasma/Serum	-	1,026
Thrombozyten	1,040–1,060	1,058
Monozyten	1,059–1,068	1,065
Lymphozyten	1,066–1,077	1,070
Basophile Granulozyten	1,075–1,081	1,079
Neutrophile Granulozyten	1,080–1,099	1,082
Eosinophile Granulozyten	1,088–1,099	1,092
Erythrozyten	1,090–1,110	1,100

Das für die Trennung der Blutzellen erforderliche Medium ist auf eine Dichte von 1,077g/cm³ eingestellt. Nachdem dieses ins Zentrifugalröhrchen vorgelegt wird, erfolgt eine vorsichtige Überschichtung des Mediums mit Vollblut. Im Anschluss erfolgt eine Zentrifugation bei welcher sich, wie in Abbildung 40 zusehen, bedingt durch die Dichte der einzelnen Zellkomponenten, fünf Schichten ausbilden.



Abbildung 40: Zentrifugenröhrchen nach erfolgter Zentrifugation.

Erythrozyten bilden aufgrund höherer Dichte die unterste Schicht. Darüber bildet sich eine Schicht aus verbrauchtem Trennmedium, gefolgt vom Leukozytenring und einer Plasmaschicht. Neben Leukozyten finden sich oftmals basophile Granulozyten sowie Thrombozyten als Kontamination wieder. Ein Teil der Thrombozyten findet sich auch im Plasma [Luttmann *et al.*, 2014].

5.2.1.2 Durchführung

20 ml Histopaque-1077® werden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und vorsichtig mit ca. 30 ml Vollblut überschichtet. Wichtig ist dabei, dass es zu keiner Durchmischung des Trennmediums mit dem Blut kommt. Nach erfolgter Überschichtung wird bei RT für 35 Minuten bei 500 xg (ohne Bremse) zentrifugiert. Dieser Schritt muss bei RT stattfinden, da es andernfalls zur Agglutination von Leukozyten mit Erythrozyten oder anderen Zellkomponenten kommt, wodurch eine Trennung der weißen Blutbestandteile von den restlichen Blutkomponenten vermindert wird. Nach der Zentrifugation werden die mononukleären Zellen (z. B. Lymphozyten) vorsichtig entnommen und mit einem Volumenanteil Phosphat-gepufferter Lösung (*phosphate buffered saline*, Phosphat-gepufferter Lösung, Calcium- und Magnesium-frei, PBS⁻) versetzt. Dieser Waschschrift dient dazu, die noch eventuell vorhandenen Reste des auf die Zellen zytotoxisch wirkenden Histopaque-1077® zu entfernen. Nach Zentrifugation bei RT für 10 Minuten bei 600 xg wird der Überstand abdekantiert und das Zellpellet wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben zur DNA-Extraktion eingesetzt. Eine Auflistung der für die Isolation von mononukleären Zellen benötigten Chemikalien ist in Tabelle 25 wiedergegeben.

Tabelle 25: Benötigte Chemikalien zur Isolation von mononukleären Zellen.

Chemikalie	Herstellung
Histopaque-1077®	Gebrauchsfertig; Lagerung bei 4 °C.
PBS ⁻ (<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferter Lösung, Calcium-und Magnesium-frei)	34,3 mM (10,0 g) NaCl; 2,70 mM (1,01 g) KCl; 7,69 mM (4,61 g) NaH ₂ PO ₄ ; ad 5 l bidest. H ₂ O; pH 7,4; Lagerung bei 4 °C.

5.2.2 Isolation von primären Rattenhepatozyten

5.2.2.1 Allgemeines Prinzip

Zur Isolation von pRH wurden in vorliegender Arbeit ausschließlich sechs Wochen alte männliche Wistar-Ratten (200 ± 20 g KG) verwendet. Die Wistar-Ratten wurden im Tierhaus der TU KL in Makrolon®-Käfigen unter striktem Tag-Nacht-Zyklus (12 h/12 h) gehalten. Ein freier Zugang der Tiere zu Wasser und Futter (Altomin 1314 TPF) wurde sichergestellt.

5.2.2.2 Durchführung

Die Isolation von Hepatozyten erfolgt mittels Zwei-Schritt-Kollagenase Perfusionstechnik nach Seglen mit Modifikationen [Seglen *et al.*, 1976; Schrenk, 1992]. Bevor mit dem Öffnen des Bauchraums des Tieres begonnen werden kann, wird das Tier mit Pentobarbital betäubt. Hierzu wird dem Tier 100 mg/kg KG der Lösung *intra peritoneal* (ins Bauchfell) verabreicht. Zur Überprüfung der Narkose dient der Bauchdecken-Schwanz-Reflex. Ist dieser Reflex nicht mehr vorhanden, kann mit der Öffnung des *Abdomen* (Bauchraum) und der Freilegung der Leber begonnen werden. Um eine Blutgerinnung zu vermeiden, wird das Antikoagulans Heparin in die *Vena Cava Interior* (untere Hohlvene) injiziert. Anschließend wird über die *vena porta hepatica* (Pfortader) zur Fixierung einer Braunüle eine lockere Ligatur gelegt. Eine weitere Ligatur wird um die Hohlvene gelegt. Dann wird die Braunüle in die Pfortader gelegt, fixiert und die Leber mit Perfusionsmedium-1 und einem Fluss von 3,6 ml/Min perfundiert. Anschließend wird zum Abfluss von Blut und Perfusat aus der Leber, die

untere Hohlvene ca. 2 cm unterhalb der Ligatur durchgetrennt und die Flussrate für 7–10 Minuten auf 40 ml/Min erhöht. Dabei wird die Leber mit Ethylene-glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (EGTA) haltigem Perfusionsmedium-1 durchspült. Als Chelatbildner bindet EGTA Kalziumionen und führt damit zur Schädigung von Desmosomen, welche für den Zusammenhalt einzelner Leberzellen nötig sind. Während die Schädigung von Zellstrukturen weiter voranschreitet, wird Collagenase im Perfusionsmedium-2 gelöst. Nach Entblutung der Leberlappen wird das Zwerchfell geöffnet und zur Fixierung einer Branüle weitere Ligaturen um den oberen und unteren Teil der Hohlvene gelegt. Die zuvor mit Collagenase versetzte Pufferlösung wird für 5–10 Minuten rezirkulierend mit einem Fluss von 40 ml/Min durch die Leber geleitet. Das Enzym Collagenase dient dem Abbau von Kollagen. Sofern der Verdau erfolgreich war, wird die Leber vorsichtig herauspräpariert und unter sterilen Bedingungen werden die Leberzellen mit Hilfe eines Waschpuffers und einem Nylonnetz (Maschenweite 250 µm) heraus geschwemmt und filtriert. Der Vorgang wird mit einem feinmaschigeren Nylonnetz (Maschenweite 100 µm) wiederholt und die Zellsuspension (verteilt auf vier Zentrifugalschälchen) für 3 Minuten bei 300 rpm zentrifugiert. Die Überstände, in welchen tote Zellen und Zelltrümmer enthalten sind, werden verworfen und die Pellets in Waschpuffer gelöst und erneut für 3 Minuten bei 300 rpm zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschschrilles wird für 3 Minuten bei 500 rpm zentrifugiert und die entstandenen Pellets in 16 ml Waschpuffer vereinigt. Zur weiteren Aufreinigung der Zellen, wird die Zellsuspension mit 32 ml Percoll-Lösung überschichtet, kurz invertiert und für 5 Minuten bei 2100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 20 ml Waschpuffer gelöst. Abschließend wird die Zellzahl, entsprechend der in Kapitel 5.2.3.3 aufgeführten Vorgehensweise, bestimmt. Eine Auflistung aller bei diesem Schritt benötigten Lösungen ist in Tabelle 26 enthalten.

Tabelle 26: Benötigte Chemikalien zur Perfusion.

Chemikalie	Herstellung
Collagenlösung	100 CDU/ml; Lagerung bei 4 °C.
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium low/ high Glucose</i> (DMEM lg/hg)	Gebrauchsfertig; Lagerung bei 4 °C.
Heparin	1000 U/ml in 0,9 % NaCl; Lagerung bei 4 °C.
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)	1 M (23,83 g); ad 100 ml bidest. H ₂ O; pH 7,4; Lagerung bei 4°C.
Pentobarbitallösung	Pentobarbitallösung nach Priest <i>et al.</i> , 2015.
Percoll-Lösung	27,8 ml Percoll; 4,2 ml Perfusionspuffer-Stammlösung (10 x); Lagerung bei 4 °C.
Perfusionsmedium-1	500 ml HBSS; 5 ml HEPES (1 M); 500 µl EGTA (100 mM); Lagerung bei 4 °C.
Perfusionsmedium-2	500 ml DMEM lg mit Phenolrot; 5 ml HEPES (1 M); Lagerung bei 4 °C.
Perfusionspuffer-Stammlösung (10X)	1,4 M (81,82 g) NaCl; 45,2 mM (3,73 g) KCl; 8 mM (1,63 g) MgCl ₂ x 6 H ₂ O; 23,8 mM (2,85 g) Na ₂ HPO ₄ ; 4 mM (0,544 g) KH ₂ PO ₄ ; ad 1 l bidest. H ₂ O; pH 7,4; Lagerung bei 4 °C.
Waschpuffer	500 ml DMEM hg; 3,5 ml BSA (30 %); 5,2 ml HEPES (1M); 5,2 ml Penicilin/Streptomycin (100x); Lagerung bei 4 °C.

5.2.3 Kultivierung primären Rattenhepatozyten

5.2.3.1 Ausstreuen und Kultivieren

Die Kultivierung der adhärent wachsenden pRH ist nur begrenzt möglich. Um ein optimales Anwachsen der pRH in den Kulturgefäßen zu ermöglichen, müssen diese mit einer dünnen Kollagenschicht benetzt werden. Die Wahl des Kulturgefäßes richtet sich nach der Versuchsdurchführung. Für den in Kapitel 5.5 beschriebenen Resazurin-Reduktionstest werden 24-Well-Platten kollageniert, indem 500 µl einer Kollagenlösung in das erste Well einer 24-Well-Platte gegeben werden. Es muss dabei darauf geachtet werden, dass der Well-Boden vollständig bedeckt ist. Anschließend wird die Lösung mittels Pipette abgezogen und in das nächste Well überführt. Für die Bestimmung von Adduktgehalten werden Petrischalen (Durchmesser 10 cm) benötigt. Diese werden hergestellt indem die erste Platte mit Kollagenlösung versetzt wird und das überschüssige Kollagen in eine weitere Platte dekantiert wird. Die so vorbereiteten Verbrauchsmaterialien werden über Nacht in der Sterilbank unter UV-Licht belassen, wobei die Kollagenlösung trocknet.

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in Nährmedium, bestehend aus *Dulbecco's Modified Eagle Medium low Glucose* (DMEM lg) mit und 10 % fötales Kälberserum und 1 % Penicillin-Streptomycin, bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relative Luftfeuchte. Zur Kultivierung der Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen werden 7 Millionen Zellen in 7 ml Zellkulturmedium ausgestreut. Für spätere Inkubationsversuche zur Bestimmung der DNA-Adduktgehalte nach Inkubation mit AA über verschiedene Zeitpunkte werden pro Konzentration, sofern möglich, drei Zellkulturschalen ausgestreut. Zur Kultivierung der Zellen in 24-Well-Platten werden 200 000 Zellen pro Well in einem 1 ml Gesamtvolumen pro Well ausgestreut. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt wie in Kapitel 5.2.3.3 beschrieben.

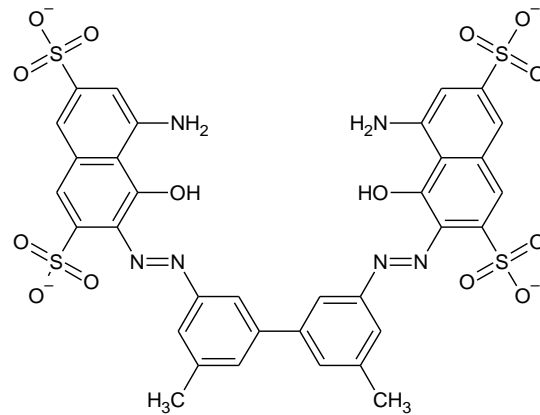
5.2.3.2 Mediumwechsel

Um zu überleben, betreiben die Zellen einen Stoffwechsel, wobei sie die im Nährmedium enthaltenen Nährstoffe verbrauchen und Abfallprodukte generieren. Infolge dieser

Stoffwechselaktivität kommt es zu einem Anstieg des pH-Wertes der Lösung, welcher sich durch einen Farbumschlag des Indikators Phenolrot von rot nach gelb ersichtlich macht. Bei den pRH erfolgt ca. 2 h nach Ausstreuen der Zellen ein Mediumwechsel. Hierfür wird verbrauchtes Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS⁻ gewaschen und das verbrauchte Medium durch neues vorgewärmtes Medium (DMEM lg) ersetzt. Anschließend werden die Zellen wie in Kapitel 5.2.3.1 beschrieben im Brutschrank weiter kultiviert.

5.2.3.3 Auszählen der Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer

Werden Zellen für eine Inkubationsreihe benötigt, so muss zunächst die Zellzahl pro ml Zellsuspension ermittelt werden. Um die Zellzahl zu bestimmen, wird eine sogenannte Neubauer-Kammer, bestehend aus neun Quadraten, verwendet. Jedes der neun Quadrate besitzt eine Fläche von 1 mm² sowie eine Tiefe von 0,1 mm, woraus ein Volumen von 0,1 µl resultiert. Mittels Färbung mit dem Azofarbstoff Trypanblau, siehe Schema 12, können Zellen sichtbar gemacht werden. Trypanblau bindet in seiner anionischen Form an Proteine in der Zelle, indem der Farbstoff durch die Zellmembran ins Zellinnere eindringt. Lebende Zellen sind in der Lage, den Farbstoff aktiv aus ihrem Zellinneren zu transportieren, wodurch sie im Lichtmikroskop weiß erscheinen. Tote Zellen hingegen, betreiben keinen Stoffwechsel mehr, wodurch die Azo-Verbindung im Zellinneren verbleibt und die Zellen dunkelblau erscheinen. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops kann dadurch zwischen vitalen und letalen Zellen differenziert werden. Die Auszählung einer Neubauer-Kammer erfolgt in den vier Eckquadraten, wobei Zellen, welche sich auf den Gitternetzlinien befinden, wie in Abbildung 41 gezeigt, nicht mitgezählt werden. Eine Vitalität von mindestens 80 % ist für reproduzierbare Ergebnisse Voraussetzung.



Schema 12: Struktur von Trypanblau.

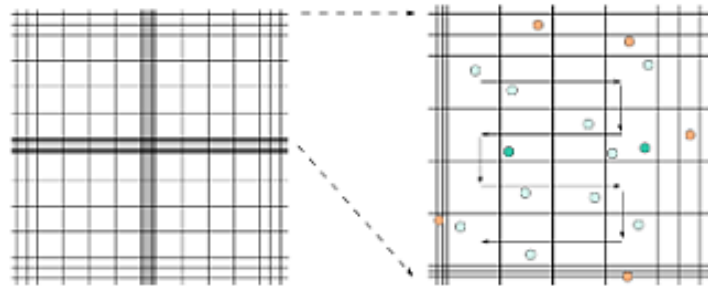


Abbildung 41: Neubauer-Zählkammer. Die Auszählung der Zellen erfolgt in den vier Eckquadraten. Rechts dargestellt: Zählschema innerhalb eines Quadrates. Weiß: lebende Zellen; blau: tote Zellen; orange: nicht gezählte Zellen [mod. nach Lindl und Gstraunthaler, 2013].

Zur Bestimmung der Zellzahl werden 10 µl der in Kapitel 5.2.2.2 beschriebenen Zellsuspension entnommen und mit 40 µl Trypanblau versetzt. Ein Teil davon wird in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt.

Die Berechnung der Anzahl lebender Zellen erfolgt mit nachfolgender Formel:

$$Z = \frac{\sum Z(\text{lebend})}{4} * V * NV$$

Gleichung 01: Berechnung der Zellzahl pro ml; mit: Z (lebend): Anzahl lebender Zellen pro Quadrat; V: Verdünnungsfaktor; NV: Neubauerfaktor (10000)

Die Berechnung der Viabilität erfolgt mit nachfolgender Formel:

$$\text{Viabilität (100\%)} = \frac{\sum Z(\text{lebend})}{\sum (Z(\text{lebend}) + Z(\text{tot}))} * 100$$

Gleichung 02: Berechnung der Viabilität; Mit Z (lebend): Anzahl lebender Zellen und Z (tot): Anzahl toter Zellen.

Tabelle 27: Chemikalien, welche zur Kultivierung von primären Rattenhepatozyten benötigt werden.

Chemikalie	Herstellung
Fötales Kälberserum (FKS)	Gebrauchsfertig; Lagerung bei -20 °C.
PBS ⁻	34,3 mM (10,0 g) NaCl; 2,70 mM (1,01 g) KCl; 7,69 mM (4,61 g) NaH ₂ PO ₄ ; ad 5 l bidest. H ₂ O; pH 7,4; Lagerung bei 4 °C.
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium low Glucose</i> (DMEM lg)	Gebrauchsfertig; Lagerung bei 4 °C.
Penicilin/Streptomycin (P/S)	Gebrauchsfertig; Lagerung bei -20 °C.
Trypanblau-Lösung	Gebrauchsfertig; Lagerung bei 4 °C.
Zellkulturmedium	500 ml DMEM-Medium; 50 ml FKS; 5 ml P/S, Lagerung bei 4 °C.

5.2.4 Inkubation primärer Rattenhepatozyten mit AA

Zur Bestimmung der Adduktgehalte nach Inkubation mit AA werden pRH über unterschiedliche Zeiträume (1; 16 und 24 h) mit AA in unterschiedlichen Konzentrationen (2; 20; 200; 500; 1000 und 2000 µM) inkubiert. Das Ausstreuen und Kultivieren der hierzu benötigten Zellen erfolgen wie in Kapitel 5.2.3.1 beschrieben. Nachdem sieben Millionen Zellen pro Petrischale ausgestreut worden sind, erfolgt nach ca. 2 h ein Mediumwechsel. Dieser wird wie in Kapitel 5.2.3.2 beschrieben durchgeführt. Nach weiteren 2 h im Brutschrank werden die Zellen mit 2; 20; 200; 500; 1000 und

2000 μM AA für 1; 16 oder 24 h inkubiert. Zur Inkubation werden die 1000fach konzentriert angesetzten Lösungen (mM-Bereich) in DMSO eingesetzt. Durch Einsatz von 7 μl einer solchen Lösung auf 7 ml Volumen (Medium), ergibt sich ein Verdünnungsfaktor von 1000, sodass die getesteten Konzentrationen im erwähnten μM -Bereich liegen. Zusätzlich wird eine Mediumkontrolle mit DMSO mitgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen mit vorgewärmten PBS⁻ gewaschen und die Zellkulturplatten mit den darauf befindlichen Zellen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Aufarbeitung aufbewahrt. Zur Herstellung einer 10 M AA-Stammlösung werden 711 mg AA in 1 ml DMSO gelöst und nachfolgend daraus die in Tabelle 28 aufgeführten Lösungen hergestellt.

Tabelle 28: Pipettierschema für Verdünnungsreihe.

Konzentration im Ansatz [mM]	Konzentration im Endvolumen [μM]	Volumen der Stammlösung [μl]	Menge DMSO [μl]
2000	2000	100 (aus 10 000 μM)	400
1000	1000	100 (aus 2000 μM)	100
500	500	100 (aus 1000 μM)	100
200	200	20 (aus 2000 μM)	180
20	20	20 (aus 200 μM)	180
2	2	20 (aus 20 μM)	180

5.2.5 Isolation von Organen aus Maus und Ratte

Nach erfolgter Perfusion zur Gewinnung der pRH, wie sie in Kapitel 5.2.2.2 beschrieben wurde, werden den Tieren die beiden Nieren und die Lunge entnommen, in flüssigen Stickstoff schockgefrostet und dann bis zur weiteren Aufarbeitung im Biofreezer bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für die Isolation von Organen der Maus wurden 9-Wochen alte männliche und weibliche C57BL/6JRj-Mäuse ($24 \pm 3\text{ g KG}$) und männliche BKS(D)-Lepr^{db}/JOrLR-Mäuse ($48 \pm 5\text{ g KG}$) verwendet. Die Tiere wurden im Tierhaus der TU KL in Makrolon[®]-Käfigen unter striktem Tag-Nacht-Zyklus (12 h/12 h) gehalten. Ein freier Zugang der Tiere zu Wasser und Futter wurde sichergestellt. Ratten und die aus eigener Zucht des Tierhauses stammenden C57BL/6JRj-Mäuse erhielten Atromin 1314 TPF als Futter. BKS(D)-

Lepr^{db}/JOrLR -Mäuse, welche von Janvier Labs gekauft wurden und bis zur Verwendung im Tierhaus gehalten wurden, bekamen ALIMENT S8189-S095 SNIFF gefüttert.

Zur Narkotisierung der Mäuse wird den Tieren Chloralhydrat *i. p.* verabreicht. Die Überprüfung der Narkose erfolgte wie bereits in Kapitel 5.2.2.2 beschrieben. Anschließend wird das Abdomen der Tiere eröffnet und mit PBS⁻ über das Herz perfundiert. Danach werden Leber, Lunge und Nieren entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

Die bei diesem Schritt benötigten Lösungen sind in Tabelle 29 enthalten.

Tabelle 29: Benötigte Chemikalien zur Isolation von Organen aus Maus und Ratte.

Chemikalie	Herstellung
Chloralhydrat	Gebrauchsfertig; Lagerung bei 4 °C.
PBS ⁻	34,3 mM (10,0 g) NaCl; 2,70 mM (1,01 g) KCl; 7,69 mM (4,61 g) NaH ₂ PO ₄ ; ad 5 l bidest. H ₂ O; pH 7,4; Lagerung bei 4 °C.

5.3 DNA-Isolierung

5.3.1 Allgemeines Prinzip

Zur Extraktion von DNA eignet sich die sogenannte Phenol-Chloroform-Extraktion. Hierbei wird das Zelllysate mit einer Mischung aus Phenol-Chloroform und Isoamylalkohol versetzt. Das in der Extraktionslösung enthaltene Phenol denaturiert Proteine, welche sich an der Phasengrenze zwischen organischer und wässriger Phase ansammeln. Chloroform denaturiert ebenfalls Proteine. Verschmutzungen sammeln sich somit in der organischen Phase bzw. an der Interphase an. Nucleinsäuren bleiben hingegen in wässriger Lösung. Isoamylalkohol dient lediglich als Antischaummittel. Die Phenol-Chloroform-Extraktion stellt somit eine klassische Methode dar bei der unerwünschte Verschmutzungen, wie z. B. Proteine von Nucleinsäurelösungen getrennt werden können [Mülhardt, 2003].

5.3.2 DNA-Extraktion aus Lymphozyten

Die mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Lymphozyten (aus ca. 20–30 ml Vollblut) werden in 5 ml Lysepuffer suspendiert und 175 µl Proteinase K (10 mg/ml) hinzugegeben. Nach 24 h Lysezeit werden die hergestellten Lysate auf RT herunter gekühlt, mit 100 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wird ein Volumenanteil der Extraktionslösung-1 hinzugegeben. Um eine möglichst vollständige Durchmischung der wässrigen und organischen Phase zu erzielen, werden die Proben gut durchmischt und ca. 10 Sekunden gevortext. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 4700 rpm und RT bilden sich drei Phasen. Um den Anteil an Verunreinigungen durch Proteine etc. gering zu halten, wird vorsichtig die wässrige Phase, möglichst ohne Interphase mit zu pipettieren, entnommen. Zu der wässrigen Phase wird dann 1 Volumenanteil der Extraktionslösung-2 hinzugegeben, 10 Sekunden gevortext und bei 4 °C für 30 Minuten bei 4700 rpm zentrifugiert. Im Falle einer Verunreinigung mit Interphase wird der Extraktionsschritt wiederholt. Die wässrige Phase wird nach der Zentrifugation entnommen und mit Natriumacetat (3 M) versetzt, sodass die Endkonzentration des einfach geladenen Salzes 0,3 M

beträgt. Zur Fällung der Nukleinsäure wird 1 Volumenanteil von auf -20 °C vorgekühltem 100 % Isopropanol hinzugegeben. Durch Invertieren fällt die Nukleinsäure spontan aus und muss noch durch Zentrifugation bei 4 °C für 10 Minuten bei 4700 rpm pelletiert werden. Um die gefällte DNA von Salz und Alkoholresten zu befreien, wird diese mit einer vorgekühlten 70% Ethanol-Lösung versetzt und erneut bei 4°C für 10 Minuten bei 4700 rpm zentrifugiert. Nach Trocknen der Pellets bei RT wird die DNA in 300 µl bidest. H₂O gelöst und am Nanodrop vermessen. Die gemessene DNA wird bis zur Verwendung im Biofreezer bei -80 °C gelagert [Mülhardt, 2013].

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen mittels Absorptionsspektroskopie

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA-Lösung erfolgt über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die DNA-Menge von 1 OD 260 nm beträgt 50 µg/ml. Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm liefert eine Aussage über mögliche RNA-Verunreinigungen. Eine RNA freie Nukleinsäure-Lösung weist ein Verhältnis von 1,6–2,0 auf. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 230 nm gibt Aufschluss über eine Verunreinigung durch Proteine oder Phenolreste. Der optimale Wert liegt bei 2,2. Zur Bestimmung der Reinheit und Konzentration der gelösten DNA wird 1 µl der zu messenden Probe direkt am Nanodrop vermessen. Wilfinger und Kollegen (1997) konnten zeigen, dass abhängig vom pH und Salzgehalt einer Probe unterschiedliche OD₂₆₀:280-Verhältnisse aufweisen können. Ebenso kann der Nachweis von Proteinkonzentrationen innerhalb einer Probe abhängig von eben genannten Bedingungen sehr schwanken [Wilfinger *et al.*, 1997]. Um diese möglichst gering zu halten, werden alle Proben in TE-Puffer gelöst und als Blank anstelle von bidest. H₂O der Puffer eingesetzt.

5.3.3 DNA-Extraktion aus primären Rattenhepatozyten

Ein wesentlicher Unterschied zur bereits beschriebenen Aufarbeitung von Blutzellen besteht bei der Lyse der pRH in der Lysezeit. Diese beträgt 3–4 h. Die bei -80 °C gelagerten Zellkulturplatten werden auf Eis angetaut, mit 1000 µl Lysepuffer versetzt und vorsichtig mit einem Zellkulturschaber abgeschabt und in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Jedem Lysat werden 25 µl Proteinase K (10 mg/ml) sowie 10 µl RNase (10 mg/ml) zugesetzt und für 3–4 h im Wasserbad bei

55 °C inkubiert. Nach Abkühlen des Lysats auf RT, wird erneut mit 15 µl RNase A (10 mg/ml) bei RT für 30 Minuten inkubiert. Dann wird jeder Probe ein Volumenanteil Extraktionslösung-1 hinzugegeben, 10 s gevortext und bei 4 °C für 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wird entnommen und mit einem Volumenanteil Extraktionslösung-2 versetzt. Nach erneutem Zentrifugieren bei 4 °C für 10 Minuten bei 14000 rpm wird die wässrige Phase vorsichtig entnommen und mit 0,1 Volumenanteil Natriumacetat (5M) und einem Volumenanteil Isopropanol versetzt. Die weitere Aufreinigung der ausgefällten DNA erfolgt wie in Kapitel 5.4 beschrieben.

5.3.4 DNA-Extraktion aus den entnommenen Organen von Ratte und Maus

Die unter Kapitel 5.2.5 entnommenen Organe werden in flüssigem Stickstoff zermahlen. Anschließend werden 100 mg des zermörserten Organs in 350 µl Lysepuffer gelöst und mit 6,25 µl Proteinase K (10 mg/ml) sowie 3,135 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt und bei 55 °C über Nacht im Wasserbad inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgen nach demselben Schema wie bereits in den vorhergehenden Kapiteln zur Isolation von DNA aus pRH und humanen Lymphozyten beschrieben. Die zur DNA-Extraktion benötigten Chemikalien und Lösungen sind in Tabelle 30 aufgeführt.

Tabelle 30: Benötigte Chemikalien für die DNA-Extraktion.

Chemikalie	Herstellung
Chloroform	Gebrauchsfertig; Lagerung bei RT.
Ethanol (100 %)	Gebrauchsfertig; Lagerung bei -20 °C.
Ethanol (70 %)	70 ml Ethanol; 30 ml bidest. H ₂ O; Lagerung bei -20 °C.
Extraktionslösung-1	25 ml Phenol; 24 ml Chloroform; 1 ml Isoamylalkohol; Lagerung bei 4 °C.
Extraktionslösung-2	48 ml Chloroform; 2 ml Isoamylalkohol; Lagerung bei 4 °C.
Isoamylalkohol	Gebrauchsfertig; Lagerung bei RT.

Fortsetzung Tabelle 30

Isopropanol	Gebrauchsfertig; Lagerung bei -20 °C.
Lysepuffer	400 ml TAE-Puffer; 40 ml SDS-Lösung (10 %); 20 ml Triton X-Gebrauchslösung(10 %); Lagerung bei 4 °C.
Natriumacetat (3M)	2,46 g Na ₂ OAC; ad 100 ml bidest. H ₂ O; Lagerung bei 4 °C.
Phenol	Gebrauchsfertig; Lagerung bei 4 °C.
Proteinase K-Stammlösung (10 mg/ml)	20 mg Proteinase K; ad 2 ml bidest. H ₂ O; Lagerung bei -20 °C.
RNase A-Stammlösung (10 mg/ml)	20 mg RNase A; ad 2 ml bidest. H ₂ O; Lagerung bei -20 °C.
SDS-Stammlösung (20 %)	Gebrauchsfertige Lösung; Lagerung bei RT.
SDS-Gebrauchslösung (10 %)	25 ml SDS-Stammlösung; 25 ml bidest. H ₂ O; Lagerung bei RT.
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)	50 mM (6,06 g) Tris; 1 mM (372 mg) EDTA; 50 ml Essigsäure (100 %); ad 1l bidest. H ₂ O; pH 8,3; Lagerung bei 4 °C.
Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)	5 mM (606 mg) TRIS; 0,1 mM (29,2 mg) EDTA; ad 1l bidest. H ₂ O; pH 7,1; Lagerung bei 4 °C.
Triton X-Stammlösung (100 %)	Gebrauchsfertig; Lagerung bei RT.
Triton X-Gebrauchslösung (10 %)	5 ml Triton X-Stammlösung; 45 ml bidest. H ₂ O; Lagerung bei RT.

5.4 Neutrale thermische Hydrolyse und Aufreinigung der Hydrolysate zur Gewinnung des gesuchten DNA-Adduktes

5.4.1 Allgemeines Prinzip

Die thermische Hydrolyse der DNA stellt eine Methode dar, um *N7*-GA-Gua aus einer DNA-Probe zu isolieren bzw. anzureichern. Bei dieser Aufarbeitungsvariante werden anstelle von Nukleosiden, welche bei der enzymatischen Spaltung der DNA freigesetzt werden, geschädigte Basen (insbesondere *N7*-Guanin- sowie *N3*-Adenin-DNA-Addukte) extrahiert. Diese Methode eignet sich daher besonders um das gesuchte *N7*-Guanin-Addukt mit wenigen Aufarbeitungsschritten aus der Probe zu isolieren.

5.4.2 Durchführung

Sofern genügend DNA isoliert werden kann, wird die erhaltene DNA in Duplikaten thermisch hydrolysiert und aufgearbeitet. Jede Aufarbeitung wurde zweimal mittels Massenspektrometer vermessen. Der Versuch wurde mindestens drei unabhängige Male wiederholt.

50–200 µg DNA werden in 500 µl TE-Puffer gelöst und mit 3 µl [¹⁵N₅]*N7*-GA-Gua als IS (10 nM; Endkonzentration 1 nM) versetzt. Die Hydrolyse der Proben erfolgt im Thermomixer bei 95 °C für 75 Minuten. Um einen weiteren Fortgang der Reaktion zu verhindern, werden die Reaktionsgefäße schnell auf Eis abgekühlt und das Hydrolysat vorsichtig auf Zentrifugeneinheiten (PES 3K 500 µL, VWR) überführt. Die Zentrifugeneinheiten werden zur Konditionierung zuvor mit 400 µl TE-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 14000 xg zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen und die zuvor hergestellten Hydrolysate aufgegeben und zentrifugiert. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 14000 xg, wird das Eluat an der Vakuumzentrifuge eingeengt. Der Rückstand wird in 125 µl einer mit Essigsäure (0,2 %) angesäuerten Ammoniumacetat-Lösung (0,73 M) aufgenommen und mit 400 µl Wasser-gesättigtem n-Butanol versetzt. Nach dem Vermischen der organischen und wässrigen Phase wird bei RT für 5 Minuten bei 13000 xg zentrifugiert. Nach Zentrifugation wird die organische Phase vorsichtig entnommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die

verbleibende wässrige Phase wird erneut extrahiert und hierzu mit 400 µl Butanol versetzt. Nach Zentrifugation bei RT für 2 Minuten bei 13000 xg wird die organische Phase vorsichtig entnommen und zur im ersten Schritt abgenommenen organischen Phase hinzugegeben. Ein letztes Mal wird mit Butanol extrahiert, zentrifugiert und die organische Phase mit den anderen beiden vereinigt. Mittels Vakuumzentrifuge wird das Lösungsmittel entfernt und die Rückstände in Lösungsmittel (bestehend aus MeCN, Ammoniumacetat und Essigsäure) aufgenommen und mittels UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS auf die Gehalte an *N7-GA-Gua* untersucht. Die benötigten Chemikalien und Lösungen zur thermischen Hydrolyse und nachfolgender Aufreinigung sind in Tabelle 31 enthalten.

Tabelle 31: Benötigte Chemikalien für die thermische Hydrolyse und Butanol-Extraktion.

Chemikalie	Herstellung
Ammoniumacetat	1 M (77,08 mg); ad 1 ml bidest. H ₂ O; Lagerung bei 4 °C.
Acetonitril (100 %)	Gebrauchsfertig; Lagerung bei RT.
Ammoniumacetat-Essigsäure-Lösung für Human- bzw. Tierproben	240 bzw. 200 µl Ammoniumacetat (1 M); 1000 µl Essigsäure (20 %); 760 bzw. 800 µl bidest. H ₂ O; Lagerung bei 4 °C.
Ammoniumsulfat	0,73 M (12 mg) in 125 µl bidest. H ₂ O.
Butanol <i>p. a.</i> wassergesättigt	Ein Volumenanteil Butanol mit einem Volumenanteil bidest. H ₂ O versetzen, gut durchmischen und mittels Scheidetrichter die organische Phase entnehmen, Lagerung bei RT.
Essigsäure (20 %)	10 ml Essigsäure (100 %); 40 ml bidest. H ₂ O; Lagerung bei RT.
Lösungsmittel für Human- bzw. Tierproben	250 bzw. 100 µl Ammoniumacetat-Essigsäure- Lösung; 4,25 bzw. 4,5 ml MeCN; 500 bzw. 400 µl bidest. H ₂ O; Lagerung bei 4 °C.
TE-Puffer	5 mM (606 mg) TRIS; 0,1 mM (29,2 mg) EDTA; ad 1l bidest. H ₂ O; pH 7,1; Lagerung bei 4 °C.

5.5 Resazurin-Reduktionstest

5.5.1 Allgemeines Prinzip

Der Resazurin-Reduktionstest, eine Modifikation des Alamar-Blue Assays, stellt eine einfache, schnelle, sensitive spektrophotometrische Methode dar, um die Zellproliferation oder Zytotoxizität verschiedener Verbindungen zu testen. Grundlage dieses Testsystems ist der bläulich erscheinende, gering fluoreszierende Redoxindikator Resazurin, welcher in Abhängigkeit von der mitochondrialen metabolischen Aktivität einer Zelle, wie in Abbildung 42 zu sehen ist, unter $\text{NAPH}+\text{H}^+$ -Verbrauch zu Resorufin, einem pinkfarbenen, stark fluoreszierenden Farbstoff umgesetzt wird. Mittels Fluoreszenzmessung (Anregungswellenlänge 544 nm, Emissionswellenlänge 590 nm) am Fluorscan kann die Umsetzung des nicht fluoreszierenden Farbstoffes ermittelt werden. Ist die metabolische Aktivität einer Zelle durch die toxische Wirkung von Substanzen erniedrigt oder nicht mehr vorhanden, findet diese Umsetzung verlangsamt oder nicht mehr statt. Bisher ist die Ursache für die Reduktion des Farbstoffes noch nicht vollständig aufgeklärt. Neben einer intrazellulären mitochondrialen Enzymaktivität wird eine extrazellulär stattfindende chemische Reaktion im Zellkulturmedium diskutiert. Um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, welche in Folge der Anwesenheit anderer Reduktionsmittel resultieren können, sollte zu Beginn eine Kontrolle der Testsubstanzen ohne Zellen durchgeführt werden [O'Brien *et al.*, 2000].

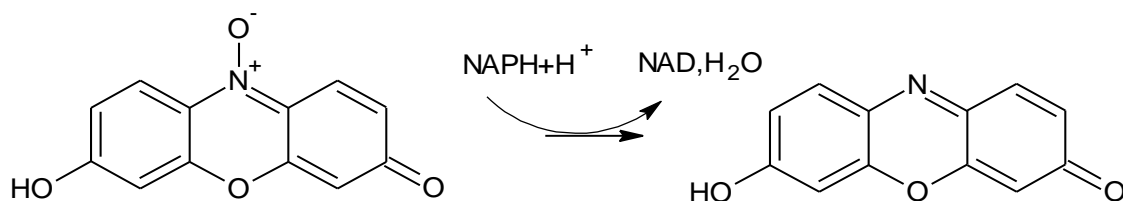


Abbildung 42: Reduktion von Resazurin zu Resorufin.

5.5.2 Durchführung

Für die Durchführung des Tests werden 24-Well-Platten benötigt, welche wie in Kapitel 5.2.3.1 beschrieben, hergestellt werden. Bei jeder Platte werden zusätzlich zu den getesteten Substanzen

(AA und GA) sowohl eine Positivkontrolle als auch eine Lösungsmittelkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle dient 0,1%iges Saponin. Als Lösungsmittelkontrolle wird eine 0,1%ige DMSO-Lösung mitgeführt.

Die Zellen werden vorsichtig in 24-Wellplatten (200 000/Well) pipettiert und bei 95 % relativer Luftfeuchte für 3 h im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit haben die Zellen Zeit am Boden der Kulturgefäße anzuwachsen. Nach dieser Ruhephase wird das verbrauchte Medium abgesaugt und durch 999 µl (bzw. 990 µl für PK) frisches, vorgewärmtes Medium pro Well ersetzt und 1 µl Testsubstanz, 10 µl PK oder 1 µl Lösungsmittelkontrolle hinzupipettiert. Nach 24h-Inkubationszeit wird der Überstand abgesaugt, die Zellen mit vorgewärmten PBS⁻ gewaschen und mit Resazurin-Lösung versetzt. Da Resazurin lichtempfindlich ist, werden die Zugabe der Resazurin-Lösung und die nachfolgenden Schritte möglichst unter Lichtausschluss durchgeführt. Nach 1,5 h im Brutschrank wird die Emission des gebildeten Farbstoffes Resorufin am Fluoroscan (Fluoroscan Ascent FL, Labsystems) bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm gemessen. Als Software wurde Ascent Software für Fluoroscan 2.6 F der Firma ThermoScientific verwendet.

Für die Auswertung des Assays wird die Abnahme der Emission der Proben pro Wells berechnet. Aus den Ergebnissen der einzelnen Wells wird der Mittelwert berechnet und bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (100 %) die Viabilität berechnet. Die Auswertung erfolgt daher semi-quantitativ.

$$\text{Viabilität[\%]} = \frac{\text{MW1} - \text{MW2}}{\text{MW3} - \text{MW2}} * 100$$

Gleichung 03: Berechnung der relativen Viabilität. Mit MW1: Mittelwert Probe; MW2: Mittelwert Leerwert; MW3: Mittelwert Kontrolle.

5. Material und Methoden

Die Herstellung der zum Versuch benötigten Stammlösungen und daraus hergestellten Verdünnungsreihe ist in Tabelle 32 und Tabelle 33 aufgeführt. Mit Ausnahme der PK wurden die Stammlösungen und daraus hergestellte Verdünnungen für jeden Versuch frisch angesetzt.

Tabelle 32: Pipettierschema für Verdünnungsreihe.

Konzentration im Ansatz [M]	Konzentration im Endvolumen [mM]	Eingesetzte Menge der Stammlösung [μ l]	Menge DMSO [μ l]
10	10	23 (aus 10 M)	0
5	5	12,3 (aus 10 M)	12,3
2,5	2,5	14,6 (aus 5 M)	14,6
1	1	9,2 (aus 2,5 M)	13,8
0,1	0,1	2,2 (aus 1 M)	19,8
0,01	0,01	2 (aus 0,1 M)	18

Tabelle 33: Schema zur Herstellung verschiedener Stammlösungen.

	Acrylamid	Glycidamid	Saponin	Resazurin
Molare Masse [g/mol]	71,08	87,08		229,18
Stammlösung	10 M (711 mg) in 1 ml DMSO gelöst	10 M (871 mg) in 1 ml DMSO gelöst	10 Gew.-% (1g) in 1 ml DMSO gelöst	440 mM (110,5 mg) in 1 ml DMF gelöst

Tabelle 34: Benötigte Chemikalien für den Resazurin-Reduktionstest.

Chemikalie	Herstellung
<i>N, N'</i> -Dimethylformamid (DMF)	Gebrauchsfertig; Lagerung bei RT.
DMSO (100 %)	Gebrauchsfertig; Lagerung bei RT.
Glycidamid-Stammlösung (10 M)	870 mg GA; ad 1 ml bidest. H ₂ O; Lagerung bei -20 °C.
NaCl/P-Puffer	1,06 M (28,8 g) KH ₂ PO ₄ ;

Fortsetzung Tabelle 34

	154 mM (1,8 g) NaCl; 1 mM (28,2 mg) Na ₂ HPO ₄ ; ad 200 ml bidest. H ₂ O; Lagerung bei 4 °C.
PBS ⁻	34,3 mM (10,0 g) NaCl; 2,70 mM (1,01 g) KCl; 7,69 mM (4,61 g) NaH ₂ PO ₄ ; ad 5 l bidest. H ₂ O; pH 7,4; Lagerung bei 4 °C.
Resazurin-Gebrauchslösung	1/1000 Verdünnung der Resazurin-Stammlösung mit NaCl/P-Puffer; Lagerung bei 4 °C für 4 Wochen.
Resazurin-Stammlösung	1 M (22,1 mg) Resazurin in 200 µl DMF; Lagerung für 7 Tage bei 4 °C.
Saponin-Lösung (10 %)	150 mg Saponin in 850 µl bidest. H ₂ O.
Zellkulturmedium	Siehe Tabelle 26; Lagerung bei 4 °C.

Tabelle 35: Benötigte Geräte und Software zur Bestimmung der Zytotoxizität.

Analyse	Geräte und Software
Fluoreszenzmessung	Fluoroscant Ascent FI, LabSystems, Accent Software für Fluoroscant 2.6 F, ThermoScientific.

5.6 UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode

5.6.1 Allgemeines

Zur Detektion der N7-GA-Gua-Adduktgehalte wird, die in dieser Arbeit neu entwickelte UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Methode verwendet. Als MS stand hierzu, wie in Tabelle 36 zu sehen, ein Gerät der Firma Sciex zur Verfügung, welches an eine UHPLC-Anlage der Firma Agilent gekoppelt war.

Tabelle 36: Überblick über die verwendete Hardware und Software für die MS-Analytik.

UHPLC-System	Agilent 1290 Infinity LC-System, Agilent.
MS System	Qtrap 5500 MS, Sciex.
Software	Analyst Software version 1.6.1 and Multiquant 2.0 Software, Sciex.

5.6.2 Kalibrierung

Die Kalibrierung des MS erfolgt mittels interner Kalibrierung unter Verwendung von Polypropylenglykol (PPG)-Standards der Firma Sciex. Ziel der Kalibrierung ist es, das Auflösungsvermögen des Gerätes zu optimieren. Um eine maximale Sensitivität zu erreichen, wird die Peakbreite (*peak width*) auf 0,6–0,8 u bei 50 % der maximalen Peakhöhe eingestellt. Des Weiteren werden die Peaks dem richtigen m/z-Verhältnis zugeordnet, wobei auf eine maximale Massenverschiebung (*mass shift*) von 0,1 u zu achten ist.

5.6.3 Tuning

Das Tuning dient der Optimierung der Signalintensitäten, was letztlich zu einer Steigerung der Sensitivität führt. Es wird in zwei Arten von Tuning differenziert. Das Substanz-spezifische Tuning erfolgt unter Hilfe einer Spritzenpumpe, mit welcher der gelöste Analyt bei einer Flussrate von 10 µl/Min in die Quelle des MS gepumpt wird. Tabelle 37 enthält eine Übersicht über die

substanzspezifischen Parameter. Die Optimierung dieser Potentiale erfolgt mittels *Quantitative Optimization*-Tool der Analyst Software.

Tabelle 37: Substanzabhängige Parameter beim MS-Tuning.

Parameter	Funktion
<i>Declustering potential</i> (DP)	Reduktion von Lösungsmittel-Analyt-Clustern
<i>Entrance potential</i> (EP)	Transport und Fokussierung von Ionen im Q0
<i>Collision energy</i> (CE)	Regulation Kollisionsenergie
<i>Collision cell entrance potential</i> (CEP)	Fokussierung von Ionen im Q2
<i>Collision cell exit potential</i> (CXP)	Transport von Ionen von Q2 nach Q3

Nachdem die substanzspezifischen Parameter bestimmt wurden, erfolgt ein quellenspezifisches Tunen. Die Optimierung der Parameter, welche in Tabelle 38 aufgeführt sind, erfolgt mittels des FIA (*Flow Injection Analysis*)-Tools der Analyst Software. Zur Optimierung dieser Parameter ist es wichtig, bereits einige chromatographische Parameter des Analyten zu kennen. Unter Berücksichtigung der Flussrate und der Fließmittelzusammensetzung zum Zeitpunkt der Elution des Analyten wird dieser mittels LOOP-Injektion (ohne HPLC-Säule) bei isokratischen Bedingungen bei wechselnden Quellenparametern in das Massenspektrometer injiziert, um eine maximale Signalintensität zu erzielen.

Tabelle 38: Quellenabhängige Parameter beim MS-Tuning.

Parameter	Funktion
<i>Curtain gas</i> (CUR)	Kontaminations-Schutz.
<i>Collision activated dissociation</i> (CAD)	Fragmentierung von Ionen im Q2.
<i>Ionspray voltage</i> (IS)	Ionisierung des Analyten.
<i>Temperatur</i> (TEM)	Verdampfung des Fließmittels, Förderung der Bildung des Analyten in der Gasphase.
<i>Gas 1</i> (GS1)	Bildung kleiner Fließmitteltropfen, Beeinflussung der Elektronenspray-Stabilität.

Fortsetzung Tabelle 38

<i>Gas 2 (GS2)</i>	Verdampfung des Fließmittels innerhalb Fließmitteltropfen.
--------------------	--

5.6.4 Chromatographie

Die Chromatographie des Analyten erfolgt mittels einer UHPLC-Anlage. Aufgrund der Polarität des Analyten wird eine HILIC-Säule verwendet. Die Elutions-Bedingungen, sowie weiterer Informationen zur UHPLC-Methode sind in Tabelle 39 aufgeführt. Um eine Verschmutzung der Quelle des MS zu vermeiden, wurde möglichst wenig in das Gerät injiziert. Ausschließlich innerhalb des Zeitraums von 3–5 Minuten wurde das Valco Valve so geschaltet, dass Fließmittel in die MS geleitet wurde. Pro Probe wurden 5 oder 10 µl Probenflüssigkeit injiziert. Die Retentionszeit sowohl des Analyten als auch des IS liegt bei 3,99 Min. Um die Säule vor Verunreinigung zu schützen, sind die Elutions-Bedingungen so gewählt, dass ein Spülschritt zur Reinigung erfolgt. Danach erfolgt ein Equilibrierungsschritt, sodass für die darauffolgende Messung einer neuen Probe dieselben Ausgangsparameter vorherrschen.

Tabelle 39: Überblick UHPLC-Parameter.

Parameter	Einstellung
Säule	ACQUITY UPLC BEH Amid
(Partikelgröße, Länge*Innendurchmesser)	1,7 µm, 3,0*50 mm, Waters
Trennmodus	HILIC
Mobile Phase	A: 0,2 % Essigsäure; B: MeCN mit 0,2 % Essigsäure
Eluenten Bedingung	0 Min: 90 % B und 10 % A 1,50 Min: 90 % B und 10 % A 5,25 Min: 50 % B und 50 % A 5,50 Min: 20 % B und 80 % A 7,00 Min: 20 % B und 80 % A 7,50 Min: 90 % B und 10 % A 11,00 Min: 90 % B und 10 % A

Fortsetzung Tabelle 39

Injektionsvolumen	5 µl (Tierproben) oder 10 µl (Humanproben)
Flussrate und Retentionszeit	400 µl/min und 3,99 Min
Säulenofentemperatur	24° C
HPLC-System	Agilent 1290

5.6.5 Quantifizierung

Die Quantifizierung der N7-GA-Gua-Adduktgehalte erfolgt mittels IS. Bei der Auswahl des IS gibt es verschiedene Anforderungen, welche dieser erfüllen muss. Ein wichtiges Kriterium ist, dass dieser nicht natürlich in der Probe vorhanden ist und eine ähnliche Molekülstruktur wie der Analyt aufweist. Neben ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie z. B. einer identischen Retentionszeit, sollte sich der IS hinsichtlich der Masse vom Analyten unterscheiden. Aufgrund der ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften wird davon ausgegangen, dass der IS sich während aller Schritte beginnend von Probenaufarbeitung bis hin zu massenspektrometrischer Messung sehr ähnlich dem Analyten verhält. Zu den gängigen IS zählen daher isotopenmarkierte Verbindungen, bei welchen Stickstoffatome [^{14}N], Kohlenstoffatome [^{12}C], oder Wasserstoffatome durch Stickstoffatome [^{15}N], Kohlenstoffatome [^{13}C] oder Deuteriumatome ersetzt worden sind. In vorliegender Arbeit wird das unter Kapitel 5.1.2.2 hergestellte [$^{15}\text{N}_5$]N7-GA-Gua als IS eingesetzt. Der IS wird zu Beginn der Probenaufarbeitung der Probe in einer definierten (End)Konzentration (10 nM ergibt eine Endkonzentration von 1 nM) zugesetzt. Durch Vergleich der nach massenspektrometrischer Messung erhaltenen Peakflächen des Analyten und IS, kann der Gehalt an Konzentration des Analyten exakt bestimmt werden. Mögliche Verluste aufgrund der Probeaufarbeitung z. B. in Folge des Pipettierens etc. werden berücksichtigt.

5.6.6 Nachweis und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) entspricht der kleinsten Konzentration des Analyten, die mit durchgeführter Methode noch nachweisbar – jedoch nicht quantifizierbar – ist. Sie ergibt sich aus der Peakhöhe des Analyten und dem Rauschen. Die Bestimmung des Signals zu

Rausch-Verhältnisses erfolgt mittels Kalibriergeraden. Als LOD wird die kleinste Konzentration des Analyten definiert, bei welcher die Peakintensität dem (mindestens) 3fachen des Grundrauschens entspricht. Während mittels LOD lediglich eine Aussage getroffen werden kann, ob der Analyt in der Probe vorhanden ist (ja/nein Entscheidung), kann mittels Bestimmungsgrenze (*limit of quantification*, LOQ) eine Quantifizierung der in der Probe vorhandenen Menge an Analyten erfolgen. Der LOQ-Wert entspricht dem doppelten des LOD, die Peakhöhe entspricht somit dem 6fachen Grundrauschen.

5.6.7 Linearität

Die Linearität einer Methode spiegelt die Sensitivität der Methode innerhalb eines definierten Konzentrationsbereichs wider. Zur Bestimmung der Linearität werden unterschiedliche Konzentrationen des Analyten mit jeweils 1 nM IS hergestellt. 5 und 10 µl dieser Lösungen werden in das Massenspektrometer überführt. Die Herstellung der Standards ist in Tabelle 40 aufgeführt. Die Herstellung der benötigten Stammlösungen ist in Tabellen 41 und 42 wiedergegeben.

Tabelle 40: Pipettierschema zur Herstellung von Kalibrierlösungen. Mit braun markiert: Lösungen, die hergestellt wurden, um Standards zu erhalten, in welchem kein Addukt nachweisbar ist. Grün hinterlegt repräsentiert den LOD, blau den LOQ.

Konzentration [nM]	Volumina Analyten-Lösung [µl]	Volumina MeCN [µl]	Volumina Acetat- Essigsäure-Lösung [µl]	Volumina 10 nM IS [µl]
10	100 (aus 20 nM)	70	10	20
7,5	75 (aus 20 nM)	95	10	20
5	50 (aus 20 nM)	120	10	20
2,5	25 (aus 20 nM)	145	10	20
1	10 (aus 20 nM)	160	10	20
0,5	100 (aus 1 nM)	70	10	20
0,25	50 (aus 1 nM)	120	10	20
0,1	20 (aus 1 nM)	150	10	20
0,075	15 (aus 1 nM)	155	10	20
0,05	10 (aus 1 nM)	160	10	20

Fortsetzung Tabelle 40				
0,025	5 (aus 1 nM)	165	10	20
0,01	2 (aus 1 nM)	168	10	20
0,0025	100 (aus 0,005 nM)	70	10	20
0,001	80 (aus 0,005 nM)	90	10	20

Tabelle 41: Herstellung der benötigten N7-GA-Gua-Lösungen. Mit Grün hinterlegt Lösungen, die zur Herstellung der Kalibriergeraden benötigt wurden.

Konzentration N7-GA-Gua [nM]	Volumina Analyten-Lösung [µl]	Volumina MeCN [µl]
1000000	10 (aus 10 mM)	90
10000	10 (aus 1 mM)	990
100	10 (aus 10000 nM)	990
20	100 (aus 100 nM)	400
1	20 (aus 20 nM)	380
0,05	10 (aus 1 nM)	180
0,005	20 (aus 0,05 nM)	180

Tabelle 42: Herstellung von Lösungen, welche für das Ansetzen der Kalibriergeraden benötigt werden.

Ammoniumacetat (1M)	Essigsäure (20 %)	Ammoniumacetat (120 mM)-Essigsäure (10 %)-Lösung für Humanproben	Ammoniumacetat (100 mM)-Essigsäure (10 %)-Lösung für Tierproben	N7-GA-Gua (10 mM)
77,08 mg in 1 ml bidest H ₂ O	1: 1 Verdünnung einer 20%igen Lösung	1 ml Essigsäure (20 %); 0,24 ml Ammoniumacetat (1M) ; 0,76 ml bidest H ₂ O	1 ml Essigsäure (20 %); 0,2 ml Ammoniumacetat (1M); 0,8 ml bidest H ₂ O	2,38 mg in 1 ml bidest H ₂ O

Ein perfekter linearer Zusammenhang zwischen dem Signal des Analyten und der Konzentration des Analyten ist durch einen Korrelationskoeffizienten von eins gekennzeichnet. Werte geringer als 0,95 deuten auf eine breite Streuung der Werte während der Messung hin. Je kleiner der

Korrelationskoeffizient somit wird, desto unpräziser die Methode. Oftmals wird anstelle des Korrelationskoeffizienten das Bestimmtheitsmaß R^2 angegeben. Letztlich handelt es sich dabei um den Korrelationskoeffizienten im Quadrat. Auch hier spiegelt der Wert von eins eine perfekte Linearität wider. Eine Abnahme deutet auf einen Verlust der Linearität hin. Die Auswahl des Konzentrationsbereiches, in welchem die Kalibriergeraden gemessen werden, hängt von dem erwarteten Ergebnis ab. Für die Quantifizierung der Proben ist es wichtig, dass diese innerhalb der Geraden liegen. Eine Kalibriergerade besteht aus mindestens fünf unterschiedlichen Konzentrationen. Die Messung pro Konzentration erfolgt mindestens zweimal.

5.6.8 Lauf zu Lauf und Tag zu Tag Variabilität

Zur Bestimmung der Lauf zu Lauf Variabilität werden unterschiedliche Konzentrationen an Addukt (0,05; 0,1; 0,5 und 1 nM) gespiked mit 1 nM IS an einem Tag fünfmal in Folge vermessen. Die Bestimmung der Tag zu Tag Variabilität erfolgt an fünf aufeinander folgenden Tagen mit denselben Konzentrationen. Nach erfolgter Messung werden die Proben im Kühlschrank gelagert und am nächsten Tag zur erneuten Messung eingesetzt. Die Herstellung der Standards erfolgt nach dem in Tabelle 42 beschriebenen Pipettierschema. Es wird darauf geachtet, dass die Messung der Proben, wenn möglich unter ähnlichen Bedingungen abläuft, beispielsweise indem diese immer zur selben Uhrzeit gemessen werden.

5.6.9 Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate (*recovery*) liefert Erkenntnisse über die Ausbeute der Methode mittels Vergleiches eines gemessenen Wertes mit einem Referenzwert. Eine Wiederfindungsrate von 100 % bedeutet, dass es während der Probenaufarbeitung zu keinen Verlusten kommt, sodass der gemessene Wert mit dem Referenzwert übereinstimmt. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate werden unterschiedliche Konzentrationen (0,8; 1 und 1,2 nM Analyt) mit jeweils 1 nM IS angesetzt. Die Herstellung der Verdünnungsreihe ist in Tabelle 43 aufgeführt. Für die Dotierung der Proben

wird ausschließlich die geringste Konzentration an *N7-GA-Gua* (1 nM) verwendet. Für jeden Standard wird die Bestimmung der Wiederfindung viermal durchgeführt.

Tabelle 43: Herstellung der benötigten *N7-GA-Gua* Lösungen. Die Herstellung der 100 μM Lösung erfolgt aus der in Tabelle 42 beschriebenen 10 mM Lösung.

Konzentration <i>N7-GA-Gua</i> [μM]	Volumina Analyten-Lösung [μl]	Volumina bidest H_2O [μl]
100	10 (aus 10000 μM)	990
1	10 (aus 100 μM)	990
0,01	10 (aus 1 μM)	990
0,001	100 (aus 0,01 μM)	900

Tabelle 44: Volumina an *N7-GA-Gua*, die den Wiederfindungsproben vor Probenaufarbeitung zugesetzt werden.

Konzentration <i>N7-GA-Gua</i> [nM]	Volumina 1 nM <i>N7-GA-Gua</i> [μl]
1,2	36
1	30
0,8	24

Die Ergebnisse der Wiederfindung sind in Tabelle 45 aufgeführt.

Tabelle 45: Absolute Wiederfindung.

Konzentration Addukte [nM]	Wiederfindung [%] \pm Stabw. [%]	Absolute Wiederfindung [%] \pm
	unter Berücksichtigung des IS bei Injektion von 5 bzw. 10 μl	Stabw. [%] bei Injektion von 5 bzw. 10 μl
0,8	53 \pm 6 bzw. 61 \pm 8	12 \pm 6 bzw. 24 \pm 3
1	56 \pm 4 bzw. 62 \pm 4	17 \pm 2 bzw. 27 \pm 2
1,2	55 \pm 2 bzw. 63 \pm 4	16 \pm 2 bzw. 28 \pm 1

5.7 Informationen zur Humanstudie

5.7.1 Rechtliche Genehmigung

Die durchgeführte Studie mit der Antragsnummer 2018-13008-KliFo wurde von der Ethikkommission des Landes Rheinland-Pfalz genehmigt. Am 25.01.2018 hatte die Ethikkommission in ihrer Sitzung über den Antrag beraten. Nach Beratung der Kommission hatte diese keine prinzipiellen Bedenken gegen die Durchführung der Studie geäußert. Vor Erteilen eines zustimmenden Votums mussten jedoch Unterlagen überarbeitet werden. Die finale Version (Version 2) wurde erstellt und eingereicht. Am 06.03.2018 erfolgte die Genehmigung der Studie mittels zustimmenden Votums.

5.7.2 Probanden/innen

Für die Studie wurden 60 freiwillige gesunde Frauen und Männer, kaukasischer Abstammung, im Alter von 18–65 Jahren, rekrutiert. Als gesund wurden Probanden definiert, welche zum Zeitpunkt der Studie an keiner der nachfolgenden Krankheiten litten: Diabetes Mellitus, Infektionskrankheiten, Lebererkrankungen, Herzerkrankungen, zu hoher/niedriger Blutdruck, Nierenerkrankungen, Schlaganfall, Magen-Darmerkrankungen, Schilddrüsenerkrankungen, Rheuma oder rheumatisches Fieber, Asthma oder andere Lungenerkrankungen, Blutkrankheiten oder Blutgerinnungsstörungen, Nervenerkrankungen und Anfallsleiden. Als weiteres Kriterium diente der Raucherstatus. Der Gesundheitsstatus wurde mittels Fragebogen erfasst. Die im Fragebogen erfassten Parameter sind in Tabelle 46 zusammenfassend aufgeführt.

Tabelle 46: Fragen des Fragebogens.

Persönliche Angaben	Raucherstatus	Ernährungsgewohnheiten	Krankheiten
- Alter	- bei Rauchern:	- Vegetarier	- Diabetes
- Geschlecht	Anzahl an Zigaretten	- Veganer	- Schlaganfall
- Körpergewicht	pro Tag	- Regelmäßiger Konsum:	- Rheuma
- Körpergröße	- bei Nichtraucher:	NEM; Kaffee, diverse LM	- rheumatisches Fieber
	mind. 3 Monate ohne		- Blutkrankheiten od.
	Zigarettenkonsum		Gerinnungsstörungen
			- Anfallsleiden
			- Nervenerkrankungen
			- Infektionskrankheiten
			- Herzerkrankungen
			- Blutdruck
			- Nierenerkrankungen
			- Schlaganfall
			- Magen-Darm-Erkrankungen
			- Schilddrüsenerkrankungen
			- Asthma
			- Lungenerkrankungen

Wurden eine oder mehrere Gesundheitsfragen mit „ja“ beantwortet, war dies ein Ausschlusskriterium. Die Probanden/innen konnten sowohl Raucher als auch Nichtraucher sein. Als Ausschlusskriterium für Nichtraucher galt, dass diese mindestens drei Monate nicht geraucht hatten. Ein BMI wurde nicht festgelegt. Ebenso war Schwangerschaft kein Ausschlusskriterium. Auf eine Überprüfung mittels Schwangerschaftstest wurde verzichtet. Probandinnen wurden lediglich im Fragebogen gefragt, ob eine Schwangerschaft vorliegt.

Die Rekrutierung der Probanden/innen erfolgte im April 2018. In einer Informationsveranstaltung erhielten Studieninteressierte neben Informationen zum Hintergrund der Studie, genaue

Informationen zum Ablauf der Studie. Im Zuge dieser Veranstaltung wurde eine Probandeninformation ausgeteilt. Die Informationsveranstaltungen fanden innerhalb des Zeitraums von 09–24. April 2018 statt. Danach hatten die Probanden/innen mindestens eine Woche Bedenkzeit, bevor die Zustimmung zur Studie erfolgen konnte. Die Zustimmung erfolgte mittels Unterzeichnung der Einwilligungserklärung. Es bestand jedoch jederzeit die Möglichkeit ohne Angabe von Gründen von der Studie zurückzutreten.

Insgesamt konnten 60 Teilnehmer/innen für die Studie rekrutiert werden. Das Studienkollektiv war dabei wie folgt aufgebaut:

Tabelle 47: Studienkollektiv.

	Frauen	Männer	Männer und Frauen
Anzahl an Nichtrauchern	26	34	60
Anzahl an Rauchern	2	6	8
Alter [Jahre]	20–56 (Median 26)	20–37 (Median 25,5)	20–56 (Median 26)
BMI [kg/m²]	17,8–39,5 (Median 21,6)	17,0–36,6 (Median 25,4)	17,0–39,5 (Median 22,9)

5.7.3 Studienablauf

Nach der Informationsveranstaltung erfolgte ein Aufklärungsgespräch, in welchem die Probanden/innen in einem persönlichen Gespräch mit dem Studienleiter Herr Prof. Dr. Dr. Schrenk über die Risiken der Studie aufgeklärt wurden. Des Weiteren wurde die Einwilligungserklärung unterzeichnet und ein Fragebogen ausgefüllt. Teil dieses Fragebogens war die Angabe von Körpergröße und Gewicht. Hierzu wurden die Probanden/innen gewogen und gemessen. In einem weiteren Termin wurden jedem Teilnehmer/in nüchtern ca. 40 ml Blut aus der Armvene durch Herr Dr. Fischer (Betriebsarzt der TU KL) entnommen. Zusätzlich wurde um eine Urinprobe gebeten. Der Urin der Probanden wurde auf den Gehalt an Cotinin untersucht. Im Blut der Probanden/innen wurde neben dem Gehalt an N7-GA-Gua auch der nüchtern Glukosewert und der HbA1c-Wert bestimmt. Die

Untersuchung des Urins nach dem Gehalt an Cotinin, sowie die Untersuchung des Blutes auf den nüchtern Glukosegehalt und den Gehalt an HbA1c, erfolgte in Kooperation mit dem Med. Versorgungszentrum MVZ synlab (Neustadt an der Weinstraße) unter Leitung von Herrn Dr. Michael Püttmann. Im Anschluss an die Blutentnahme, gab es keine weiteren Termine zur Blutabnahme und die Studie war somit für den Probanden/in beendet. Mit Ausnahme des Verzichts auf Nahrungsaufnahme 12 h vor Blutabnahme, gab es keine Einschränkungen für die Teilnehmer/innen. Besondere Ernährungsgewohnheiten oder Verhaltensweisen gab es ebenso nicht zu beachten. Die Blutabnahmen fanden an folgenden Tagen statt: 7.; 15. und 22. Mai 2018. Abbildung 43 enthält eine vereinfachte Darstellung des Studienablaufs.



Abbildung 43: Fließschema Studienablauf (vereinfacht dargestellt).

5.8 Verwendete Materialien: Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

5.8.1 Geräte

Tabelle 48: Aufführung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Geräte	Hersteller/Lieferant
<u>Autoklaven</u>	
Varioklav Typ 500	H&P Labortechnik, Edison, USA
UNOLD Elektro	UNOLD, Hockenheim, Deutschland
<u>Biofreezer</u>	
MDF-U6086S	Sanyo, München, Deutschland
Skadi®	Ms-L GmbH, Dielheim, Deutschland
Brutschrank	Binder GmbH, Typ 9040-0013, Tuttlingen, Deutschland
<u>Diffraktometer</u>	
Rigaku Xcalibur (Sapphire3, Gemini ultra)	Rigaku; Neu-Isenburg, Deutschland
Eismaschine (Wessamat Combi-Line)	Wessamat Eismaschinenfabrik GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Fluoroscan Ascent FL	Labsystems, Dreieich, Deutschland
Gefrier- und Kühlschränke (Liebherr Premium)	Liebherr- International AG, Bulle, Schweiz
Gewebehomogenisator	VWR International, Darmstadt, Deutschland
<u>Glasgeräte</u>	
Bechergläser, Pipetten, Messzylinder, Schraubverschlussflaschen)	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Heißluftföhn	Steinel Vertrieb GmbH, Herzebrock-Clarholz, Deutschland
<u>Lichtmikroskope</u>	
Axioskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Leica DM IRB	Leica, Bonn, Deutschland
Massenspektrometer (API 5500 QTrap)	AB Sciex, Darmstadt, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte (Ika RCT classic)	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland

Forsetzung Tabelle 48Minishaker

Ika Vortex, Genius 3	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland
Bio Vortex V1	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Multi Block Heater	Labline Instruments, Kerala, Indien
NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer)	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

NMR-Spektrometer

Avance-III, 400 MHz	Bruker, Rheinstetten, Deutschland
Bruker Avance-II, 600 MHz	Bruker, Rheinstetten, Deutschland
pH-Meter (HI 221)	HANNA Instruments GmbH, Vöhringen, Deutschland

Pipetten

Eppendorf Research Plus	VWR International, Frickenhausen, Deutschland
Pipetus® accu-jet pro	Band GmbH, Wertheim, Deutschland
Pipetus®	NeoLab GmbH, Heidelberg, Deutschland
Multipette®olus	International, Frickenhausen, Deutschland
Pumpe (KNF Neuberger laborport, Typ N86KT18)	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Rotationsverdampfer (Rotavapor R)	BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen, Deutschland
Schüttelinkubator (Shaker 54 ELMI)	ELMI Ltd., Riga, Lettland
Sterilwerkband (Biowizard, Kojair Typ KR-130 BW)	Vilppula, Finnland
Thermomixer (Eppendorf Comfort)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trockenschrank (UNB 200)	Memmert GmbH Co KG, Schwabach, Deutschland
<u>UHPLC-Anlage: 1290 Infinity</u>	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

1290 Bin Pump G4220A

1290 Thermostat G1330B

1290 Sampler G4226A

1290 TCC G1316C

Ultraschallbad (Sonorex RK 100)	BANDELIN electronic GmbH & Co KG, Berlin, Deutschland
---------------------------------	---

Vakuumpumpe (Vacuubrand Drehschieber Ölpumpe)	Vacuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland
---	--

5. Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 48

Vortexer (Agitateur Top Mix 11118)	Bioblock Scientific, Freckendorf, Deutschland
<u>Waagen</u>	
Grobwaage (Sartorius CP 64-OCE)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Feinwaage (Sartorius CPA224S)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Ultrafeinwaage (Exellence Plus)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
<u>Wasserbad</u>	
GFL 1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
Julabo Modell EC	JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland
Zähler	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<u>Zentrifugen</u>	
Beckman Coulter Microfuge® R	Heraeus GmbH, Tuttingen, Deutschland
Biofuge Fresco	Heraeus GmbH, Tuttingen, Deutschland
Rotina 35	Hettich GmbH, Tuttingen, Deutschland
Multifuge 1L-R	Heraeus GmbH, Tuttingen, Deutschland
Multifuge 1.0R	Heraeus GmbH, Tuttingen, Deutschland

5.8.2 Reagenzien

Tabelle 49: Aufführung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Reagenzien.

Chemikalie	Hersteller/Lieferant
Aceton <i>p. a.</i>	VWR international, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril (MeCN) <i>LC-MS grade</i>	VWR international, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid (AA) <i>for molecular biology</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Acrylnitril <i>p. a.</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aktivkohle mit 10 % Pd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumacetat <i>LC-MS grade</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammonium-Natrium-Hydrogenphosphattetrahydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA, Rinderserumalbumin)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Fortsetzung Tabelle 49

n-Butanol <i>spectroscopy grade</i>	FisherChemical, Leuven, Belgien
Chloroform <i>p. a.</i>	FisherScientific, Loughborough, England
Collagenase 100 CDU/ml	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
2'-Desoxyguanosin (dG) <i>p. a.</i>	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
[¹⁵ N ₅]-Deoxyguanosine ([¹⁵ N ₅]dG)	Silantes GmbH, München, Deutschland
Deuteriumoxid (D ₂ O)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Diisopropylether <i>p. a.</i>	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
<i>N,N'</i> -Dimethylformamid (DMF) <i>p. a.</i>	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) <i>p. a.</i>	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Dimethylsulfoxid- <i>d</i> ₆ (DMSO- <i>d</i> ₆)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat <i>p. a.</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat <i>p. a.</i>	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium low glucose</i> (DMEM lg)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium high glucose</i> (DMEM hg)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) <i>p. a.</i>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> - tetraessigsäure (EGTA) für Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure <i>LC-MS grade</i>	FisherScientific, Geel, Belgien
Ethanol <i>p. a.</i>	ThGeyer, Renningen, Deutschland
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
GIBCO® DNase/RNase freies Wasser	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Heparin 1000U/ml	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
2- (4-(2- Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-	VWR, Leuven, Belgien
Ethansulfonsäure (HEPES) <i>p. a.</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hexan <i>p. a.</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Histopaque-1077®	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hydrogenphosphattetrahydrat <i>p. a.</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Fortsetzung Tabelle 49

Isoamylalkohol <i>p. a.</i>	Merck, Hohenbrunn, München
Isopropanol <i>p. a.</i>	FisherScientific, Loughborough, England
Kaliumiodid <i>p. a.</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kupfersulfat <i>p. a.</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid <i>p. a.</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfathydrat <i>p. a.</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat <i>p. a.</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid <i>p. a.</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natirumhydroxid <i>p. a.</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumiodid <i>p. a.</i>	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Natriumthiosulfat Pentahydrat <i>p. a.</i>	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Penicilin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Pentan <i>p. a.</i>	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Phenol equilibriert und stabilisiert	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K <i>p. a.</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Resazurin-Natriumsalz <i>suitable for cell culture</i>	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
RNase A <i>for molecular biology</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Saponin <i>for molecular biology</i>	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS) <i>ultrapure</i>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Stärke	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Tetrahydrofuran (THF) <i>p. a.</i>	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
TRIS cellpur <i>p. a.</i>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X-100 <i>p. a.</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Wasserstoffperoxid (30 %)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

5.8.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 50: Aufführung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Einwegspritzen (Discard, 2; 5; 10 und 50 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Einwegkanülen	VWR international, Darmstadt, Deutschland
Einwegpipetten (5; 10 und 25 ml)	VWR international, Darmstadt, Deutschland
Falcons (15 und 50 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Faltenpapier	NeoLab GmbH, Heidelberg, Deutschland
Gewebekulturschalen (100 mm)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
HPLC-Vials	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Mikro-Inserts (300 µl)	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Mikro-Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Mikrotiterplatten (24-Well)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Schraubenkappen für Kurzgewindefl.	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Schraubenvials Braunglas (2 ml)	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-one; Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugalfiltereinheiten (PES 3K 500 µl, VWR)	VWR international, Darmstadt, Deutschland

6. Quellenverzeichnis

- 2013/647/EU**, Europäische Kommission. Empfehlung der Kommission vom 8. November 2013 zur Untersuchung des Acrylamidgehalts von Lebensmitteln.
- Aktorics K**, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K (2017). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 12. Auflage, Urban und Fischer Verlag, Elsevier GmbH, München, S. 42–46, S. 636.
- Alexandre E**, David P, Viollon C, Wolf P, Jaeck D, Azimzadeh A, Nicod L, Boudjema K, Richert L (1999). Expression of Cytochromes P-450 2E1, 3A4 and 1A1/1A2 in Growing and Confluent Human HepG2 Hepatoma Cells-Effect of Ethanol. *Toxicology in Vitro*, 13 (3): 427–435.
- American Diabetes Association** (2017). Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, 40 (1): 11–24.
- Amrein TM**, Schönbacher B, Rohner F, Lukac H, Schneider H, Keiser A, Escher F, Amadò R (2004). Potential for acrylamide formation in potatoes: data from the 2003 harvest. *European Food Research and Technology*, 219 (6): 572–578.
- Amrein TM**, Schönbacher B, Escher F, Amadò R (2004). Acrylamide in gingerbread: critical factors for formation and possible ways for reduction. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52 (13): 4282–4288.
- Angerer J**, Rettenmeier AW, Sabbioni G (2008). Internal Exposure and Haemoglobin Adducts. *Biological monitoring*. Oxford: Wiley. 5–3.
- Atamna H**, Cheung I, Ames BN (2000). A method for detecting abasic sites in living cells: Age-dependent changes in base excision repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (2): 686–691.
- ATSDR** (Agency for toxic Substances and Disease Registry) (2012). Toxicological profile of acrylamide. US Department of Health and Human Services. Public Health Service. December 2012. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp203.pdf>.
- 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. *Mutation Research*, 580 (1-2): 61–69.
- Besaratinia, Pfeifer GP** (2005). DNA adduction and mutagenic properties of acrylamide. *Mutation Research*, 580 (1-2): 31–40.
- Becalski A**, Lau BP-Y, Lewis D, Seaman SW (2003). Acrylamide in Foods: Occurrence, Sources, and Modeling. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51 (3): 802–808.
- Beland FA**, Mellick PW, Olson GR, Mendoza MCB, Marques MM, Doerge DR (2013). Carcinogenicity of acrylamide in B6C3F₁ mice and F344/N rats from a 2-year drinking water exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 51: 149–159.

- Berenblum I, Shubik P (1947).** A new, quantitative, approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's Skin. *British Journal of Cancer*, 1 (4): 383–391.
- Berger FI, Franz J, Bertow D, Eisenbrand G, Fricker G, Gerhardt N, Merz KH, Richling E, Baum M (2011).** Biological effects of acrylamide after daily ingestion of various foods in comparison to water: A study in rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55 (3): 387–399.
- Bergmark E (1997).** Hemoglobin Adducts of Acrylamide and Acrylonitrile in Laboratory Workers, Smokers and Nonsmokers. *Chemical Research in Toxicology*, 10 (1): 78–84.
- BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung (2010).** Leitfaden für gesundheitliche Bewertungen. Verfügbar auf:
<https://mobil.bfr.bund.de/cm/350/leitfaden-fuer-gesundheitliche-bewertungen.pdf>
- BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung),** Acylamid in Lebensmitteln, Stellungnahme Nr. 043/2011 des BfR vom 29. Juni 2011, ergänzt am 21. Januar 2013.
- BGBl, Bekanntmachung des Umweltbundesamtes, AA und Human Biomonitoring (2008),** Stellungnahme der Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes, *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 51: 98–108.
- Bjellaas T, Janák K, Lundanes E, Kronberg L, Becher G (2005).** Determination and quantification of urinary metabolites after dietary exposure to acrylamide. *Xenobiotica*, 35 (10–11): 1003–1018.
- Bjellaas T, Stølen LH, Haugen M, Paulsen JE, Alexander J, Lundanes E, Becher G (2007a).** Urinary acrylamide metabolites as biomarkers for short-term dietary exposure to acrylamide. *Food and Chemical Toxicology*, 45 (6): 1020–1026.
- Bjellaas T, Olesen PT, Frandsen H, Haugen M, Stølen LH, Paulsen Je, Alexander J, Lundanes E, Becher G (2007b).** Comparison of estimated dietary intake of acrylamide with hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide. *Toxicological Science*, 98 (1): 110–117.
- Boettcher MI, Schettgen T, Kütting B, Pischetsrieder M, Angerer J (2005).** Mercapturic acids of acrylamide and glycidamide as biomarkers of the internal exposure to acrylamide in the general population. *Mutation Research*, 580 (1–2): 167–176.
- Boettcher MI, Angerer J (2005).** Determination of the major mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science*, 824 (1–2): 283–294.
- Boettcher MI, Bolt HM, Drexler H, Angerer J (2006).** Excretion of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine after single oral administration of deuterium-labelled acrylamide. *Archives of Toxicology*, 80 (2): 55–61.
- Boogaard PJ (2002).** Use of haemoglobin adducts in exposure monitoring and risk assessment. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 778 (1–2): 309–322.

- Boutwell RK (1964)**. Some biological aspects of skin carcinogenesis. *Progress in Tumor Research*, 4: 207–250.
- Buselmaier W (2015)**. Biologie für Mediziner. 13. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg, S. 101–103.
- Buszewski B, Noga S (2012)**. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) –a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402 (1): 231-247.
- Burek JD, Albee RR, Beyer JE, Bell TJ, Carreon RM, Morden DC, Wade CE, Hermann EA, Gorzinski SJ (1980)**. Subchronic toxicity of acrylamide administered to rats in the drinking water followed by up to 144 days of recovery. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, 4 (5–6): 157–182.
- Burtis CA, Bruns DE (2015)**. Tietz Fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics, 7. Auflage, St-Loius, Saunders-Verlag, Elsevier GmbH, S. 211–212.
- Butterworth BE, Eldridge SR, Sprankle CS, Working PK, Bentley KS, Hurtt ME (1992)**. Tissue-specific genotoxic effects of acrylamide and acrylonitrile. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 20 (3): 148–155.
- Boysen G, Pachkowski BF, Nakamura J, Swenberg JA (2009)**. The formation and biological significance of N7-guanine adducts. *Mutation Research*, 678 (2): 76–94.
- Calleman CJ, Wu Y, Tian G, Bergmark E, Zhang S, Deng H, Crofton KM, Fennell T, Costa LG (1994)**. Relationships between biomarkers of exposure and neurological effects in a group of workers exposed to acrylamide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 126 (2): 361–371.
- Chen L, Wang M, Villalta PW, Hecht, SS (2007)** Liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of 7-ethylguanine in human liver DNA. *Chemical Research in Toxicology*, 20 (10): 1498–1502.
- Cheng G, Wang M, Villalta PW, Hecht SS (2010)** Detection of 7-(2'-carboxyethyl)guanine but not 7-carboxymethylguanine in human liver DNA. *Chemical Research in Toxicology*, 23 (6): 1089–1096.
- Chowdhury G, Calcutt MW, Nagy LD, Guengerich FP (2012)**. Oxidation of methyl and ethyl nitrosamines by cytochrome P450 2E1 and 2B1. *Biochemistry*, 51 (50): 9995–10007.
- Czekaj P, Wiaderkiewicz A, Florek E, Wiaderkiewicz R (2005)**. Tobacco smoke-dependent changes in cytochrome P450 1A1, 1A2, and 2E1 protein expressions in fetuses, newborns, pregnant rats, and human placenta. *Archives of Toxicology*, 79 (1): 13–24.
- De Bont R, Van Larebeke N (2004)**. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*, 19 (3): 169–185.
- De Vleeschouwer K, Van der Plancken I, Van Loey A, Hendrickx ME (2006)**. Impact of pH on the kinetics of acrylamide formation/elimination reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (20): 7847–7855.

- Diekmann J**, Wittig A, Stalbbert R (2008). Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of acrylamide and acetamide in cigarette mainstream smoke after on-column injection. *Journal of Chromatographic Science*, 46 (7): 659–663.
- Ding C**, Li Y, Guo F, Jiang Y, Ying W, Li D, Yang D, Xia X, Liu W, Zhao Y, He Y, Li X, Sun W, Liu Q, Song L, Zhen B, Zhang P, Qian X, Qin J, He F (2016). A Cell-type resolved Liver Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15 (10): 3190–3202.
- Doak SH**, Jenkins GJ, Johnson GE, Quick E, Parry EM, Parry JM (2007). Mechanistic influences for mutation induction curves after exposure to DNA-Reactiven carcinogens. *Cancer Research*, 67 (8): 904–3911.
- Doak SH**, Brüsehafer K, Dudley E, Quick E, Johnson G, Newton RP, Jenkins GJ (2008). No-observed effect levels are associated with up-regulation of MGMT following MMS exposure. *Mutation Research*, 648 (1–2): 9–14.
- Dobrzynska MM** (2007). Assessment of DNA damage in multiple organs from mice exposed to X-rays or acrylamide or a combination of both using the comet assay. *In Vivo*, 21 (4): 657–662.
- Doerge DR**, Young JF, McDaniel LP, Twaddle NC, Churchwell MI (2005a). Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in B6C3F1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202 (3): 258–67.
- Doerge DR**, Young JF, McDaniel LP, Twaddle NC, Churchwell MI (2005b). Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 208 (3): 199–209.
- Doerge DR**, Gamboa da Costa G, McDaniel LP, Churchwell MI, Twaddle NC, Beland FA (2005c). DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats. *Mutation Research*, 50 (1–2): 131–141.
- Doerge DR**, Young JF, Chen JJ, DiNovi MJ, Henry SH (2007): Urinary excretion of acrylamide and metabolites in Fisher 344 rats and B6C3F(1) mice administered a single dose of acrylamide. *Toxicology Letters*, 169 (1): 34–42.
- Doroshenko O**, Fuhr U, Kunz D, Frank D, Kinzig M, Jetter A, Reith Y, Lazar A, Taubert D, Kirchheiner J (2009). In vivo role of cytochrome P450 2E1 and glutathione-S-transferase activity for acrylamide toxikokineticsin humans. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18 (2), 433–443.
- Duale N**, Bjellaas T, Alexander J, Becher G, Haugen M, Paulsen JE, Frandsen H, Olesen PT, Brunborg G (2009). Biomarkers of human exposure to acrylamide and relation to polymorphisms in metabolizing genes. *Toxicological Science*, 108 (1): 90–99.
- Duda-Chodak A**, Tarko T, Sroka P, Satora P (2016). A review of the interactions between acrylamide, microorganisms and food components. *Food and Function*, 7 (3): 1282–1295.
- Efferth T** (2006) *Molekulare Pharmakologie und Toxikologie*; 1. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, S. 157 und S. 183-185.

- EFSA**, European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain (2015). Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*, 13 (6): 4104.
- Ehrenberg L, Hussain S (1981)**. Genetic toxicity of some important epoxides. *Mutation Research*, 86 (1): 1–113.
- Eisenbrand G, Metzler M (2005)**. Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner. 3. Auflage, Wiley-VCH-Verlag, Weinheim, S. 8-29.
- Engels C**, Schwab C, Zhang J, Stevens MJ, Bieri C, Ebert M-O, McNeill K, Sturla SJ, Lacroix C (2016). Acrolein contributes strongly to antimicrobial and heterocyclic amine transformation activities of reuterin. *Scientific reports*, 6.
- Europäische Kommission (2003)**, Technical Guidance Document on Risk Assessment. European Commission Joint Research Centre, Brussels.
- FAO/WHO** (Food and Agricultural Organisation of the United Nations/ World Health Organisation), (2006). Safety evaluation of certain Contaminants in food. Prepared by the Sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). FAO Food and Nutrition Paper/ WHO Food Additives Series. 82/55.
- FAO/WHO** (Food and Agricultural Organisation of the United Nations/ World Health Organisation), (2011). Safety evaluation of certain Contaminants in food. Prepared by the Seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). FAO JECFA Monographs/WHO Foods Additives Series. 8/23.
- Feld J (2010)** Dissertationsarbeit: Charakterisierung der DNA-schädigenden Wirkung von Acrylamid in Lebensmitteln am Model der Ratte, S. 123-126.
- Fennell TR**, Sumner SC, Snyder RW, Burgess J, Spicer R, Bridson WE, Friedman MA (2005). Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicological Science*, 85 (1): 447–459.
- Fennell TR**, Sumner SC, Snyder RW, Burgess J, Friedman MA (2006). Kinetics of elimination urinary metabolites of acrylamide in humans. *Toxicological Science*, 93 (2): 256–267.
- Fennell TR, Friedman MA (2005)**. Comparison of acrylamide metabolism in humans and rodents. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 561: 109–116.
- Fischer M, Glomb M (2015)**. Moderne Lebensmittelchemie. 1. Auflage, Behrs-Verlag GmbH, Hannover, S. 683.
- Fletcher H**, Hickey I, Horstmann C (2013). Genetik. Für Biologen, Biochemiker, Pharmazeuten und Mediziner, 1. Auflage, Wiley-VCH-Verlag, Weinheim, S.5.
- Fontaine DA, Davis DB (2016)**. Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium. *Diabetes*, 65 (1): 25–33.
- Friedman MA**, Dulak LH, Stedham MA (1995). A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide. *Toxicological Science*, 27 (1): 95–105.

- Fuhr U**, Boettcher MI, Kinzig-Schippers M, Weyer A, Jetter A, Lazar A, Taubert D, Tomalik-Scharte D, Tomalik-Scharte D, Pournara P, Jakob V, Harlfinger S, Klaassen T, Berkessel A, Angerer J, Sörgel F, Schömig 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 Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 15 (2): 266–271.
- Fullerton PM, Barnes J (1966)**. Peripheral neuropathy in rats produced by acrylamide. *British Journal of Industrial Medicine*, 23 (3): 210–221.
- Gamboa da Costa G**, Churchwell MI, Hamilton LP, Von Tungeln LS, Beland FA, Marques MM, Doerge DR (2003). DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice. *Chemical Research Toxicology*, 16 (10): 1328–1337.
- Ganten D, Ruckpaul K (2012)**. Tumorerkrankungen, Band 2, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, S. 27–28.
- Gates KS (2009)**. An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. *Chemical Research Toxicology*, 22 (11): 1747–1760.
- Gefahrstoffverordnung (GefStoffV)**, Verordnung zum Schutz von Gefahren; Stand April 2017.
- Gey (2015)** Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen. 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 140–141.
- Gertz CSK (2002)**. Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *European Journal of Lipid Science Technology*, 104 (11): 762–771.
- Ghanayem BI**, McDaniel LP, Churchwell MI, Twaddle NC, Snyder R, Fennel TR, Doerge DR (2005a). Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and the formation of DNA and hemoglobin adducts. *Toxicological Sciences*, 88 (2): 311–318.
- Ghanayem BI**, Witt KL, El-Hadri L, Hoffler U, Kissling GE, Shelby MD, Bishop JB (2005b). Comparison of germ cell mutagenicity in male CYP2E1-null and wild-type mice treated with acrylamide: evidence supporting a glycidamide-mediated effect. *Biology of Reproduction*, 72 (1): 157–163.
- Giannerini F**, Giustarini D, Lusini L, Rossi R and Di Simplicio P (2001). Responses of thiols to an oxidant challenge: differences between blood and tissues in the rat. *Chemico-Biological Interactions*, 134 (1): 73–85.
- Glatt H**, Engelke CE, Pabel U, Teubner W, Jonas AL, Coughtrie MW, Andrae U, Falancy CN, Meinel W (2000). Sulfotransferases: genetics and role in toxicology. *Toxicology Letters*, 112–113: 341–348.
- Goempel K**, Tedsen L, Ruenz M, Bakuradze T, Schipp D, Galan J, Eisenbrand G, Richling E (2017). Biomarker monitoring of controlled dietary acrylamide exposure indicates consistent human endogenous background. *Archives of Toxicology*, 91 (11): 3551–3560.

- Gomes R, Meek ME, Eggleton M (2002).** Concise International Chemical Assessment. Document No. 43, World Health Organization, Geneva, Switzerland, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH, Stuttgart, S. 49.
- Granvogl M, Schieberle P (2006).** Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (16): 5933–5938.
- Greim H, Snyder R (2008).** Toxicology and risk assessment: A comprehensive introduction. John Wiley & Sons, Chichester, England, Hoboken, S. 10–12.
- Greim H, Albertini RA (2015).** Zur Frage einer unwirksamen Dosis genotoxischer Agenzien. *ASU Arbeitsmedizin Sozialmedizin Umweltmedizin*, 50: 896–903.
- Greim H (2017).** Das Toxikologiebuch, 1. Auflage, Wiley-VCH-Verlag, Weinheim, S. 104 und 150–159.
- Groom CR, Bruno IJ, Lightfoot MP, Ward SC (2016).** The Cambridge Structural Database. *Acta Crystallographica Section B*, 72: 171–179.
- Gupta RC, Lutz WK (1999).** Background DNA damage for endogenous and unavoidable exogenous carcinogens: A basis for spontaneous cancer incidence?. *Mutation Research*, 424 (1-2): 1-8.
- Hagmar L, Törnqvist M, Nordander C, Rosén I, Bruze M, Kautiainen A, Magnusson AL, Malmberg B, Aprea P, Granath F, Axmon A (2001).** Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scandinavian Journal of Work, Environmental and Health*, 27 (4): 219–226.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000).** The hallmarks of cancer. *Cell*, 100 (1): 57–70.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011).** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144 (5): 646–674.
- Hartmann EC, Boettcher MI, Schettgen T, Drexler H, Angerer J (2008).** Hemoglobin adducts and mercapturic acid excretion of acrylamide and glycidamide in one study population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (15): 6061–6068.
- Hartmann EC, Latzin JM, Schindler BK, Koch HM, Angerer J (2011).** Excretion of 2,3-dihydroxypropionamide (OH-PA), the hydrolyses product of glycidamide, in human urine after single oral dose of deuterium labeled acrylamide. *Archives of Toxicology*, 85 (6): 601–606.
- Hashimoto K, Aldridge W (1970).** Biochemical studies on acrylamide, a neurotoxic agent. *Biochemical Pharmacology*, 19 (9): 2591–2604.
- Hashimoto H, Tanii H (1985).** Mutagenicity of acrylamide and its analogues in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*, 158 (3): 129–133.
- Heidemann C, Du Y, Schubert I, Rathmann W, Scheidt-Nave C (2013).** Prevalence and temporal trend of known diabetes mellitus: results of the German Health Interview and Examination Survey

- for Adults (DEGS1). Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 56 (5–6): 668–677.
- Henderson L**, Alberini S, Aerdema M (2000). Thresholds in genotoxicity response. *Mutation Research*, 464 (1): 123–128.
- Hick C, Hick A** (2013). Kurzlehrbuch Physiologie. 7. Auflage, Urban und Fischer Verlag, Elsevier GmbH. S. 270 und 467.
- Huang CC**, Li CM, Wu CF, Jao SP, Wu KY (2007). Analysis of urinary N-acetyl-S-(propionamide)-cysteine as a biomarker for the assessment of acrylamide exposure in smokers. *Environmental Research*, 104 (3): 346–351.
- Huang CC**, Wu CF, Shih WC, Luo YS, Chen MF, Li CM, Liou SH, Chung WS, Chiang SY, Wu KY (2015). Potential Association of Urinary N7-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl) Guanine with Dietary Acrylamide Intake of Smokers and Nonsmokers. *Chemical Research in Toxicology*, 28 (1): 43–50.
- Hukkanen J**, Jacob P III, Peng M, Dempsey D, Benowitz NL (2010). Effects of nicotine on cytochrome P450 2A6 and 2E1 activities. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 69 (2): 152–159.
- Hummel KP**, Dickie MM, Coleman DL (1966). Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science*, 153 (3740): 1127–1128.
- IARC**, International Agency for Research on Cancer (1994). Some Industrial Chemicals. Acrylamide. Summary of data reported and Evaluation. IARC Monographs on the Evaluations of Carcinogenic Risks to Human. S.60.
- IARC**, International Agency for Research on Cancer (2004). Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 83, 1–1438.
- IFA**, Institut für Arbeitsschutz der Deutschen gesetzlichen Unfallversicherung (2017). GESTIS-Stoffdatenbank, Gefahrstoffinformationssystem der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung. www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank/.
- Ishii Y**, Matsushita K, Kuroda K, Yokoo Y, Kijima A, Takasu S, Kodama Y, Nishikawa A, Umemura T (2015). Acrylamide induces specific DNA adduct formation and gene mutations in a carcinogenic target site, the mouse lung. *Mutagenesis*, 30 (2): 227–235.
- Janvier 2017:**
https://www.janvier-labs.com/tl_files/_media/images/Fiches_DE/RESEARCH-MODEL-WISTAR-DE.pdf
https://www.janvier-labs.com/tl_files/_media/images/Fiches_DE/RESEARCH-MODEL-C57BL6JRj-DE.pdf
https://www.janvier-labs.com/tl_files/_media/images/Fiches_DE/RESEARCH-MODEL-DIABETIC-DE.pdf

- Yamagishi S, Matsui T (2010).** Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3 (2): 101–108.
- Yener M, Dikmenli M (2009).** Increased micronucleus frequency in rat bone marrow after acrylamide treatment. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (8): 2120–2123.
- IARC (1993)** Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 56: 1–599.
- Jarabek AM, Pottenger LH, Andrews LS, Casciano D, Embry MR, Kim JH, Preston RJ, Reddy MV, Schoeny R, Shuker D, Skare J, Swenberg J, Williams GM, Zeiger E. (2009).** Creating context for the use of DNA adduct data in cancer risk assessment: I. Data organization. *Critical Reviews in Toxicology*, 39 (8), 659–678.
- Jenkins GJS, Doak SH, Johnson GE, Qucik E, Waters EM, Parry JM (2005).** Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylation agents?. *Mutagenesis*, 20 (6): 389–398.
- Jenkins GJ, Zair Z, Johnson GE, Doak SH (2010).** Genotoxic thresholds, DNA repair, and susceptibility in human populations. *Toxicology*, 278 (3): 305–310.
- Jiang L, Cao J, An Y, Geng C, Qu S, Jiang L, Zhong L (2007).** Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (HepG2) cells. *Toxicology in vitro*, 21 (8): 1486–1492.
- Johnson KA, Gorzinski SJ, Bodner KM, Campbell RA, Wolf CH, Friedman MA, Mast RW (1986).** Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 85 (2): 154–168.
- Jung MY, Choi DS, Ju JW (2003).** A Novel Technique for Limitation of Acrylamide Formation in Fried and Baked Corn Chips and in French Fries. *Journal of Food Science*, 68 (4): 1287–1290.
- Kadry AM, Friedman MA, Abdel-Rahman MS (1999).** Pharmacokinetics of acrylamide after oral administration in male rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 7 (2): 127–133.
- Kahaly GJ, Hansen MP (2016).** Type 1 diabetes associated autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 15 (7): 644–648.
- Kahl R, Timm J (2003).** Risikobewertung. Der Beitrag der Wissenschaft zum Umgang mit den Risiken durch chemische Stoffe. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz. 46 (5): 371–377.
- Katic J, Cemeli E, Baumgartner A, Laubenthal J, Bassano I, Stølevik SB, Granum B, Namork E, Nygaard UC, Løvik M, van Leeuwen D, Vande Loock K, Anderson D, Fucić A, Decordier I (2010).** Evaluation of the genotoxicity of 10 selected dietary/environmental compounds with the in vitro micronucleus cytokinesis-block assay in an interlaboratory comparison. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (10): 2612–2623.
- Kellert M, Scholz K, Wagner S, Dekant W, Völkel W (2006).** Quantitation of mercapturic acids from acrylamide and glycidamide in human urine using a column switching tool with two trap

- columns and electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1131 (1–2): 58–66.
- Kiefel PDV (2010)**. Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen-Therapie-Methodik. 4. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg, S. 32–34 und 68–70.
- Kim TH**, Shin S, Kim KB, Seo WS, Shin JC, Choi JH, Weon KY, Joo SH, Jeong SW, Shin BS (2015). Determination of acrylamide and glycidamide in various biological matrices by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. *Talanta*, 131: 46–54.
- Kleiveland CR (2015)**. Peripheral Blood Mononuclear Cells. The impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models. 1. Auflage Springer-Verlag, Heidelberg, S. 15.
- Konsue N, Ioannides C (2008)**. Tissue differences in the modulation of rat cytochromes P450 and phase II conjugation systems by dietary doses of phenethyl isothiocyanate. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (12): 3677–3683.
- Koyama N**, Yasui M, Kimura A, Takami S, Suzuki T, Masumura K, Nohmi T, Masuda S, Kinae N, Matsuda T, Imai T, Honma M (2011a). Acrylamide genotoxicity in young versus adult gpt delta male rats. *Mutagenesis*, 26 (4): 545–549.
- Koyama N**, Yasui M, Oda Y, Suzuki S, Satoh T, Suzuki T, Matsuda T, Masuda S, Kinae N, Honma M (2011b). Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 52 (1): 12–19.
- Kotova N**, Jurén T, Myöhänen K, Cornelius M, Abramsson-Zetterberg L, Backman J, Menzel U, Rydberg P, Kronberg L, Vähäkangas K, Segerbäck D (2011). ³²P-HPLC analysis of N1-(2-carboxy-2-hydroxyethyl)deoxyadenosine: a DNA adduct of the acrylamide-derived epoxide glycidamide. *Toxicology Letters*, 207 (1): 18–24.
- Koskinen M, Plná K (2000)**. Specific DNA adducts induced by some mono-substituted epoxides in vitro and in vivo. *Chemco-Biological Interactions*, 129 (3): 209–229.
- Kraus D**, Rokitta D, Fuhr U, Tamalik-Scharte D (2013). The role of human cytochrome P450 enzymes in metabolism of acrylamide in vitro. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23 (5): 346–351.
- Kumar V**, Cotran RS, Robbins SL (2017). Robbins basic pathology. 10. Auflage, Saunders-Verlag, Philadelphia, S. 189–243.
- Kurebayashi H, Ohno Y (2006)**. Metabolism of acrylamide to glycidamide and their cytotoxicity in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors. *Archives of Toxicology*, 80 (12): 820–828.
- Kurtz DM**, Glascoe R, Caviness G, Locklear J, Whiteside T, Ward T, Adsit F, Lih F, Deterding LJ, Churchwell MI, Doerge DR, Kissling GE (2018). Acrylamide production in autoclaved rodent feed. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 57 (6): 1–9.

- Kohlmann J, Röhm KH (2009)**, Taschenatlas Biochemie des Menschen. 4. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, S. 64–71.
- Kopp EK, Dekant W (2009)**. Toxicokinetics of acrylamide in rats and humans following single oral administration of low doses. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 235 (2): 135–142.
- Koyama N**, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Takashima Y, Hayashi M, Matsufuji H, Yamagata K, Masuda S, Kinae N, Honma M (2006). Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in humanlymphoblastoid TK6 cells. *Mutation Research*, 603 (2): 151–158.
- Koyama N**, Yasui M, Kimura A, Takami S, Suzuki T, Masumura K, Nohmi T, Masuda S, Kinae N, Matsuda T, Imai T, Honma M (2011). Acrylamide genotoxicity in young versus adult gpt delta male rats. *Mutagenesis*, 26 (4): 545–549.
- Krebs O, Favor J (1997)**. Somatic and germ cell mutagenesis in lambda lacZ transgenic mice treated with acrylamide or ethylnitrosourea. *Mutation Research*, 338 (1–2): 239–248.
- Krokan HE, Bjørås M (2013)**. Base Excision Repair. *Cold Spring Harb Perspectives in Biology*, 5(4): a012583.
- Kütting B**, Schettgen T, Schwegler U, Fromme H, Uter W, Angerer J, Drexler H (2009). Acrylamide as environmental noxious agent: a health risk assessment for the general population based on the internal acrylamide burden. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212 (5): 470–480.
- Langley-Evans SC**, Phillips GJ, Jackson AA (1996). Sulphur dioxide: a potent glutathione depleting agent. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology*, 114 (2): 89–98.
- Larson K**, Sahm J, Shenkar B, Stauss B (1985). Methylation-induced blocks to in vitro DNA replication. *Mutation Research*, 150 (1–2): 77–84.
- Lee JH**, Lee KJ, Ahn R, Kang HS (2014). Urinary concentrations of acrylamide (AA) and N-acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)-cysteine (AAMA) and associations with demographic factors in the South Korean population. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217 (7): 751–757.
- Li CM**, Hu CW, Wu KY (2005). Quantification of urinary N-acetyl-S-(propionamide)cysteine using an on-line clean-up system coupled with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 40 (4): 511–515.
- Lindl T, Gstraunthaler G (2013)**. Zell und Gewebekultur. 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 122.
- Latzin JM**, Schindler BK, Weiss T, Angerer J, Koch HM (2012). Determination of 2,3-dihydroxypropionamide, an oxidative metabolite of acrylamide, in human urine by gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402 (7): 2431–2438.

- Luttmann W**, Bratke K, Küpper M, Myrtek D (2014). Der Experimentator: Immunologie. 4. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg, S. 52–63.
- Mei N**, McDaniel LP, Dobrovolsky VN, Guo X, Shaddock JG, Mittelstaedt RA, Azuma M, Shelton SD, McGarrity LJ, Doerge DR, Heflich RH (2010). The genotoxicity of acrylamide and glycidamide in bigblue rats. *Toxicological Science*, 115 (2): 412–421.
- Ma Y**, Shi J, Zheng MG, Lui J, Titan SM, He XH, Zhang DX, Li GY, Zhu JY (2011). Toxicological effects of acrylamide on the reproductive system of weaning male rats. *Toxicology and Industrial Health*, 27 (7): 617–627.
- Manière I**, Godard T, Doerge DR, Mona I, MI Churchwell, Guffroy M, Laurentie M, Poul J-M (2005). DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide. *Mutation Research*, 580: 119–129.
- Manjanatha MG**, Aidoo A, Shelton SD, Bishop ME, McDaniel LP, Lyn-Cook LE, Doerge DR (2006). Genotoxicity of acrylamide and its metabolite glycidamide administered in drinking water to male and female Big Blue mice. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47 (1): 6–17.
- Manjanatha MG**, Gou LW, Shelton SD, Doerge DR (2015). Acrylamide-induced carcinogenicity in mouse lung involves mutagenicity: cll gene mutations in the lung of big blue mice exposed to acrylamide and glycidamide for up to 4 weeks. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 26 (5): 446–456.
- Mao HZ**, Roussos ET, Péterfy M (2006). Genetic analysis of the diabetes-prone C57BLKS/J mouse strain reveals genetic contribution from multiple strains. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1762 (4): 440–446.
- Maronpot RR**, Thoolen RJ, Hansen B (2015). Two-year carcinogenicity study of acrylamide in Wistar Hanrats with in utero exposure. *Experimental and Toxicologic pathology*, 67 (2): 189–195.
- Marquardt H**, Schäfer SG, Barth H (2013), Toxikologie. 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, S. 89–115, 137 und 1182.
- Marsden DA**, Jones DJL, Lamb JH, Tompkins EM, Farmer PB, Brown K (2007). Determination of endogenous and exogenously derived N7-(2-Hydroxyethyl)guanine adducts in ethylene oxide-treated Rats. *Chemical Research in Toxicology*, 20 (22): 90–299.
- Martins C**, Oliveira NG, Pingarilho M, Gamboa da Costa G, Martins V, Marques MM, Beland FA, Churchwell MI, Doerge DR, Rueff J, Gaspar JF (2007). Cytogenetic damage induced by acrylamide and glycidamide in mammalian cells. *Toxicological Science*, 95 (2): 383–390.
- Matissek R**, Steiner G, Fischer M (2014). Lebensmittelanalytik. 5 Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 64–67.
- McCollister D**, Oyen F and Rowe VK (1964). Toxicology of Acrylamide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 6 (2): 172–181.

- Mei N**, McDaniel LP, Dobrovolsky VN, Guo X, Shaddock JG, Mittelstaedt RA, Azuma M, Shelton SD, McGarrity LJ, Doerge DR, Heflich RH (2010). The genotoxicity of acrylamide and glycidamide in big blue rats. *Toxicological Sciences*, 115 (2): 412–421.
- Micu AL**, Miksys S, Sellers EM, Koop DR, Tyndale RF (2003). Rat hepatic CYP2E1 is induced by very low nicotine doses: an investigation of induction, time course, dose response, and mechanism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 306 (3): 941–947.
- Miller MJ**, Carter DE, Sipes, IG (1982). Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 63 (1): 36–44.
- Mohsin Ali M**, Kurisu S, Yoshioka Y, Terato H, Ohyama Y, Kubo K, Ide H (2004). Detection of endonuclease III- and 8-oxoguanine glycosylase-sensitive base modifications in γ -Irradiated DNA and cells by the aldehyde reactive probe (ARP) assay. *Journal of Radiation Research*, 45 (2): 229–237.
- Mojska H**, Gielecińska I, Cendrowski A (2016). Acrylamide content in cigarette mainstream smoke and estimation of exposure to acrylamide from tobacco smoke in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23 (3): 456–461.
- Mottram DS**, Wedzicha BL, Dodson AT (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction, *Nature*, 419 (6906): 448–449.
- Mülhardt C** (2013). Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. 7. Auflage, Heidelberg, Spektrum, S. 26–29 und 35–38.
- Nakamura J, Swenberg JA** (1999). Endogenous apurinic/aprimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues. *Cancer Research*, 59: 2522–2526.
- Navasumrit P**, Ward TH, O'Connor PJ, Nair J, Frank N, Bartsch H (2001). Ethanol enhances the formation of endogenously and exogenously derived adducts in rat hepatic DNA. *Mutation Research*, 479 (1–2): 81–94.
- Nordheim A, Knippers R** (2014) Molekulare Genetik. 10. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart S.29–32.
- NTP** (National Toxicology Program) (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). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health. Report Nummer: TR 575.
- 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/FEBS*, 267 (17): 5421–5426.
- Omiecinski, CJ**, Aicher L, Holubkov R, Checkoway H (1993). Human peripheral lymphocytes as indicators of microsomal epoxide hydrolase activity in liver and lung. *Pharmacogenetics*, 3 (3): 150–158.

- Paulsson B**, Athanassiadis I, Rydberg P, Tornqvist M (2003). Hemoglobin adducts from glycidamide: acetonization of hydrophilic groups for reproducible gas chromatography/tandem mass spectrometric analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17: 1859–1865.
- Payne GB, Williams PH (1961)**. Reaction of Hydrogen Peroxide. VI alkaline Epoxidation of Acrylonitril. *The Journal of Organic Chemistry* 26: 651–659.
- Pedreschi F**, Kaack K, Granby K (2004). Reduction of acrylamide formation in potato slices during frying. *LWT-Food Science and Technology*, 37 (6): 386–392.
- Pelucchi C**, Bosetti C, Galeone C, La Vecchia C (2015). Dietary acrylamide and cancer risk: an updated meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 136 (12): 2912–2922.
- Philippin G**, Cadet J, Gasparutto D, Mazon G, Fuchs RP (2014). Ethylene oxide and propylene oxide derived N7-alkylguanine adducts are bypassed accurately in vivo. *DNA Repair*, 22: 133–136.
- Phillips DH, Venitt S (2012)**. DNA and protein adducts in human tissues resulting from exposure to tobacco smoke. *International Journal on Cancer*, 131 (12), 2733–2753.
- Pingarilho M**, Oliveira NG, Martins C, Gomes BC, Fernandes AS, Martins V, Labilloy A, de Lima JP, Rueff J, Gaspar JF (2013). Induction of sister chromatid exchange by acrylamide and glycidamide in human lymphocytes: role of polymorphisms in detoxification and DNA-repair genes in the genotoxicity of glycidamide. *Mutation Research*, 752 (1–2): 1–7.
- Pottenger L**, Penman M, Moore N, Priston RA, Thomas M (2004). Biological significance of DNA adducts: summary of discussion of expert panel. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39 (3): 403–408.
- Pourentezari M**, Talebi A, Abbasi A, Khalili MA, Mangoli E, Anvari M (2014). Effects of acrylamide on sperm parameters, chromatin quality, and the level of blood testosterone in mice. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 12 (5): 335–342.
- Raucy JL**, Ingelman-Sundberg M, Carpenter S, Rannug A, Rane A, Franklin M, Romkes M (1999). Drug metabolizing enzymes in lymphocytes. *Journal of Biochemical Molecular Toxicology*, 13 (3–4): 223–226.
- Rajeh N**, Saggaf S, Ayuob N, ElAssouli S (2011). Characterization of acrylamide mediated testicular toxicity in rat: light and electron microscopic study. *Kuwait Medical Journal*, 43 (3): 196–205.
- Rhee SY, Kim YS (2018)**. The Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Vascular Complications. *Diabetes & Metabolism Journal*, 42 (3): 188–195.
- Richtlinie 98/83/EG** des Rates vom 3. November 1998 über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch.
- Rothfuss A**, O'Donovan M, De Boeck M, Brault D, Czich A, Custer L, Hamada S, Plappert-Helbig U, Hayashi M, Howe J, Kraynak AR, van der Leede BJ, Nakajima M, Priestley C, Thybaud V, Saigo K, Sawant S, Shi J, Storer R, Struwe M, Vock E, Galloway S (2010). Collaborative study on

- fifteen compounds in the rat-liver Cometassay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies. *Mutation Research*, 702 (1): 40–69.
- Ruenz M**, Bakuradze T, Eisenbrand G, Richling E (2016). Monitoring urinary mercapturic acids as biomarkers of human dietary exposure to acrylamide in combination with acrylamide uptake assessment based on duplicate diets. *Archives of Toxicology*, 90 (4): 873–881.
- Sakamoto J, Hashimoto K (1986)**. Reproductive toxicity of acrylamide and related compounds in mice-effects on fertility and sperm morphology. *Archives of Toxicology*, 59 (4): 201–205.
- Sakamoto J**, Kuroska Y, Hashimoto K (1988). Histological changes of acrylamide-induced testicular lesions in mice. *Experimental and Molecular Pathology*, 48 (3): 324–334.
- Sattelberger R (2007)**. Human-Biomonitoring Übersicht und Ausblick. Umweltbundesamt GmbH, Wien. Report Rep-0131, S. 3–8.
- Schettgen T**, Weiss T, Drexler H, Angerer J (2003). A first approach to estimate the internal exposure to acrylamide in smoking and non-smoking adults from Germany. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 206 (1): 9–14.
- Schettgen T**, Rossbach B, Kütting B, Letzel S, Drexler H, Angerer J (2004). Determination of haemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide in smoking and non-smoking persons of the general population. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 207 (3): 531–539.
- Schettgen T**, Musiol A, Kraus T (2008). Simultaneous determination of mercapturic acids derived from ethyleneoxide (HEMA), propylene oxide (2-HPMA), acrolein (3-HPMA), acrylamide (AAMA) and N,N-dimethylformamide (AMCC) in human urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22 (17): 2629–2638.
- Schrenk D**, Karger A, Lipp HP, Bock KW (1992). 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and ethinylestradiol as co-mitogens in cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis*, 13 (3): 453–456.
- Schubert J (2014)**. Leitfaden der zytopathologie für Internisten. 1. Auflage, Karger-Verlag, Ergoldung, S. 13–15.
- Segeberäck D**, Calleman CJ, Schroeder JL, Costa LG, Faustman EM (1995). Formation of N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [¹⁴C]acrylamide. *Carcinogenesis*, 16 (5): 1161–1165.
- Seglen PO (1976)**. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods in Cell Biology*, 13: 29–83.
- Settels E**, Bernauer U, Palavinskas R, Klaffke HS, Gundert-Remy U, Appel KE (2008). Human CYP2E1 mediates the formation of glycidamide from acrylamide. *Archives of Toxicology*, 82 (10): 717–727.
- Sharma C**, Kaur A, Thind SS, Singh B, Raina S (2015). Advanced glycation End-products (AGEs): an emerging concern for processed food industries. *Journal of Food Science and Technology*, 52 (12): 7561–7576.

- Shipp A**, Lawrence Gm Gentry R, McDonald T, Bartow H, Bounds J, Macdonald N, Clewell H, Allen B, Van Landingham C (2006). Acrylamide: review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. *Critical Reviews in Toxicology*, 36 (6–7): 481–608.
- SKLM**, Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln (2012). Thermisch induzierte/prozessbedingte Kontaminanten: das Beispiel Acrolein und der Vergleich zu Acrylamid. Verfügbar auf www.dfa.de
- Smith CJ**, Perfetti TA, Rumble MA, Rodgman A, Doolittle DJ (2000). "IARC group 2A Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food and Chemical Toxicology*, 38 (4): 371–383.
- Smith CJ**, Perfetti TA, Mullens MA, Rodgman A, Doolittle DJ (2001). "IARC Group 2B carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke." *Food and Chemical Toxicology*, 38 (9): 825–848.
- Stevens JF, Maier CS (2008)**. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52 (1): 7–25.
- Sumner SC**, Fennel TR, Moore TA, Chanas B, Gonzales F, Ghanayem BI (1999). Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile mice. *Chemical Research in Toxicology*, 12 (11): 1110–1116.
- Sörgel F**, Weissenbacher R, Kinzig-Schippers M, Hofmann A, Illauer M, Skott A, Landersdorfer C (2003). Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy*, 48 (6): 267–274.
- Stadler RH**, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert M-C, Riediker S (2002). Food chemistry: acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419 (6906), 449–450.
- Stadler RH**, Robert F, Riediker S, Varga N, Davidek T, Devaud S, Goldmann T, Hau J, Blank I (2004). In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (17), 5550–5558.
- Streyer L**, Berg JM, Tymoczko JL (2013), Biochemie. 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S.118ff.
- Sugiyama S**, Ohigashi S, Sawa R, Hayashi H (1989). Selective preparation of 2,3-Epoxypropanamide and its Facile Conversion to 2,3-dihydroproxypropanamide with Acidic Resins. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 62: 3202–3206.
- Sumner SC**, MacNeela JP, Fennel TR (1992). Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1,2,3-¹³C]acrylamide in rats and mice using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical Research in Toxicology*, 5 (1): 81–89.
- Sumner SC**, Williams CC, Snyder RW, Krol WL, Asgharian B, Fennel TR (2003). Acrylamide: a comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure. *Toxicological Science*, 75 (2): 260–270.

- Svensson K**, Abramsson L, Becker W, Glynn A, Hellenäs KE, Lind Y, Rosén J (2003). Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food and Chemical Toxicology*, 41 (11): 1581–1586.
- Tarun M, Rusling JF** (2005). Measuring DNA nucleobase adducts using neutral hydrolysis and liquid chromatography-mass spectrometry. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 15 (4): 295–316.
- Taylor PJ** (2005). Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, 38 (4): 328–334.
- Twaddle NC**, Churchwell MI, McDaniel LP, Doerge DR (2004). Autoclave sterilization produces acrylamide in rodent diets: implications for toxicity testing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (13): 4344–4349.
- Takahashi M**, Inoue K, Koyama N, Yoshida M, Irie K, Morikawa T, Shibutani M, Honma M, Nishikawa A (2011). Life stage-related differences in susceptibility to acrylamide-induced neural and testicular toxicity. *Archives of Toxicology*, 85 (9): 1109–1120.
- Tareke E**, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (17): 4998–5006.
- Tareke E**, Twaddle NC, McDaniel LP, Churchwell MI, Young JF, Doerge DR (2006). Relationships between biomarkers of exposure and toxicokinetics in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice administered single doses of acrylamide and glycidamide and multiple doses of acrylamide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217 (1): 63–75.
- Tareke E**, Lyn-Cook B, Robinson B, Ali SF (2008). Acrylamide: a dietary carcinogen formed in vivo?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (15): 6020–6030.
- Tareke E**, Heinze TM, Gamboa da Costa G, Ali S (2009). Acrylamide formed at physiological temperature as a result of asparagine oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (20): 9730–9733.
- Thomas AD**, Fahrner J, Johnson GE, Kaina B (2016). Theoretical considerations for thresholds in chemical carcinogenesis. *Mutation Research*, 765: 56–67.
- Tian SM**, Ma YX, Shi J, Lou TY, Liu SS, Li GY (2015). Acrylamide neurotoxicity on the cerebrum of weaning rats. *Neural Regeneration Research*, 10 (6): 938–943.
- Tilson HA, Cabe PA** (1979). The effects of acrylamide given acutely or in repeated doses on fore- and hindlimb functions of rats. *Toxicology and applied Pharmacology*, 47 (2): 253–260.
- Tyl RW**, Friedman MA, Losco PE, Fisher LC, Johnson KA, Strother DE, Wolf CH (2000). Rat two-generation reproduction and dominant lethal study of acrylamide in drinking water. *Reproductive Toxicology*, 14 (5): 385–401.
- Tyl RW, Friedman MA** (2003). Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reproductive Toxicology*, 17 (1): 1–13.

- Törnqvist M**, Fred C, Haglund J, Helleberg H, Paulsson B, Rydberg P (2002). Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analyses and applications. *Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science*, 778 (1–2): 279–308.
- Tretyakova N**, Goggin M, Sangaraju, Janis G (2007). Quantification of DNA adducts by stable isotope dilution mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 25 (10): 2007–2035.
- Tswett M (1906)**. Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorption. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 24: 316–323.
- Uchida T**, Nakamura T, Hashimoto N, Matsuda T, Kotani K, Sakaue H, Kido Y, Hasyashi Y, Nakayama KI, White MF, Kasuga M (2005). Deletion of Cdkn1b ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory hyperinsulinemia in diabetic mice. *Nature Medicine*, 11 (2): 175–182.
- Umweltbundesamt**, Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes (1996). Human-Biomonitoring: Definition, Möglichkeiten und Voraussetzungen. *Bundesgesundheitsblatt* 39(6): 213-214.
- Vallon V, Thomson SC (2012)**. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Annual Review of Physiology*, 74: 351–337.
- Verordnung (EU) Nr. 366/2011**, Verordnung (EU) Nr. 366/2011 der Kommission vom 14. April 2011 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) hinsichtlich Anhang XVII (Acrylamid).
- Verordnung (EG) Nr. 1223/2009**, Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel.
- Verordnung (EU) Nr. 2017/2158**, Verordnung (EU) Nr. 2017/2158 der Kommission vom 20. November 2017 zur Festlegung von Minimierungsmaßnahmen und Richtwerten für die Senkung des Acrylamidgehalts in Lebensmitteln.
- Vesper HW**, Slimani N, Hallmans G, Tjonneland A, Agudo A, Benetou V, Bingham S, Boeing H, Boutron-Ruault MC, Bueno-de-Mesquita HB, Chirlaque D, Clavel-Chapelon F, Crowe F, Drogan D, Ferrari P, Johansson I, Kaaks R, Linseisen J, Lund E, Manjer J, Mattiello A, Palli D, Peeters PH, Rinaldi S, Skeie G, Trichopoulou A, Vineis P, Wirfält E, Overvad K, Stromberg U (2008). Cross-sectional study on acrylamide hemoglobin adducts in subpopulations from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (15): 6046–6053.
- Vesper HW**, Sternberg MW, Frame T, Pfeiffer CM (2013). Among 10 sociodemographic and lifestyle variables, smoking is strongly associated with biomarkers of acrylamide exposure in a representative sample of the U.S. Population. *The Journal of Nutrition*, 143 (6): 995S–1000S.

- Vistoli G**, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G (2013). Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radical Research*, 47: 3–27.
- Vohr HW** (2010). Grundlagen der Toxikologie, Band 1, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, S. 455 fff.
- Von Stedingk H**, Vikström AC, Rydberg P, Pedersen M, Nielsen JK, Segerbäck D, Knudsen LE, Törnqvist M (2011). Analysis of hemoglobin adducts from acrylamide, glycidamide, and ethylene oxide in paired mother/cord blood samples from Denmark. *Chemical Research in Toxicology*, 24 (11): 1957–1965.
- Von Tungeln LS**, Churchwell MI, Doerge DR, Shaddock JG, McGarrity LJ, Heflich RH, Gamboa da Costa G, Marques MM, Beland FA (2009). DNA adduct formation and induction of micronuclei and mutations in B6C3F1/Tk mice treated neonatally with acrylamide or glycidamide. *International Journal of Cancer*, 124 (9): 2006–2015.
- Walker VE**, Fennell TR, Upton PB, Skopek TR, Prevost W, Shuker DEG, Swenberg JA (1992). Molecular dosimetry of ethylene oxide: formation and persistence of 7-(2-hydroxymethyl)guanine in DNA following repeated exposures of rats and mice. *Cancer Research*, 52: 4328–4334.
- Wang H**, Chanas B, Ghanayem BI (2002). Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) is essential for acrylonitrile metabolism to cyanide: comparative studies using CYP2E1-null and wild-type mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 30 (8): 911–917.
- Wang H**, Huang P, Lie T, Li J, Hutz RJ, Li K, Shi F (2010a). Reproductive toxicity of acrylamide treated male rats. *Reproductive Toxicology*, 29 (2): 225–230.
- Wang RS**, McDaniel LP, Manjanatha MG, Shelton SD, Doerge DR, Mei N (2010b). Mutagenicity of acrylamide and glycidamide in the testes of bigbluemice. *Toxicological Science*, 117 (1): 72–80.
- Wang Q**, Chen X, Ren Y, Chen Q, Meng Z, Cheng J, Zeng W, Zhao Q, Zhang Y (2016). Toxicokinetics and internalexposure of acrylamide: newinsight into comprehensively profiling mercapturic acid metabolites as short-term biomarkers in rats and Chinese adolescents. *Archives of Toxicology*, 91 (5): 2107–2118.
- Watzek N**, Scherbl D, Schug M, Hengstler JG, Baum M, Habermeyer M, Richling E, Eisenbrand G (2013). Toxicokinetics of Acrylamide in primary rat hepatocytes. Coupling to glutathione is faster than conversion to glycidamide. *Archives of Toxicology*, 87 (8): 1545–1556.
- Watzek N**, Scherbl D, Feld J, Berger F, Doroshenko O, Fuhr U, Tomalik-Scharte D, Baum M, Eisenbrand G, Richling E (2012a). Profiling of mercapturic acids of acrolein and acrylamide in human urine after consumption of potato crisps. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56 (12): 1825–1837.
- Watzek N**, Böhm N, Feld J, Scherbel D., Berger F, Merz KH, Lampen A, Reemtsma T, Tannenbaum SR, Skipper PL, Baum M, Richling E, Eisenbrand G (2012b). N7-glycidamide-guanine DNA

- adduct formation by orally ingested acrylamide in rats: a dose-response study encompassing human diet-related exposure levels. *Chemical Research in Toxicology*, 25 (2): 381–390.
- Watzek N (2012c)** Dissertationsarbeit. Acrylamid und Acrolein: Toxikokinetik hitzeinduzierter Kontaminanten in Lebensmittel.
- WHO (2000)**. Obesity: preventing and managing the global epidemic. WHO Technical Report Series 894. S.9
- Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P (1997)**. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, 22 (3): 474–476, 478–481.
- Wyatt MD, Pittman DL (2006)**. Methylating agents and DNA repair responses: Methylating bases and sources of strand breaks. *Chemical Research in Toxicology*, 19 (12): 1580–1594.
- Xu Y, Cui B, Ran R, Liu Y, Chen H, Kai G, Shi J (2014)**. Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: current status and future prospects. *Food and Chemical Toxicology*, 69: 1–12.
- Zhang S, Balbo S, Wang M, Hecht SS (2011)**. Analysis of acrolein-derived 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in human leukocyte DNA from smokers and nonsmokers. *Chemical Research in Toxicology*, 24 (1): 119–124.
- Zeiger E, Recio L, Fennel TR, Haseman JK, Snyder MF (2008)**. Investigation of the low-dose response in the in vivo induction of micronuclei and adducts by acrylamide. *Toxicological Sciences*, 107 (1): 247–257.
- Zerilli A, Lucas D, Amet Y, Beauge F, Volant A, Floch HH, Berthou F, Menez JF (1995)**. Cytochrome P-450 2E1 in rat liver, kidney and lung microsomes after chronic administration of ethanol either orally or by inhalation. *Alcohol and Alcoholism*, 30 (3): 357–365.
- Zyzak DV, Sanders RA, Stojanovic M, Tallmadge DH, Eberhart BL, Ewald DK, Gruber DC, Morsch TR, Strothers MA, Rizzi GP, Villagran MD (2003)**. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (16): 4782–4787.

7. Anhang

7.1 Rohdaten Kristallstrukturanalyse Glycidamid

Tabelle 51: Kristallstrukturdaten und strukturelle Feinparameter.

Identification code	1605o	
Empirical formula	C ₃ H ₅ NO ₂	
Formula weight	87.08	
Temperature	150(2) K	
Wavelength	1.54184 Å	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P2 ₁ /c	
Unit cell dimensions	a = 15.5186(7) Å	α = 90°.
	b = 5.1007(2) Å	β = 107.651(5)°.
	c = 10.9250(5) Å	γ = 90°.
Volume	824.06(7) Å ³	
Z	8	
Density (calculated)	1.404 Mg/m ³	
Absorption coefficient	1.023 mm ⁻¹	
F(000)	368	
Crystal colour and habit	Colorless prism	
Crystal size	0.221 x 0.160 x 0.159 mm ³	
Theta range for data collection	5.985 to 62.755°.	
Index ranges	-17 ≤ h ≤ 14, -5 ≤ k ≤ 5, -8 ≤ l ≤ 12	
Reflections collected	4485	
Independent reflections	1310 [R(int) = 0.0217]	
Completeness to theta = 62.755°	99.1 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	1.00000 and 0.83732	

Fortsetzung Tabelle 51

Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2
Data / restraints / parameters	1310 / 4 / 121
Goodness-of-fit on F^2	1.104
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0350, wR2 = 0.0909
R indices (all data)	R1 = 0.0374, wR2 = 0.0932
Extinction coefficient	n/a
Largest diff. peak and hole	0.344 and -0.171 e.Å ⁻³

Definitions:

$$R_1 = \frac{\sum \|F_o\| - |F_c|}{\sum |F_o|} \quad wR_2 = \sqrt{\frac{\sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2]}{\sum [w(F_o^2)^2]}}$$

$$Goof = \sqrt{\frac{\sum [w(F_o^2 - F_c^2)]}{(n - p)}} \quad n = \text{number of reflections}; p = \text{number of parameters}$$

Notes

The hydrogen atoms, which are bound to the nitrogen atoms N1 and N11, were located in the difference Fourier synthesis, and were refined semi-freely with the help of a distance restraint, while constraining their U -values to 1.2 times the $U(eq)$ values of corresponding nitrogen atoms. All the other hydrogen atoms were placed in calculated positions and refined by using a riding model.

Tabelle 52: Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente, isotrope Displacement-Parameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) für GA. $U(\text{eq})$ ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten U_{ij} Tensors.

	x	y	z	U(eq)
C(1)	3408(1)	3918(3)	4394(1)	24(1)
C(2)	4134(1)	3997(3)	5656(1)	29(1)
C(3)	4009(1)	5531(3)	6722(1)	34(1)
N(1)	3105(1)	6180(2)	3851(1)	30(1)
O(1)	3112(1)	1761(2)	3933(1)	30(1)
O(2)	4604(1)	6420(2)	6025(1)	36(1)
C(11)	1682(1)	1061(3)	5667(1)	26(1)
C(12)	1140(1)	1195(3)	4278(1)	32(1)
C(13)	218(1)	2199(3)	3920(2)	39(1)
N(11)	1883(1)	3303(2)	6283(1)	29(1)
O(11)	1895(1)	-1117(2)	6166(1)	32(1)
O(12)	938(1)	3738(2)	3728(1)	44(1)

Tabelle 53: Bindungslängen [\AA] und -winkel [$^\circ$] für GA

		C(11)-O(11)	1.2373(17)
(1)-O(1)	1.2383(17)	C(11)-N(11)	1.3154(19)
C(1)-N(1)	1.3169(18)	C(11)-C(12)	1.497(2)
C(1)-C(2)	1.494(2)	C(12)-O(12)	1.4242(19)
C(2)-O(2)	1.4294(17)	C(12)-C(13)	1.458(2)
C(2)-C(3)	1.463(2)	C(12)-H(12)	1.0000
C(2)-H(2)	1.0000	C(13)-O(12)	1.433(2)
C(3)-O(2)	1.4362(19)	C(13)-H(13A)	0.9900
C(3)-H(3A)	0.9900	C(13)-H(13B)	0.9900
C(3)-H(3B)	0.9900	N(11)-H(11A)	0.868(15)
N(1)-H(1A)	0.860(15)	N(11)-H(11B)	0.864(15)
N(1)-H(1B)	0.856(15)		

Fortsetzung Tabelle 53			
		C(13)-C(12)-H(12)	116.2
		C(11)-C(12)-H(12)	116.2
O(1)-C(1)-N(1)	123.91(12)	O(12)-C(13)-C(12)	59.02(10)
O(1)-C(1)-C(2)	118.80(12)	O(12)-C(13)-H(13A)	117.9
N(1)-C(1)-C(2)	117.26(12)	C(12)-C(13)-H(13A)	117.9
O(2)-C(2)-C(3)	59.53(9)	O(12)-C(13)-H(13B)	117.9
O(2)-C(2)-C(1)	117.44(12)	C(12)-C(13)-H(13B)	117.9
C(3)-C(2)-C(1)	120.29(12)	H(13A)-C(13)-H(13B)	115.0
O(2)-C(2)-H(2)	115.9	C(11)-N(11)-H(11A)	119.9(12)
C(3)-C(2)-H(2)	115.9	C(11)-N(11)-H(11B)	122.2(12)
		H(11A)-N(11)-H(11B)	117.5(17)
		C(12)-O(12)-C(13)	61.35(10)
C(1)-C(2)-H(2)	115.9		
O(2)-C(3)-C(2)	59.07(9)		
O(2)-C(3)-H(3A)	117.9		
C(2)-C(3)-H(3A)	117.9		
O(2)-C(3)-H(3B)	117.9		
C(2)-C(3)-H(3B)	117.9		
H(3A)-C(3)-H(3B)	115.0		
C(1)-N(1)-H(1A)	119.5(12)		
C(1)-N(1)-H(1B)	122.9(12)		
H(1A)-N(1)-H(1B)	117.6(17)		
C(2)-O(2)-C(3)	61.40(10)		
O(11)-C(11)-N(11)	124.39(12)		
O(11)-C(11)-C(12)	118.71(12)		
N(11)-C(11)-C(12)	116.89(12)		
O(12)-C(12)-C(13)	59.62(10)		
O(12)-C(12)-C(11)	116.98(12)		
C(13)-C(12)-C(11)	119.53(14)		
O(12)-C(12)-H(12)	116.2		

Tabelle 54: Anisotrope Displacement-Parameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) für GA. Die Form des Exponenten im anisotropen Displacement-Faktor ist: $-2\pi^2 [h^2 a^*^2 U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U ¹¹	U ²²	U ³³	U ²³	U ¹³	U ¹²
C(1)	29(1)	18(1)	25(1)	-1(1)	7(1)	0(1)
C(2)	28(1)	24(1)	31(1)	-2(1)	3(1)	-1(1)
C(3)	34(1)	40(1)	26(1)	-5(1)	6(1)	-7(1)
N(1)	41(1)	16(1)	27(1)	-1(1)	0(1)	-2(1)
O(1)	39(1)	16(1)	30(1)	-2(1)	2(1)	-1(1)
O(2)	33(1)	38(1)	36(1)	-10(1)	8(1)	-12(1)
C(11)	28(1)	19(1)	29(1)	1(1)	4(1)	-1(1)
C(12)	38(1)	25(1)	28(1)	0(1)	4(1)	-2(1)
C(13)	36(1)	36(1)	36(1)	1(1)	-2(1)	-1(1)
N(11)	38(1)	16(1)	26(1)	2(1)	-2(1)	0(1)
O(11)	41(1)	17(1)	32(1)	1(1)	1(1)	1(1)
O(12)	48(1)	37(1)	36(1)	14(1)	-3(1)	-5(1)

Tabelle 55: Wasserstoff-Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und isotrope Displacement-Parameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) für GA

x	y	z	U(eq)	
H(2)	4507	2371	5900	35
H(3A)	3427	6464	6580	41
H(3B)	4285	4861	7604	41
H(1A)	2683(11)	6200(40)	3127(15)	36
H(1B)	3322(11)	7660(30)	4175(16)	36
H(12)	1266	-195	3709	38

Fortsetzung Tabelle 55

H(13A)	-228	1437	3153	47
H(13B)	-30	2724	4618	47
H(11A)	2208(11)	3320(40)	7085(14)	35
H(11B)	1752(11)	4800(30)	5899(16)	35

7.2 Rohdaten Resazurin-Reduktionstest

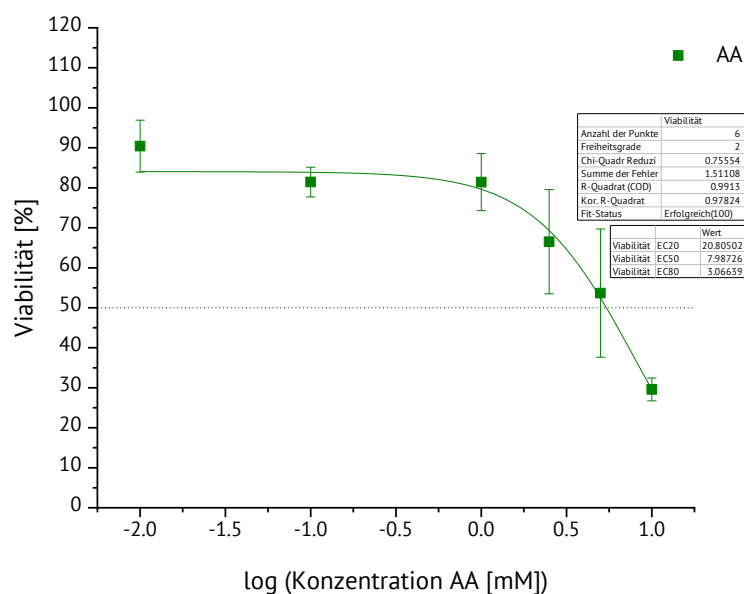


Abbildung 44: Ermittlung des EC_{50} -Wertes über die Dosis-Wirkungskurve (sigmoidaler Fit) nach Inkubation pRH mit AA (0,01-10 mM) für 24 h. Angegeben ist die Konzentration der Substanz und die Viabilität der Zellen in Prozent bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %). Dargestellt sind die MW \pm Stabw. Mit $n = 4$ (alle bis auf 0,1 mM mit $n = 3$).

Tabelle 56: Bestimmung der Zytotoxizität mittels Resazurin-Test nach Inkubation von pRH mit AA. Ausreißer-Werte sind in Klammern kenntlich gemacht und gehen nicht in die MW-Berechnung mit ein.

	$n = 1$	$n = 2$	$n = 3$	$n = 4$		
Substanz- konzentration	Viabilität [%]	Viabilität [%]	Viabilität [%]	Viabilität [%]	MW	Stabw
Negativkontrolle	100	100	100	100	100	19
0,01 mM	94	98	85	85	90	6
0,1 mM	[110]	78	81	81	81	4
1 mM	82	90	82	82	81	7
2,5 mM	60	79	52	52	67	13
5 mM	62	51	32	32	54	16
10 mM	26	32	29	29	30	3
Positivkontrolle	1	0	2	2	1	1

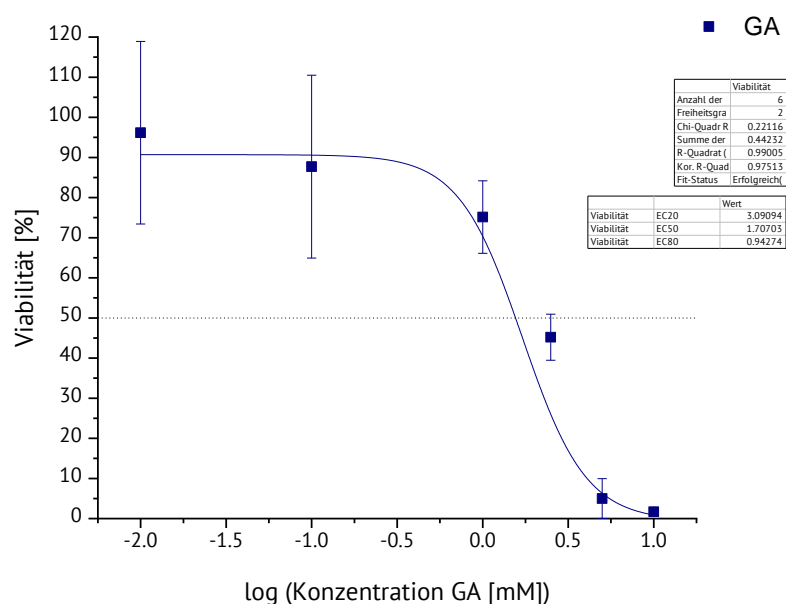


Abbildung 45: Ermittlung des EC_{50} -Wertes über die Dosis-Wirkungskurve (sigmoidaler Fit) nach Inkubation pRH mit GA (0,01-10 mM) für 24 h. Angegeben ist die Konzentration der Substanz und die Viabilität der Zellen in Prozent bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %). Dargestellt sind die MW \pm Stabw. Mit $n = 4$ (alle bis auf 1 und 2,5 mM mit $n = 3$).

Tabelle 57: Bestimmung der Zytotoxizität mittels Resazurin-Test nach Inkubation von pRH mit GA. Ausreißer-Werte sind in Klammern kenntlich gemacht und gehen nicht in die MW-Berechnung mit ein.

	$n = 1$	$n = 2$	$n = 3$	$n = 4$	MW	Stabw
Substanz- konzentration	Viabilität [%]	Viabilität [%]	Viabilität [%]	Viabilität [%]		
Negativkontrolle	100	100	100	100	100	7
0,01 mM	121	67	104	92	96	23
0,1 mM	115	62	96	78	88	23
1 mM	69	[37]	71	85	75	9
2,5 mM	46	[7]	39	51	45	6
5 mM	5	0	4	12	5	5
10 mM	1	2	2	-1	2	1
Positivkontrolle	1	0	2	1	1	1

7.3 Rohdaten zur Methodenentwicklung (U)HPLC-Methode

Testsäulen

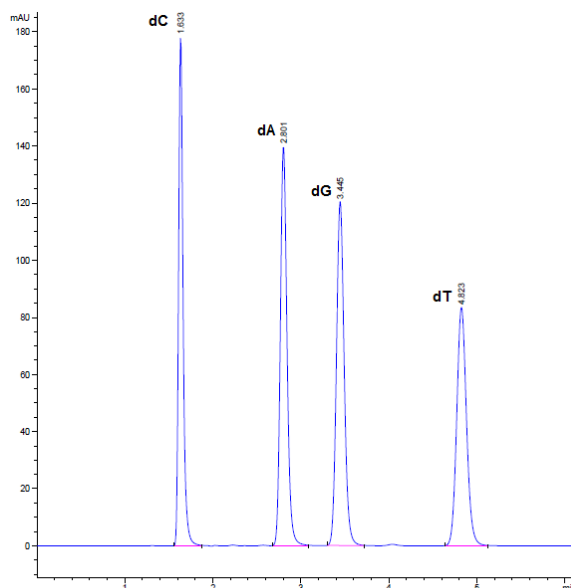


Abbildung 46: Chromatogram eines DNA-Nukleosidmix bestehend aus dC, dA, dG und dT. Die hierzu nötigen Chromatographie-Bedingungen sind in Tabelle 58 aufgeführt.

Tabelle 58: Chromatographie-Bedingungen zur Trennung von dC, dA, dG und dT.

Säule (Partikel Größe, Länge*Durchmesser)	VDSpher® PUR 100 C18-H (5 µm, 150*4,0 mm)
Modus	Reversed phase
Mobile Phase	A: Wasser (0,1 % Ameisensäure) B: Acetonitrile
Eluenten Bedingungen	0–5 Min: 95 % A und 5 % B
Flussrate	1 ml/Min
Injektionsvolumen	10 µl
Säulenofen-Temperatur	37 °C
HPLC-System	Agilent 1200 LC-System Detektion: 265 nM
Probenvorbereitung	100 µM Basen Mix in 80 % Acetonitril in Wasser

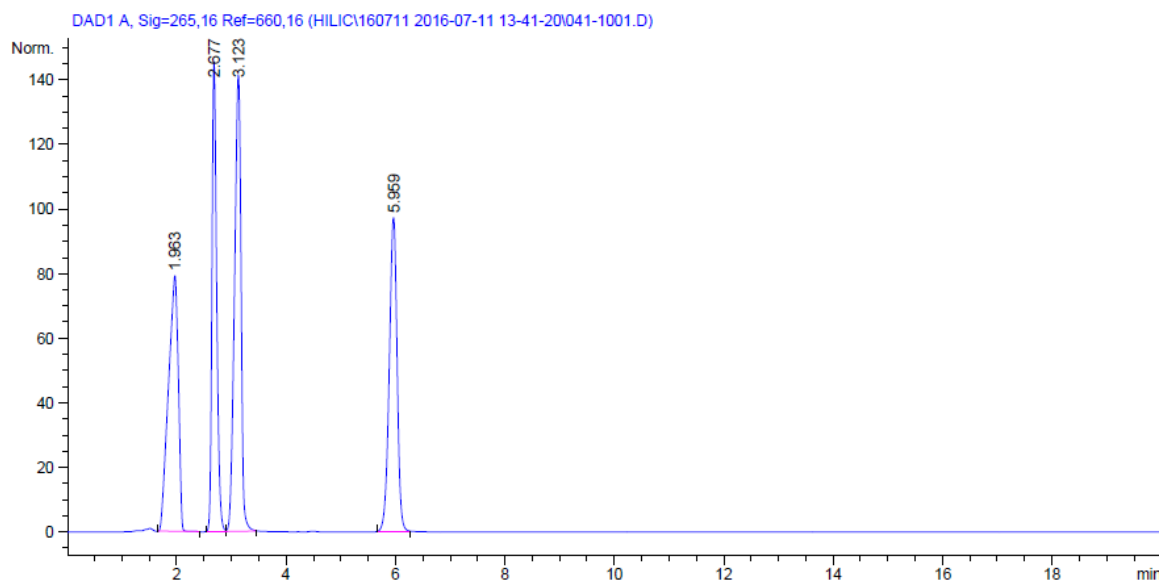


Abbildung 47: Chromatogram eines DNA-Basen Mixes (100 μ M) in 80 % Acetonitril. Erster Peak: Cytosin, zweiter Peak: Thymin, dritter Peak: Adenin und vierter Peak Guanin. Die hierzu nötigen Chromatographie-Bedingungen sind in Tabelle 59 aufgeführt.

Tabelle 59: Chromatographie-Bedingungen zur Trennung von DNA-Basen VDSpher[®] HILIC-Z-Testssäule.

Säule (Partikel Größe, Länge*Durchmesser)	VDSoptilab: VDSpher [®] HILIC-Z (5 μ m, 150*4,0 mm)
Modus	HILIC
Mobile Phase	A: Wasser (0,1 % Ameisensäure) B: Acetonitrile
Eluenten Bedingungen	0–10 Min: 20 % A und 80 % B
Flussrate	1 ml/Min
Injektionsvolumen	10 μ l
Säulenofen-Temperatur	37 °C
HPLC-System	Agilent 1200 LC-System Detektion: 265 nM
Probenvorbereitung	100 μ M Basen Mix in 80 % Acetonitril in Wasser

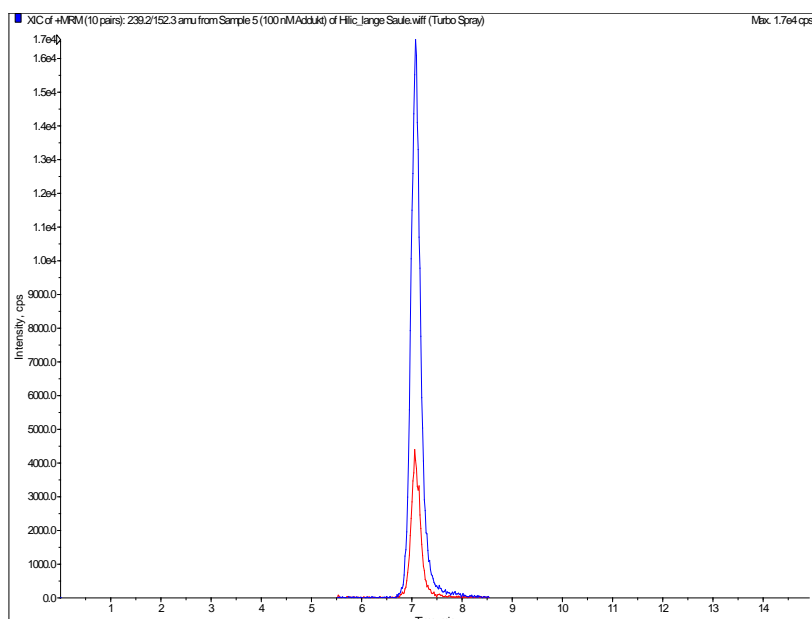


Abbildung 48: Chromatogram des Analyten *N7-GA-Gua* mit VDSpher® HILIC-Z-Testsäule. Blau erster Übergang, rot zweiter Übergang. Die hierzu nötigen Chromatographie-Bedingungen sind in Tabelle 60 aufgeführt.

Tabelle 60: Chromatographie-Bedingungen zur Detektion von *N7-GA-Gua* auf der VDSpher® HILIC-Z-Testsäule.

Säule (Partikel Größe, Länge*Durchmesser)	VDSoptilab: VDSpher® HILIC-Z (5 µm, 150*4,0 mm)
Modus	HILIC
Mobile Phase	A: Wasser (0,2 % Essigsäure) B: Acetonitril mit 0,2 % Essigsäure
Eluenten Bedingungen	0–15 Min: 20 % A und 80 % B
Flussrate	1 ml/Min
Injektionsvolumen	10 µl
Probenvorbereitung	100 nM <i>N7-GA-Gua</i>

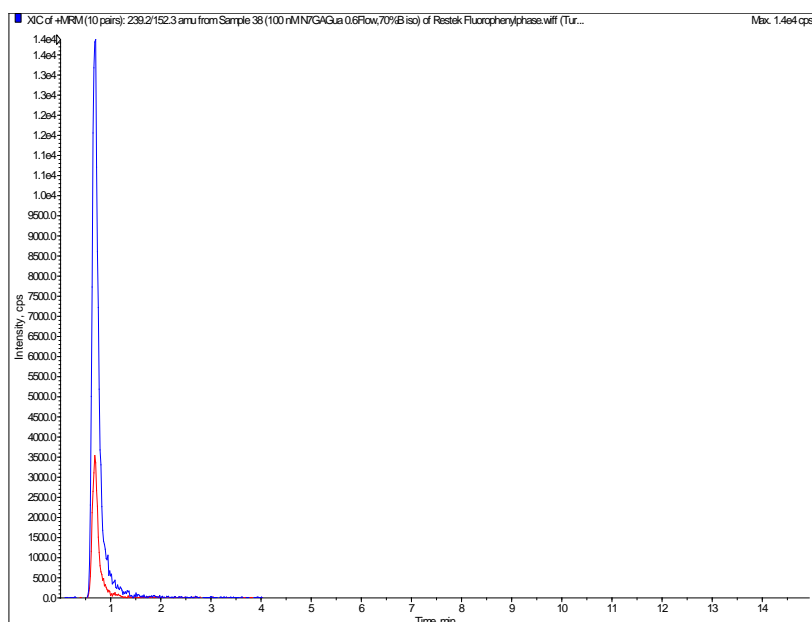


Abbildung 49: Chromatogram des Analyten *N7-GA-Gua* mit Fluorophenyl-Testsäule. Blau erster Übergang, rot zweiter Übergang Die hierzu nötigen Chromatographie-Bedingungen sind in Tabelle 61 aufgeführt.

Tabelle 61: Chromatographie-Bedingungen zur Detektion von *N7-GA-Gua* auf der Fluorophenyl-Testsäule.

Säule (Partikel Größe, Länge*Durchmesser)	Restek: Raptor Fluorophenyl (2,7 μ m; 50*2,1 mm)
Modus	RP und HILIC
Mobile Phase	A: Wasser (0,2 % Essigsäure) B: Acetonitril mit 0,2 % Essigsäure
Eluenten Bedingungen	0–10 Min: 30 % A und 70 % B
Flussrate	0,6 ml/Min
Injektionsvolumen	2 μ l
Probenvorbereitung	100 nM <i>N7-GA-Gua</i>

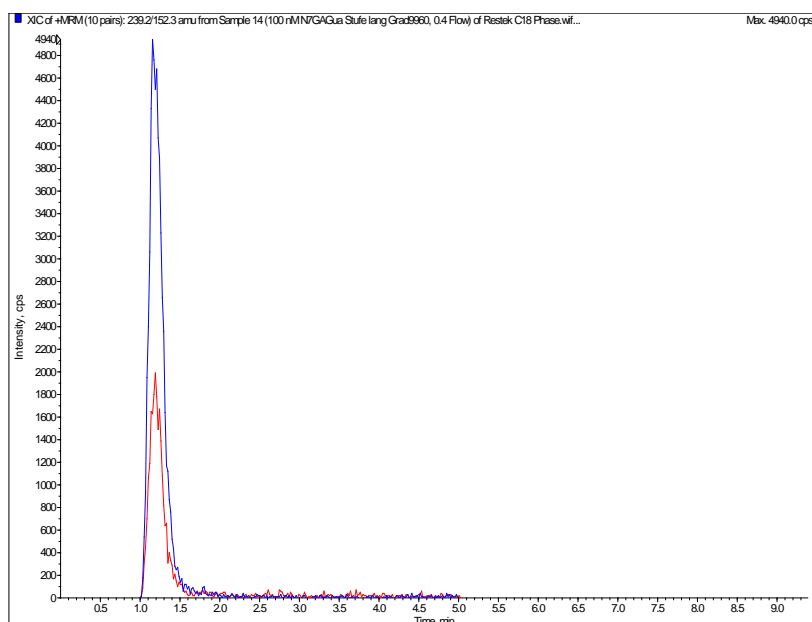


Abbildung 50: Chromatogram des Analyten *N7-GA-Gua* mit Ultra C18 Testsäule. Blau erster Übergang, rot zweiter Übergang. Die hierzu nötigen Chromatographie-Bedingungen sind in Tabelle 62 aufgeführt.

Tabelle 62: Chromatographie-Bedingungen zur Detektion von *N7-GA-Gua* auf der Ultra C18-Testsäule.

Säule (Partikel Größe, Länge*Durchmesser)	Restek: Ultra C18 (2,7 µm; 50*2,1 mm)
Modus	RP
Mobile Phase	A: Wasser (0,2 % Essigsäure) B: Acetonitril mit 0,2 % Essigsäure 0 Min: 99 % A und 1 % B 1 Min: 60 % A und 40 % B 4 Min: 5 % A und 95 % B
Flussrate	0,4 ml/Min
Injektionsvolumen	2 µl
Probenvorbereitung	100 nM <i>N7-GA-Gua</i>

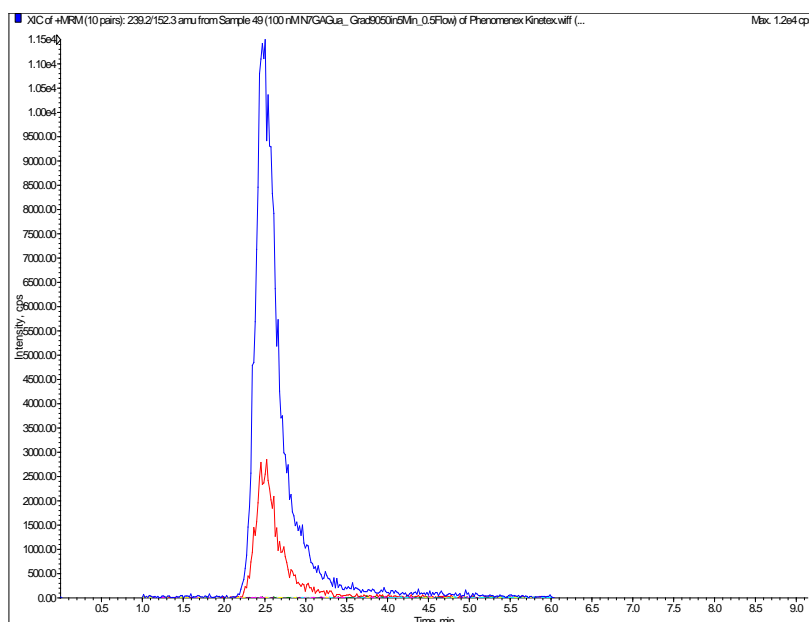


Abbildung 51: Chromatogram des Analyten *N7-GA-Gua* mit Kinetex HILIC-Testsäule. Blau erster Übergang, rot zweiter Übergang. Die hierzu nötigen Chromatographie-Bedingungen sind in Tabelle 63 aufgeführt.

Tabelle 63: Chromatographie-Bedingungen zur Detektion von *N7-GA-Gua* auf Kinetex HILIC Testsäule.

Säule (Partikel Größe, Länge*Durchmesser)	Phenomenex: Kinetex HILIC (2,6 µm; 100*2,1mm)
Modus	HILIC
Mobile Phase	A: Wasser (0,2 % Essigsäure) B: Acetonitril mit 0,2 % Essigsäure
Eluenten Bedingungen	0 Min: 10 % A und 90 % B 5 Min: 50 % A und 50 % B
Flussrate	0,5 ml/Min
Injektionsvolumen	2 µl
Probenvorbereitung	100 nM <i>N7-GA-Gua</i>

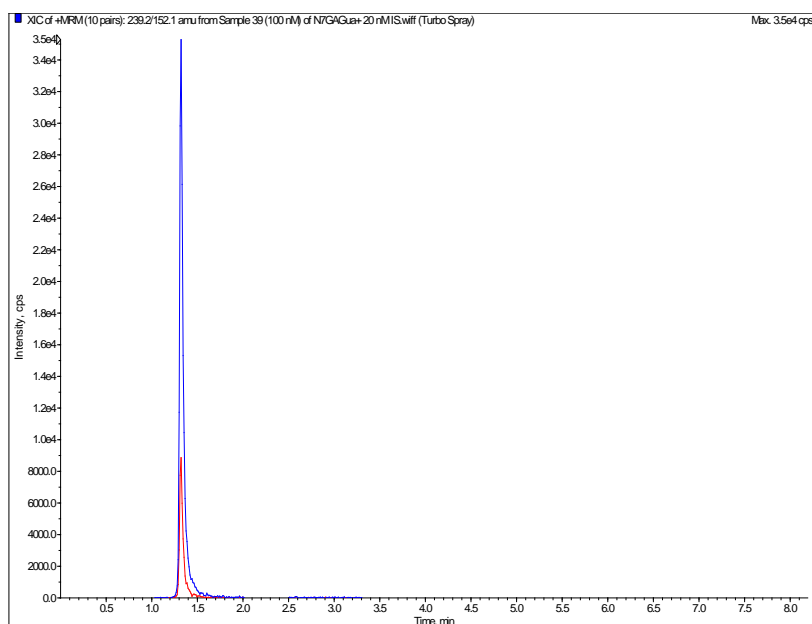


Abbildung 52: Chromatogram des Analyten *N7-GA-Gua* mit VDSpher PUR C18-E-Testäule. Blau erster Übergang, rot zweiter Übergang. Die hierzu nötigen Chromatographie-Bedingungen sind in Tabelle 64 aufgeführt.

Tabelle 64: Chromatographie-Bedingungen zur Detektion von *N7-GA-Gua* auf der VDSpher PUR C18-E-Testäule.

Säule (Partikel Größe, Länge*Durchmesser)	VDSoptilab: VDSpher PUR® C18-E (1,8 µm; 50*4,6 mm)
Modus	RP
Mobile Phase	A: Wasser (0,2 % Essigsäure) B: Acetonitril mit 0,2 % Essigsäure
Eluenten Bedingungen	0–5 Min: 95 % A und 5 % B
Flussrate	0,8 ml/Min
Injektionsvolumen	10 µl
Probenvorbereitung	100 nM <i>N7-GA-Gua</i>

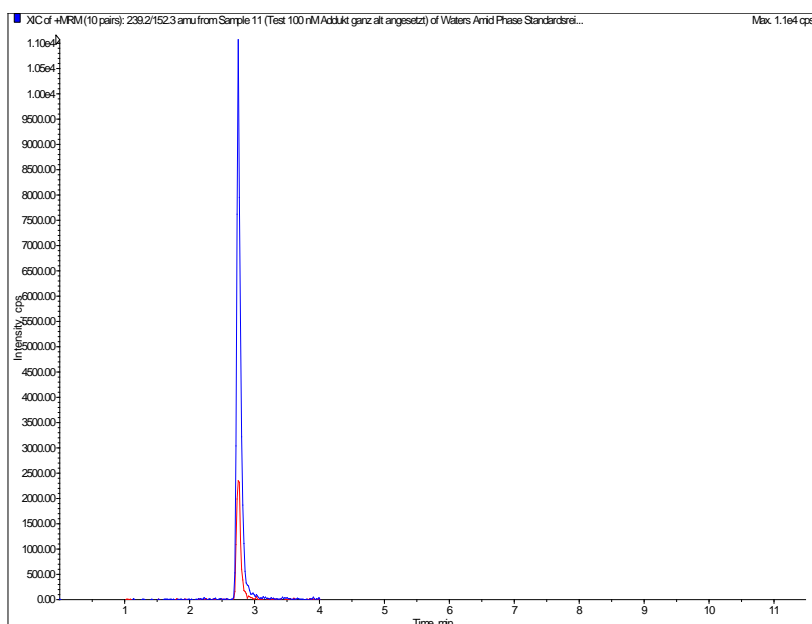


Abbildung 53: Chromatogramm des Analyten *N7-GA-Gua* mit Acquity UPLC BEH Amid-Testäule. Blau erster Übergang, rot zweiter Übergang. Die hierzu nötigen Chromatographie-Bedingungen sind in Tabelle 65 aufgeführt.

Tabelle 65: Chromatographie-Bedingungen zur Detektion von *N7-GA-Gua* auf der Acquity UPLC BEH-Amide-Testäule.

Säule (Partikel Größe, Länge*Durchmesser)	Waters: Acquity UPLC® BEH Amid (1,7 µm; 50*3 mm)
Modus	RP
Mobile Phase	A: Wasser (0,2 % Essigsäure) B: Acetonitrile mit 0,2 % Essigsäure
Eluenten Bedingungen	0 Min: 10 % A und 90 % B 5 Min: 50 % A und 50 % B
Flussrate	0,8 ml/Min
Injektionsvolumen	2 µl
Probenvorbereitung	100 nM <i>N7-GA-Gua</i>

Bemerkung: Das in Abbildung 52 dargestellte Chromatogramm entstand vor einem Gerätewechsel. Daher stimmt die Retentionszeit nicht mit der wie sie auf Chromatogrammen mit der finalen Methode gezeigt ist, überein. Die Suche nach einer geeigneten Testsäule fand an einem HPLC-ESI-MS/MS (API 3200) System statt, während die finale Methode an einr HPLC-ESI-MS/MS (API 5500 QTRAP) entwickelt und validiert wurde.

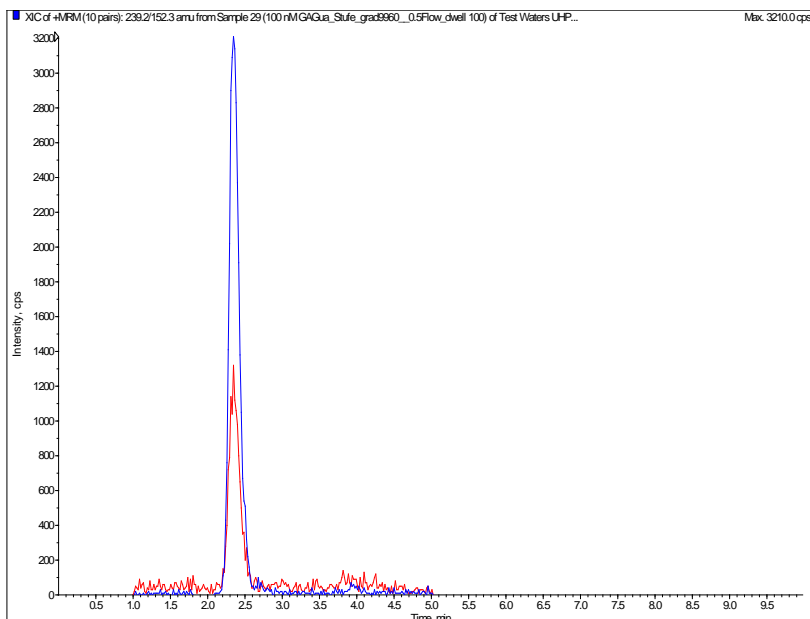


Abbildung 54: Chromatogram des Analyten *N7-GA-Gua* UPLC HSS T3-Testäule. Blau erster Übergang, rot zweiter Übergang Die hierzu nötigen Chromatographie-Bedingungen sind in Tabelle 66 aufgeführt.

Tabelle 66: Chromatographie-Bedingungen zur Detektion von *N7-GA-Gua* auf der UPLC HSS T3-Testäule.

Säule (Partikel Größe, Länge*Durchmesser)	Waters: UPLC® HSS T3 (1,8 µm; 50*3mm)
Modus	RP
Mobile Phase	A: Wasser (0,2 % Essigsäure) B: Acetonitril mit 0,2 % Essigsäure
Eluenten Bedingungen	0 min: 99 % A und 1 % B 1 Min: 99 % A und 1 % B 3,5 Min: 60 % A und 40 % B
Flussrate	0,5 ml/Min
Injektionsvolumen	2 µl
Probenvorbereitung	100 nM <i>N7-GA-Gua</i>

Chromatogramme Standards

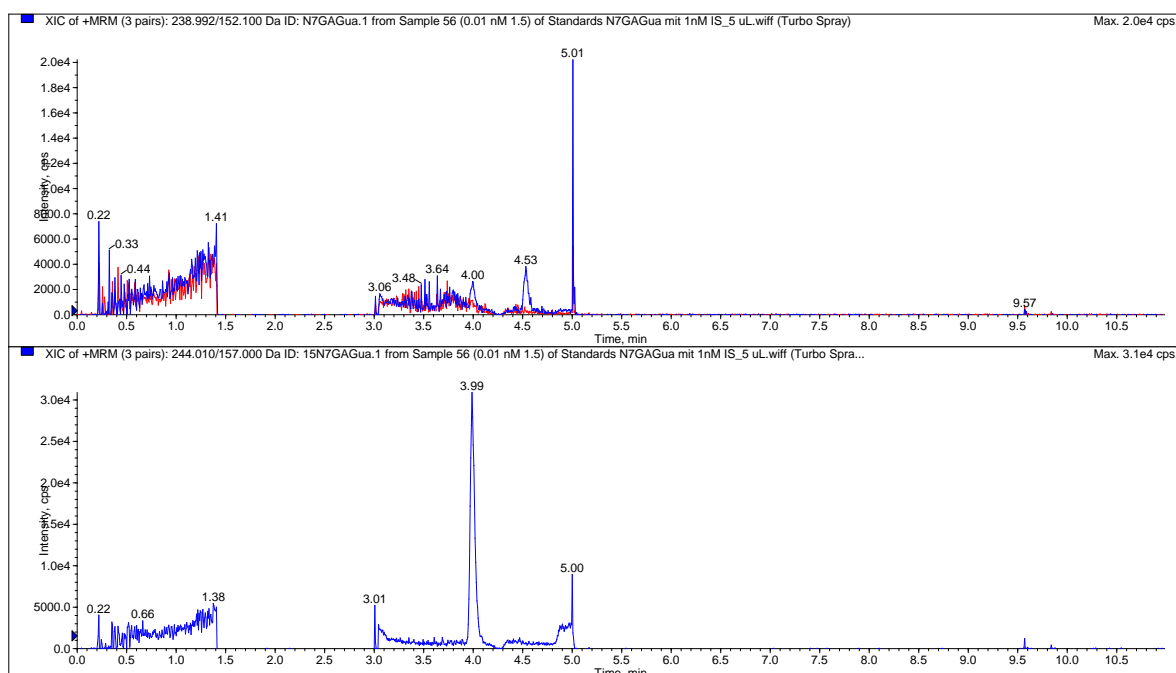


Abbildung 55: Repräsentatives UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Chromatogramm eines 0,01 nM Standards (mit 1 nM IS) bei einem Injektionsvolumen von 5 µl. Oben Spur des Analyten, mit blau: erster Übergang (239→152) und rot: zweiter Übergang (239→110). Unten Spur des IS (244→157).

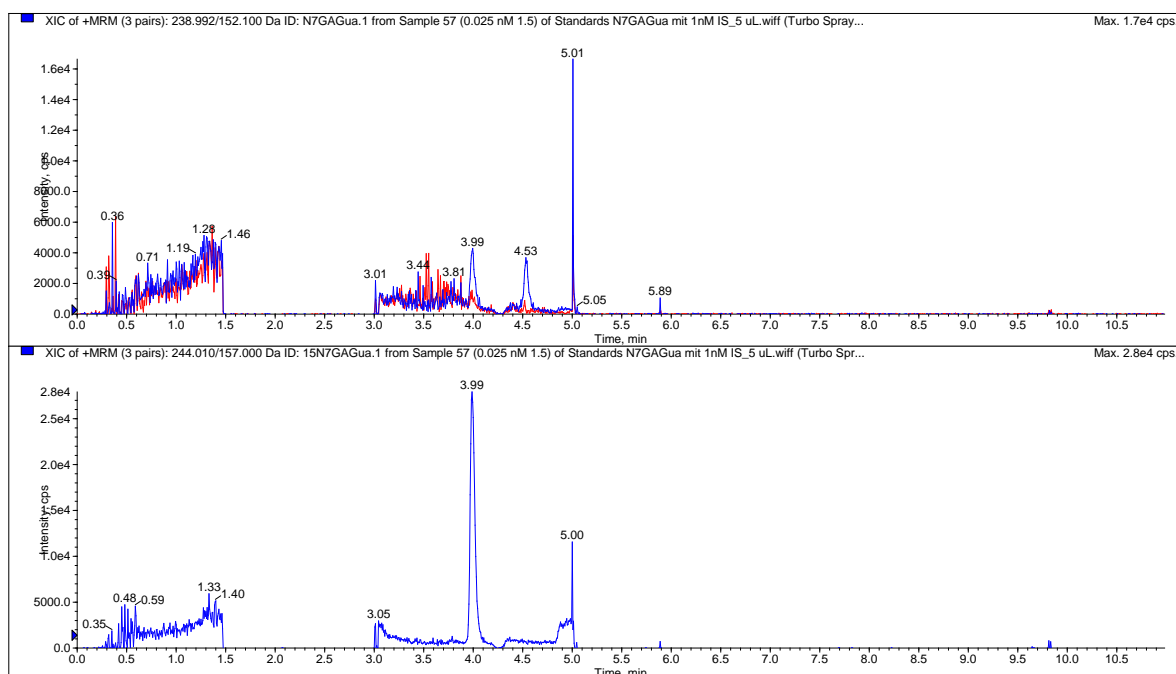


Abbildung 56: Repräsentatives UHPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Chromatogramm eines 0,025 nM Standards (mit 1 nM IS) bei einem Injektionsvolumen von 5 µl. Oben Spur des Analyten, mit blau: erster Übergang (239→152) und rot: zweiter Übergang (239→110). Unten Spur des IS (244→157).

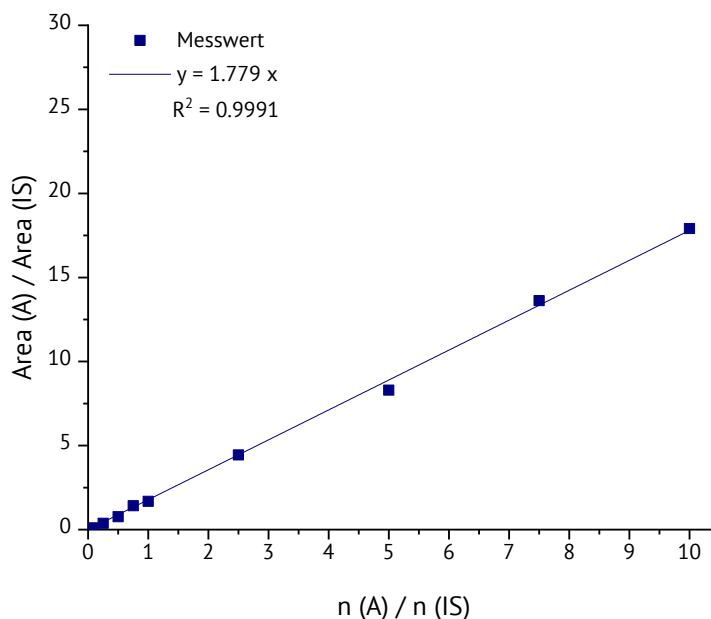
Kalibriergeraden

Abbildung 57: Kalibriergerade zur Quantifizierung von N7-GA-Gua in tierischen Geweben aus Ratte und Maus. Die hierzu nötigen Rohdaten sind in Tabelle 67 enthalten.

Tabelle 67: Rohdaten zur Erstellung der in Abbildung 57 dargestellten Kalibriergeraden zur Bestimmung der Gehalte an N7-GA-Gua in pRH und Gewebeproben aus Ratte und Maus, bei einem Injektionsvolumen von 5 μl . Dargestellt sind die jeweiligen MW aus zwei Messungen. Mit A: Analyt und IS: interner Standard.

Konzentration A [nM]	Konzentration IS [nM]	Konzentration A: Konzentration IS	Area A [counts]	Area IS [counts]	Area A: Area IS
0,025	1	0,025	6333,50	134100	0,05
0,075	1	0,075	13690	130750	0,10
0,25	1	0,25	47620	127650	0,37
0,5	1	0,5	97350	127600	0,76
0,75	1	0,75	181450	127400	1,42
1	1	1	208050	123650	1,68
2,5	1	2,5	544150	122600	4,44
5	1	5	1094000	131950	8,30
7,5	1	7,5	1675000	123000	13,62
10	1	10	2284500	127550	17,91

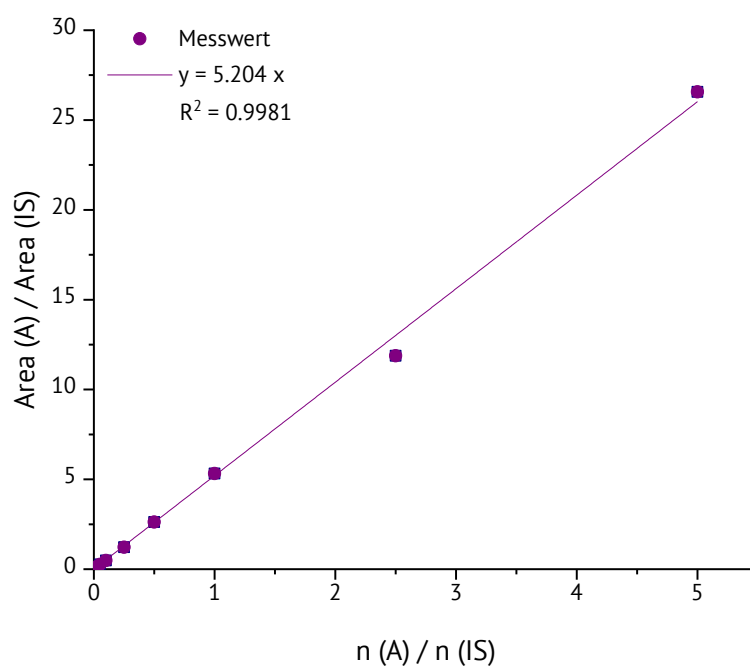


Abbildung 58: Kalibriergerade zur Quantifizierung von N7-GA-Gua in Humanblut. Injektionsvolumen 5 μl . Die hierzu nötigen Rohdaten sind in Tabelle 68 enthalten.

Tabelle 68: Rohdaten zur Erstellung der in Abbildung 58 dargestellten Kalibriergeraden, zur Bestimmung der Gehalte an N7-GA-Gua in Humanproben. Dargestellt sind die jeweiligen MW der hergestellten Standards bei einem Injektionsvolumen von 5 μl . Mit $n = 5$. Mit A: Analyt und IS: interner Standard.

Konzentration A [nM]	Konzentration IS [nM]	Konzentration A: Konzentration IS	Area A [counts]	Area IS [counts]	Area A: Area IS
0,025	1	0,025	12030	88484	0,14
0,05	1	0,05	23756	92868	0,26
0,1	1	0,1	45712	95250	0,48
0,25	1	0,25	118140	97170	1,22
0,5	1	0,5	249060	95578	2,62
1	1	1	497780	93660	5,32
2,5	1	2,5	1171200	98628	11,88
5	1	5	2530600	95236	26,57

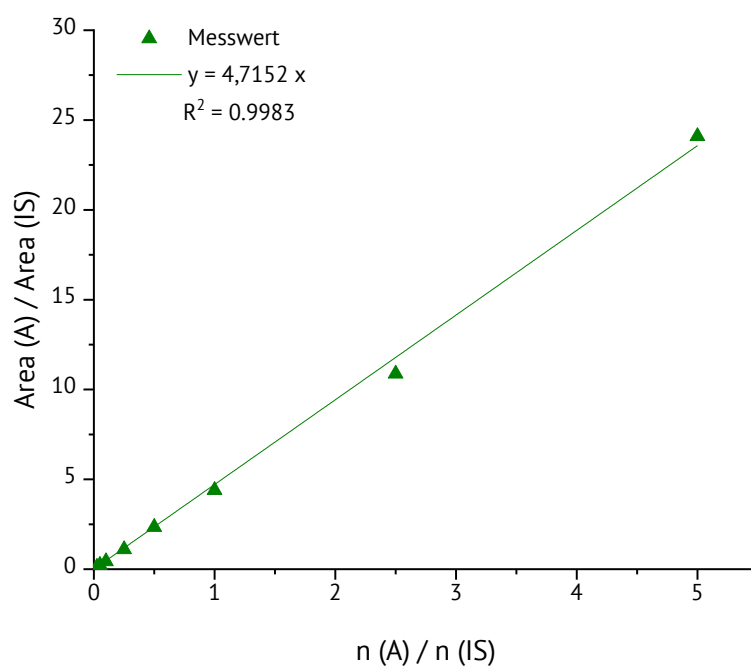


Abbildung 59: Kalibriergerade zur Quantifizierung von N7-GA-Gua in Humanblut. Injektionsvolumen 10 μ l. Die hierzu nötigen Rohdaten sind in Tabelle 69 enthalten.

Tabelle 69: Rohdaten zur Erstellung der in Abbildung 59 dargestellten Kalibriergeraden zur Bestimmung der Gehalte an N7-GA-Gua in Humanproben. Dargestellt sind die jeweiligen MW der hergestellten Standards bei einem Injektionsvolumen von 10 μ l. Mit $n = 5$. Mit A: Analyt und IS: interner Standard.

Konzentration A [nM]	Konzentration IS [nM]	Konzentration A: Konzentration IS	Area A [counts]	Area IS [counts]	Area A: Area IS
0,025	1	0,025	19341,67	157783,33	0,12
0,05	1	0,05	37633,33	162150	0,23
0,1	1	0,1	73531,67	171483,33	0,43
0,25	1	0,25	192566,67	175766,67	1,10
0,5	1	0,5	431466,67	184350	2,34
1	1	1	783966,67	165266,67	4,4
2,5	1	2,5	180166,67	171016,67	10,88
5	1	5	3890500	161466,67	24,10

7.4 Rohdaten Inkubation pRH

Tabelle 70: Bestimmung der DNA-Adduktgehalte an *N7-GA-Gua* nach Inkubation pRH mit AA (0,002-2 mM) für 1, 16 oder 24 h. Ausreißer-Werte sind in Klammern kenntlich gemacht und gehen nicht in die MW-Berechnung mit ein. Sofern möglich wurden von jeder Konzentration zwei Ansätze gemacht und vermessen. Aufgrund der Zellzahl, welche von Perfusion zu Perfusion schwankte, war es nicht immer möglich alle Konzentrationen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten zu bestimmen. Dies war bei den Feldern „fehlt“ der Fall.

Gehalt an <i>N7-GA-Gua</i> in Addukte pro 10 ⁸ Nukleotide							
Substanz	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	MW	Stabw
KO	8,09 ±	5,04 ±	3,97 ±	10,98 ±	7,40 ±	7,10	2,75
	0,70	1,50	0,05	6,72	2,61		
1 h,	9,16 ±	fehlt	4,39 ±	6,37 ±	7,42 ±	6,84	2,00
2 mM	0,11		0,03	2,18	0,67		
16 h,	fehlt	fehlt	4,55 ±	4,74 ±	5,16 ±	4,82	0,31
0,002 mM			0,225	1,70	2,04		
16 h,	fehlt	fehlt	5,93 ±	5,88 ±	4,06 ±	5,29	1,07
0,02 mM			0,96	0,99	0,5		
16 h,	fehlt	fehlt	6,38 ±	11,49 ±	4,16 ±	7,34	3,76
0,2 mM			0,35	0,99	1,30		
16 h,	14,92 ±	7,84 ±0,72	fehlt	16,24 ±	2,76 ±	10,44	6,31
0,5 mM	0,12			4,62	0,31		
16 h,	17,45 ±	23,12 ±	fehlt	27,61 ±	[3,36 ±	22,77	5,09
1 mM	1,58	0,99		3,20	0,08]		
16 h,	26,86 ±	21,35 ±	41,10 ±	21,55 ±	7,97 ±	23,77	11,94
2 mM	2,75	2,20	9,24	6,05	0,42		
24 h,	fehlt	fehlt	4,01 ±	11,22 ±	3,85 ±	6,36	4,21
0,002 mM			0,47	2,49	1,25		
24 h,	fehlt	fehlt	3,61 ±	12,06 ±	4,40 ±	6,69	467
0,02 mM			0,12	1,76	0,51		
24 h,	fehlt	fehlt	13,69 ±	14,46 ±	4,75 ±	10,97	5,40
0,2 mM			4,16	2,34	1,58		

Fortsetzung Tabelle 70

24 h,	[45,87 ±	6,66 ±	Fehlt	14,54 ±	6,15 ±	9,12	4,70
0,5 mM	2,16]	0,43		4,89	1,57		
24 h,	26,47 ±	13,73 ±	Fehlt	17,76 ±	18,99 ±	19,24	5,32
1 mM	0,34	0,38		0,02	16,09		
24 h,	21,20 ±	fehlt	39,16	23,95 ±	[3,22 ±	28,10	9,67
2 mM	0,92			5,91	0,16]		

7.5 Rohdaten Maus/Ratte

Tabelle 71: Bestimmung der DNA-Adduktgehalte in unterschiedlichen Geweben von Ratte und Maus. Ausreißer-Werte sind in Klammern kenntlich gemacht und gehen nicht in die MW-Berechnung mit ein. Sofern möglich wurden von jeder Konzentration zwei Ansätze gemacht und vermessen. Aufgrund der Zellzahl, welche von Perfusion zu Perfusion schwankte, war es nicht immer möglich alle Konzentrationen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten zu bestimmen. Dies war bei den Feldern „fehlt“ der Fall. Mit m= männlich; w = weiblich; R = Ratte; M = Maus; BS = black six (C57BL/6JrJ-Maus); D = Diabetes Maus (C57BL/6JrJ-Maus); W = Wistar-Ratte; FA = Futter A (ALIMENT S8189-S095 SNIFF mit AA-Gehalt von 5 µg/kg; FB = Futter B (Altromin 1314TPF mit AA-Gehalt von 31 µg/kg).

	Leber	Lunge	Niere
Tier 1	[9,18 ± 0,11]	2,28	2,63 ± 0,76
M/BS, m, FA			
Tier 2	3,50 ± 0,13	3,18 ± 0,36	5,90 ± 0,39
M/BS, m, FA			
Tier 3	2,67 ± 0,10	6,35 ± 1,64	7,54 ± 4,62
M/BS, m, FA			
Tier 4	2,13 ± 0,94	8,38 ± 7,12	6,21 ± 4,64
M/BS, m, FA			
MW ± Stabw.	2,77 ± 0,69	5,05 ± 2,83	5,57 ± 2,08
Tier 5	nd	0,2 ± 0	1,28 ± 0,02
M/BS, m, FB			
Tier 6	0,34 ± 0,17	1,10 ± 0,20	0,80 ± 0,60
M/BS, m, FB			
Tier 7	2,79 ± 2,62	0,81 ± 0,09	0,68
M/BS, m, FB			
Tier 8	7,8 ± 4,54	3,53 ± 0,76	5,12 ± 1,99
M/BS, m, FB			
Tier 9	7,58 ± 5,14	3,00 ± 0,52	8,61 ± 4,84
M/BS, m, FB			
MW ± Stabw	4,63 ± 3,80	1,73 ± 1,45	3,30 ± 3,49

Fortsetzung Tabelle 71

Tier 10	0,70 ± 0,42	0,73 ± 0,19	fehlt
M/BS, w, FB			
Tier 11	0,71 ± 0,55	0,86 ± 0,02	0,96 ± 0,63
M/BS, w, FB			
Tier 12	6,29 ± 5,01	3,00 ± 0,83	5,87 ± 1,67
M/BS, w, FB			
Tier 13	3,63	2,97 ± 0,03	3,68 ± 2,30
M/BS, w, FB			
Tier 14	4,54	2,72 ± 0,13	1,75 ± 0,19
M/BS, w, FB			
MW ± Stabw	3,18 ± 2,43	1,92 ± 1,35	3,07 ± 2,34
Tier 15	5,97 ± 2,35	2,89 ± 2,93	6,23 ± 2,29
M/D, m, FB			
Tier 16	5,17 ± 0,63	3,02 ± 1,34	23,99
M/D, m, FB			
Tier 17	4,10 ± 0,91	[14,72 ± 11,21]	8,00 ± 5,90
M/D, m, FB			
Tier 18	8,10 ± 2,57	8,54 ± 4,18	10,11 ± 6,77
M/D, m, FB			
Tier 19	[17,80 ± 14,16]	4,81 ± 0,86	fehlt
M/D, m, FB			
MW ± Stabw	5,83 ± 1,70	4,82 ± 2,64	12,07 ± 8,10
Tier 20	fehlt	0,62 ± 0,05	0,56 ± 0,03
R/W, m, FA			
Tier 21	fehlt	[0,40 ± 0,23]	0,32 ± 0,15
R/W, m, FA			
Tier 22	fehlt	0,63 ± 0,04	1,09
R/W, m, FA			
MW ± Stabw		0,62 ± 0,00	0,66 ± 0,39

7.6 Rohdaten Humanstudie

Tabelle 72: Anzahl an *N7-GA-Gua* in Humanblut. Dargestellt sind die Rohdaten der einzelnen Probanden.

Probandennummer	Anzahl an <i>N7-GA-Gua</i> pro 10 ⁸ Nukleotiden	Mittelwertabweichung
1	1,65	0,62
2	0,79	0,29
3	1,13	0,00
4	1,39	0,04
5	1,84	0,94
6	1,91	1,10
7	2,39	0,42
8	4,48	3,48
9	0,97	0,15
10	2,36	1,35
11	0,57	0,06
12	0,52	-
13	0,81	0,39
14	1,07	0,34
15	0,77	0,15
16	1,07	0,43
17	2,57	1,59
18	1,00	0,29
19	0,90	0,03
20	0,93	0,08
21	1,49	1,29
22	2,05	1,55
23	0,00	0,00
24	0,54	0,04
25	1,67	0,64
26	0,55	0,05

Fortsetzung Tabelle 72

27	0,00	0,00
28	0,00	0,00
29	0,00	0,00
30	3,74	0,29
31	9,36	7,46
32	0,00	0,00
33	0,50	0,00
34	4,32	2,75
35	1,25	0,68
36	0,00	0,00
37	0,00	0,00
38	0,00	0,00
39	0,00	0,00
40	1,18	0,03
41	0,50	0,00
42	1,66	0,73
43	0,55	0,35
44	3,66	0,02
45	1,09	0,26
46	1,77	0,71
47	0,00	0,00
48	0,20	0,00
49	0,50	0,00
50	0,92	0,42
51	1,91	0,02
52	1,22	0,74
53	2,42	0,17
54	5,23	0,20
55	26,59	0,01
56	1,09	0,34
57	0,97	0,50

FortsetzungTabelle 72

58	0,00	0,00
59	0,50	0,00
60	0,00	0,00

Tabelle 73: Rohdaten Humanstudie. Mit: Geschl. = Geschlecht, m= männlich und w= weiblich, NEM = Nahrungsergänzungsmittel, Glc.= Glucose, BMI= Body mass index.

Nr.	Alter	BMI	Geschl.	Raucher Anzahl an Zig./Tag	NEM	Kaffee [Tassen/Tag]	Konsum stärkehaltiger Produkte	HbA1c	Nüchtern- Glc.	Cotinin [µg/l]	Kreatinin [g/l]	Cotinin [µg/g Kreatinin]	Anzahl an N7-GA-Gua [Addukte pro 10 ⁸ Nukleotide]
1	22	28,8	m	0	-	2	Kekse/Cornflakes 2x/Woche	5,3	89,78	27.3	1,11	24,6	1,65 ± 0,62
2	25	39,5	w	0	-	2–3	Mensapommes/ Bratkartoffeln	5,3	103,01	< 5	1,95		0,79 ± 0,29
3	29	29,7	w	0	Mg	6	eines der Produkte max. 1x/Woche	5,2	100,57	< 5	0,44		1,13 ± 0
4	22	21,7	m	0	Mg, Ca, Vitamine	1	Kekse, 1x/Woche	5,2	98,25	65.2	1,28	50,9	1,39 ± 0,04
5	30	25,5	m	0	-	1	Mensapommes, Salzstangen 3–4x/Woche	5,1	83,17	< 5	0,48		1,84 ± 0,94
6	37	29,7	m	20	-	6	Pommes, Bratkartoffeln	6,0	111,36	1160	1,70	682,4	1,91 ± 1,1

Fortsetzung Tabelle 73

							2–3x/Woche						
7	21	29,7	m	0	-	0	Mensapommes	5,2	96,05	< 5	1,86		2,39 ± 0,42
							2–3x/Woche						
8	22	22,0	w	0	-	0	Kekse	5,4	90,02	< 5	0,60		4,48 ± 3,48
							2–3x/Woche, Mensapommes						
							1–2x/Woche						
9	26	22,8	w	0	-	0	Mensapommes, selten Kekse, Rest 1x/Woche	5,5	86,07	< 5	0,42		0,97 ± 0,15
							eines der Produkte	5,1	95,47	< 5	1,00		2,36 ± 1,35
							2–3x/Woche						
11	22	21,3	m	5	-	2	Pommes/Chips	4,9	88,28	1130	0,43	2627.9	0,57 ± 0,06
							2x/Woche						
12	26	21,7	m	0	-	0	Pommes	5,4	87,35	< 5	1,31		0,52
							2x/Woche, Chips 1x/Woche, ab und zu Kekse						

7. Anhang

Fortsetzung Tabelle 73

13	21	20,0	w	0	-	0	-	5,2	92,45	< 5	0,15		0,81 ± 0,39
14	25	29,7	m	0	-	3-4	Mensapommes	5,0	90,60	< 5	2,04		1,07 ± 0,34
15	27	28,9	w	5-10	Eisen, Zink, Vitamin H, Hautvital (DM)	5	Mensapommes, Knäckbrot 3-4x/Woche	5,4	84,68	804	1,00	804	0,77 ± 0,15
16	30	22,4	m	0	-	2	Pommes min. 2x/Woche	4,9	93,61	< 5	1,87		1,07 ± 0,43
17	24	23,4	m	0	-	3	1 Produkt pro Tag	5,2	88,97	< 5	1,93		2,57 ± 1,59
18	34	23,1	m	5-10	Iodid	1-2	Mensapommes, Chips 1-2x/Woche	5,5	101,38	659	1,63	404.3	1,00 ± 0,29
19	20	36,6	m	0	-	3	Mensapommes 2x/Woche Chips, Cornflakes täglich	5,1	100,69	< 5	2,34		0,90 ± 0,03
20	56	20,3	w	0	-	2		5,7	87,81	< 5	1,11		0,93 ± 0,08
21	37	31,0	m	0	-	3-4	Pommes und Bratkartoffeln	4,9	103,70	< 5	0,39		1,49 ± 1,29

Forsetzung Tabelle 73

							1x/Woche					
22	22	19,2	m	0	-	0	Mensapommes	4,7	94,10	< 5	3,49	2,05 ± 1,55
23	26	21,6	w	0	-	0	Kekse und Chips	4,8	92,40	< 5	0,93	0,00 ± 0,00
							1–2x/Woche					
24	25	26,3	m	0	-	1	Mensapommes und Bratkartoffeln	5,2	102,60	< 5	0,53	0,54 ± 0,04
25	22	34,2	w	0	-	0	Mensapommes	4,7	91,50	< 5	0,23	1,67 ± 0,64
26	24	28,4	m	10	-	5	Mensapommes	4,5	85,20	465	0,80	581,3 0,55 ± 0,05
							2–3x/Woche					
27	24	21,0	w	0	-	0	Pommes und Chips 1x/Woche, Kekse täglich	4,8	92,50	< 5	2,54	0,00 ± 0,00
28	42	22,3	w	0	Mg/Ca	0	Cornflakes, Müsli und Kekese	4,5	84,10	< 5	1,77	0,00 ± 0,00
							3x/Woche					
29	56	20,0	w	0	Vit. D, Mg	2	Chips, Bratkartoffeln, Knäckebrot, Kekse;	5,4	99,30	< 5	0,96	0,00 ± 0,00

Forsetzung Tabelle 73

							ein Produkt pro						
							Tag						
30	25	20,9	w	0	-	1	Mensapommes	4,7	97,60	< 5	3,16	3,74 ± 0,29	
31	21	31,2	m	0	-	3–4	-	5,0	92,10	< 5	2,23	9,36 ± 7,46	
32	28	23,6	m	0	Proteinpulver	1–2	Ofenkartoffeln	4,8	84,00	< 5	0,60	0,00 ± 0,00	
							1x/Woche						
33	21	25,3	m	0	-	3–4	Mensapommes	4,6	93,60	< 5	2,10	0,50 ± 0,0	
34	30	31,4	m	10–20	-	9	Mensapommes, Bratkartoffeln	4,6	100,10	777	2,39	325,1	4,32 ± 2,75
35	29	31,7	w	0	Priorin, Vit.-B Komplex- Kapseln	1–2	Cornflakes	4,9	76,90	< 5	0,73	1,25 ± 0,68	
							3–4x/Woche						
36	24	20,7	w	0	-	2	Mensapommes, Chips	5,1	94,10	< 5	3,40	0,00 ± 0,00	
							1x/Woche						
37	25	18,9	w	0	-	2	Mensapommes, Pizza, Müsli, Kekse	4,6	75,20	33,7	1,33	25,3	0,00 ± 0,00
							täglich						

Fortsetzung Tabelle 73

38	25	22,5	w	0	-	1	Knäckebrot und Kekse 1x/Woche	4,8	91,20	< 5	2,11		0,00 ± 0,00
39	20	20,9	m	0	-	1–2	Mensapommes, Chips und Snacks 1x/Woche	4,4	87,10	9,48	1,80	5,3	0,00 ± 0,00
40	48	20,7	w	0	Eisen	2		4,9	90,50	< 5	0,33		1,18 ± 0,03
41	23	28,3	w	0	-	1	Chips und Pommes 1x/Woche	4,6	81,84	< 5	0,22		0,50 ± 0,00
42	20	21,5	w	0	Folsäure, Mg, Ca	1		4,5	87,46	< 5	1,05		1,66 ± 0,73
43	23	17,8	w	0	Vit. D	1	gelegentlich, max 1x/Woche, kleine Mengen	4,8	89,67	< 5	0,36		0,55 ± 0,35
44	24	23,3	m	0	Vitamine/Mg	0	Mensapommes/ gelegentlich Cornflakes	4,7	104,52	< 5	1,57		3,66 ± 0,02
45	27	30,1	m	0	-	5–6	-	4,7	100,92	< 5	1,44		1,09 ± 0,26

7. Anhang

Fortsetzung Tabelle 73

46	31	30,2	m	0	-	1-2	-	4,5	93,61	< 5	1,84	1,77 ± 0,71
47	29	27,9	m	0	-	3	Mensapommes, Chips, Kekse 1x/Woche	5,2	100,46	< 5	3,79	0,00 ± 0,00
48	21	19,7	m	0	-	1	Mensapommes 1x/Woche	4,8	89,09	< 5	2,20	0,20 ± 0,00
49	27	21,6	m	0	-	2-3	Mensapommes, Bratkartoffeln	4,9	100,11	< 5	3,44	0,50 ± 0,00
50	26	20,6	w	0	-	0	-	4,8	112,06	< 5	2,05	0,92 ± 0,42
51	32	29,8	m	0	-	2	täglich eins der genannten Produkte	5,0	87,00	< 5	2,14	1,91 ± 0,02
52	27	31,0	m	0	-	5-6	Cornflkes 2x/Woche, Pommes 1x/Woche	5,1	98,95	< 5	2,05	1,22 ± 0,74
53	28	19,9	m	0	-	0	Chips 1x/Woche	4,8	103,82	< 5	2,10	2,42 ± 0,17
54	54	31,9	w	10-15	-	2	-	5,5	110,20	1190	0,69	1724,6 5,23 ± 0,20
55	26	22,9	w	0	Mg,Proteine	8-10	Knäckebrot	5,3	96,70	< 5	1,11	26,59±0,01

Fortsetzung Tabelle 73

							2x/Woche					
56	37	20,5	w	0	-	2	max. 1 Produkt pro Woche	5,0	84,68	< 5	0,54	1,09 ± 0,34
57	26	21,4	w	0	-	0	Mensapommes	4,5	90,36	< 5	0,22	0,97 ± 0,50
58	27	17,0	m	0	-	1	Mensapommes, unregelmäßig Snacks (Chips, Salzstängchen)	5,0	97,20	< 5	0,30	0,00 ± 0,00
59	22	19,3	m	0	-	0	Mensapommes	4,5	91,64	< 5	0,58	0,50 ± 0,00
							1x/Woche					
60	34	27,6	m	1	-	4	-	5,2	101,50	40	2,91	0,00 ± 0,00

Tabelle 74: Statistik Humanstudie: Korrelationstest nach Spearman. Angegeben sind die Korrelationskoeffizienten.

	Alter	Gew. [kg]	Größe [m]	BMI	Raucher	Zigaretten / Tag	NEM	Kaffee Tassen /Tag	Konsum hocherh stärkeh Pro	HbA1c	nüchtern Glc.	Kreatinin [g/l]	Cotinin	Cotinin [µg/g Kreatinin]	DNA Addukte [Addukte pro 10 ⁸ Nucleoside]
Alter	1.000	0.048	-0.054	0.133	0.253	0.264	0.186	0.295	-0.141	0.264	0.157	-0.064		0.514	0.008
Gewicht [kg]	0.048	1.000	0.558	0.886	0.292	0.298	-0.133	0.598	-0.019	0.168	0.243	0.202		0.173	0.300
Größe [m]	-0.054	0.558	1.000	0.170	0.204	0.189	-0.157	0.290	0.028	0.082	0.146	0.252		-0.032	0.082
BMI	0.133	0.886	0.170	1.000	0.253	0.267	-0.054	0.513	-0.027	0.187	0.189	0.096		0.436	0.352
Raucher	0.253	0.292	0.204	0.253	1.000	0.997	0.032	0.382	-0.088	0.198	0.151	0.013		0.837	0.058
Zigaretten / Tag	0.264	0.298	0.189	0.267	0.997	1.000	0.028	0.387	-0.079	0.198	0.164	0.016	0.840	0.767	0.085
NEM	0.186	-0.133	-0.157	-0.054	0.032	0.028	1.000	0.066	0.018	0.060	-0.091	-0.251		0.065	0.015
Kaffee Tassen/ Tag	0.295	0.598	0.290	0.513	0.382	0.387	0.066	1.000	-0.074	0.195	0.170	0.234	0.342	0.302	0.068
Konsum hocherh stärkeh Pro.	-0.141	-0.019	0.028	-0.027	-0.088	-0.079	0.018	-0.074	1.000	-0.010	-0.151	0.019		-0.400	-0.150
HbA1c	0.264	0.168	0.082	0.187	0.198	0.198	0.060	0.195	-0.010	1.000	0.237	0.320		0.475	0.171
nüchtern Glc.	0.157	0.243	0.146	0.189	0.151	0.164	-0.091	0.170	-0.151	0.237	1.000	0.320		0.245	0.216
Kreatinin [g/l]	-0.064	0.202	0.252	0.096	0.013	0.016	-0.251	0.234	0.019	-0.059	0.320	1.000		-0.618	-0.001
Cotinin						0.840		0.342							0.019
Cotinin [µg/g Kreatinin]	0.514	0.173	-0.032	0.436	0.837	0.767	0.065	0.302	-0.400	0.475	0.245	-0.618		1.000	0.292

Fortsetzung Tabelle 74

DNA Addukte [Addukte pro 10⁸ Nukleotide]	0.008	0.300	0.082	0.352	0.058	0.085	0.015	0.068	-0.150	0.171	0.216	-0.001	0.019	0.292	1.000
DNA Addukte [Addukte pro 10⁸ Nukleotide] ohne Ausreißer	0.048	0.292	0.087	0.333	0.086	0.084	-0.028	0.065	-0.110	0.142	0.221	-0.029	0.018	0.292	1.000

Tabelle 75: Statistik Humanstudie: Korrelationstest nach Spearman. Angegeben sind die p-Werte.

	Alter	Gew. [kg]	Größe [m]	BMI	Raucher	Zigaretten / Tag	NEM	Kaffee Tassen /Tag	Konsum hocherh stärkeh Pro	HbA1c	nüchtern Glc.	Kreatinin [g/l]	Cotinin	Cotinin [µg/g Kreatinin]	DNA Addukte [Addukte pro 10 ⁸ Nucleoside]
Alter	0.000	0.718	0.684	0.311	0.051	0.042	0.154	0.022	0.282	0.042	0.231	0.628		0.106	0.949
Gewicht [kg]	0.718	0.000	0.000	0.000	0.024	0.021	0.310	0.000	0.883	0.198	0.062	0.121		0.614	0.020
Größe [m]	0.684	0.000	0.000	0.194	0.118	0.148	0.232	0.025	0.829	0.532	0.264	0.052		0.926	0.532
BMI	0.311	0.000	0.194	0.000	0.051	0.039	0.683	0.000	0.837	0.153	0.148	0.465		0.183	0.006
Raucher	0.051	0.024	0.118	0.051	0.000	0.000	0.810	0.003	0.505	0.130	0.248	0.923		0.001	0.658
Zigaretten / Tag	0.042	0.021	0.148	0.039	0.000	0.000	0.834	0.002	0.550	0.129	0.209	0.904	0.000	0.000	0.520
NEM	0.154	0.310	0.232	0.683	0.810	0.834	0.000	0.618	0.891	0.650	0.489	0.053		0.850	0.908
Kaffee Tassen/ Tag	0.022	0.000	0.025	0.000	0.003	0.002	0.618	0.000	0.575	0.135	0.193	0.071	0.007	0.019	0.604
Konsum hocherh stärkeh Pro.	0.282	0.883	0.829	0.837	0.505	0.550	0.891	0.575	0.000	0.937	0.249	0.883		0.223	0.251
HbA1c	0.042	0.198	0.532	0.153	0.130	0.129	0.650	0.135	0.937	0.000	0.068	0.656		0.140	0.191
nüchtern Glc.	0.231	0.062	0.264	0.148	0.248	0.209	0.489	0.193	0.249	0.068	0.000	0.013		0.468	0.097
Kreatinin [g/l]	0.628	0.121	0.052	0.465	0.923	0.904	0.053	0.071	0.883	0.656	0.013	0.000		0.048	0.996
Cotinin						0.000		0.007							0.886
Cotinin [µg/g Kreatinin]	0.106	0.614	0.926	0.183	0.001	0.000	0.850	0.019	0.223	0.140	0.468	0.048		0.000	0.384

Fortsetzung Tabelle 75

DNA	0.949	0.020	0.532	0.006	0.658	0.520	0.908	0.604	0.251	0.191	0.097	0.996	0.886	0.384	0.000
Addukte															
[Addukte															
pro 10⁸															
Nukleotide															
]															
DNA	0.723	0.026	0.518	0.011	0.523	0.422	0.834	0.540	0.411	0.288	0.096	0.828	0.850	0.384	
Addukte															
[Addukte															
pro 10⁸															
Nukleotide															
] ohne															
Ausreißer															

Tabelle 76: Statistik zur Humanstudie. Ergebnisse des Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit $\alpha = 5\%$. Mit NEM: Nahrungsergänzungsmittel

	p-Wert	Bemerkung
Raucher <i>versus</i> Nichtraucher	0.6623	kein Unterschied
Konsumenten hoch erhitzter LM <i>versus</i> Nichtkonsumenten	0.2521	kein Unterschied
Konsumenten von NEM <i>versus</i> Nichtkonsumenten	0.2934	kein Unterschied

Tabelle 77: Statistik zur Humanstudie. Ergebnisse ANOVA.

	p-Wert	Bemerkung
Alter	0,97	kein Unterschied
BMI	0,56	kein Unterschied
Geschlecht	0,52	kein Unterschied
Gewicht	0,72	kein Unterschied

Fragebogen zur Humanstudie**Lebensmittelchemie und Toxikologie****Prof. Dr.med. Dr. rer. nat. D. Schrenk**

Erwin-Schrödinger-Straße

Gebäude 52/322

67663 Kaiserslautern

Telefon: 0631 205-3043, 3217

Telefax: 0631 205-4398

schrenk@rhrk.uni-kl.de

Fragebogen zur Studie

Nachweis und Quantifizierung des DNA-Addukts***N*⁷-Glycidamid-Guanin in Humanblut**

Sehr geehrte Probandin, sehr geehrter Proband

Mit der Unterschrift der Einwilligungserklärung haben Sie sich freundlicherweise bereit erklärt, an einer Studie mit dem Ziel des Nachweises und Quantifizierung des DNA-Addukts *N*⁷-Glycidamid-Guanin, teilzunehmen.

Bitte füllen Sie dazu nachfolgenden Fragebogen aus.

Ihre Antworten werden streng vertraulich behandelt.

1. Ihr AlterJahre
2. Ihr Geschlecht?männlichweiblich
3. Ihr Körpergewicht?kg
4. Rauchen Sie?janein
Wenn ja wie viel pro Tag?Zigaretten/Tag
5. Haben Sie in der Vergangenheit geraucht?janein

- Wenn ja, ist der Konsum von Zigaretten mindestens ein Jahr her?janein
6. Sind Sie schwanger?janein
7. Welche Aussagen hinsichtlich Ihrer Ernährungsgewohnheiten treffen zu?
- A) Sind Sie Vegetarier/in?janein
- B) Sind Sie Veganer/in?janein
- C) Nehmen sie Nahrungsergänzungsmittel zu sich?janein
Wenn ja, welche?
- D) Trinken sie regelmäßig Kaffee,janein
wenn ja wie viele Tassen (1Tasse 250mL) am Tag?
- E) Verzehren sie regelmäßig (einmal pro Woche) folgende Lebensmittel
Chips, Pommes Frites, Bratkartoffeln, Kartoffelpuffer, Knäkebrot, Kekseja
....nein
Wenn ja was und wie regelmäßig?
8. Leiden oder litten sie an einer der nachfolgenden Krankheiten?
- A) Diabetesjanein
- B) Infektionskrankheiten (z.B. Tuberkulose, Hepatitis, AIDS)janein
- C) Lebererkrankungenjanein
- D) Herzerkrankungen (Herzinfarkt)janein
- E) Zu hoher Blutdruckjanein
- F) Zu niedriger Blutdruckjanein
- G) Nierenerkrankungenjanein
- H) Schlaganfalljanein
- I) Magen-Darmerkrankungenjanein
- J) Schilddrüsenerkrankungenjanein
- K) Rheuma oder rheumatisches Fieberjanein
- L) Asthma oder andere Lungenerkrankungenjanein
- M) Blutkrankheiten oder Blutgerinnungsstörungenjanein
- N) Nervenerkrankungenjanein
- O) Anfallsleiden (Epilepse?)janein

.....
Ort, Datum, Unterschrift Proband/in

Permissions/ Copyright

Sämtliche **Abbildungen zur Kristallstruktur der Verbindung GA:**

Abbildung 14: Strukturen der bei der Synthese des GA gebildeten Enantiomeren A und B.

Abbildung 15: Festkörper Struktur der Verbindung GA.

Abbildung 16: Anordnung der β -Faltblattstruktur.

Abbildung 17: Darstellung der beiden Enantiomere.

aus Hemgesberg *et al.* (2016).

Re: 1. Hemgesberg MN, Bonk T, Merz KH, Sun Y, Schre...



Voll:

Von: Checking email

24.02.2020 um :

Dear Melanie,

Thank you for your email.

The article you mention was published under an open-access licence, so there is no problem with permissions and you are free to use the material as described below. Under the open-access licence you are required to cite the original work, but there are no other restrictions.

With best wishes,

Gillian

Dr Gillian Holmes
Managing Editor, Acta Crystallographica Section E and IUCrData

International Union of Crystallography
5 Abbey Square, Chester, CH1 2HU, England
Tel: +44 1244 342878 Fax: +44 1244 314888
E-mail: checkin@iucr.org

On Saturday 22 February 2020 08:07:25 you wrote:

- > Message from "Contact Us" web form from Melanie Nicole Hemgesberg
- >
- > email: melanie-nicole-heyer@web.de
- >
- > Subject: 1. Hemgesberg MN, Bonk T, Merz KH, Sun Y, Schrenk D (2016). Crystal
- > structure of Glycidamide: the mutagenic and genotoxic metabolite of
- > acrylamide. Acta Crystallographica, E72: 1179-1182. re:
- >
- > Enquiry: type Permission requests
- >

Abbildung 41: Neubauer Zählkammer

Aus **Lindl T, Gstraunthaler G (2013)**. Zell und Gewebekultur. 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 122.

SPRINGER NATURE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Feb 24, 2020

This Agreement between TU Kaiserslautern -- Melanie Hemgesberg ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4774080405090
License date	Feb 22, 2020
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Springer eBook
Licensed Content Title	Bestimmung allgemeiner Wachstumsparameter
Licensed Content Author	Gerhard Gstraunthaler, Toni Lindl
Licensed Content Date	Jan 1, 2013
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	2
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no
Title	Bestimmung von Acrylamid bzw. Glycidamid-DNA-Addukten in Humanblut und tierischen Geweben
Institution name	TU Kaiserslautern
Expected presentation date	Apr 2020
Portions	Figures 12-1 and 12-2
	TU Kaiserslautern Richrather Straße 23

**Springer Nature Customer Service Centre GmbH
Terms and Conditions**

This agreement sets out the terms and conditions of the licence (the **Licence**) between you and **Springer Nature Customer Service Centre GmbH** (the **Licensor**). By clicking 'accept' and completing the transaction for the material (**Licensed Material**), you also confirm your acceptance of these terms and conditions.

1. Grant of Licence

1. 1. The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, world-wide licence to reproduce the Licensed Material for the purpose specified in your order only. Licences are granted for the specific use requested in the order and for no other use, subject to the conditions below.
1. 2. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of the Licensed Material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).
1. 3. If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Scope of Licence

2. 1. You may only use the Licensed Content in the manner and to the extent permitted by these Ts&Cs and any applicable laws.
2. 2. A separate licence may be required for any additional use of the Licensed Material, e.g. where a licence has been purchased for print only use, separate permission must be obtained for electronic re-use. Similarly, a licence is only valid in the language selected and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence. Any content owned by third parties are expressly excluded from the licence.
2. 3. Similarly, rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to

Please apply to Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com for these rights.

2. 4. Where permission has been granted **free of charge** for material in print, permission may also be granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
2. 5. An alternative scope of licence may apply to signatories of the [STM Permissions Guidelines](#), as amended from time to time.

3. Duration of Licence

3. 1. A licence for is valid from the date of purchase ('Licence Date') at the end of the relevant period in the below table:

Scope of Licence	Duration of Licence
Post on a website	12 months
Presentations	12 months
Books and journals	Lifetime of the edition in the language purchased

4. Acknowledgement

4. 1. The Licensor's permission must be acknowledged next to the Licenced Material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.

5. Restrictions on use

5. 1. Use of the Licensed Material may be permitted for incidental promotional use and minor editing privileges e.g. minor adaptations of single figures, changes of format, colour and/or style where the adaptation is credited as set out in Appendix 1 below. Any

7. Anhang

other changes including but not limited to, cropping, adapting, omitting material that affect the meaning, intention or moral rights of the author are strictly prohibited.

5. 2. You must not use any Licensed Material as part of any design or trademark.

5. 3. Licensed Material may be used in Open Access Publications (OAP) before publication by Springer Nature, but any Licensed Material must be removed from OAP sites prior to final publication.

6. Ownership of Rights

6. 1. Licensed Material remains the property of either Licensor or the relevant third party and any rights not explicitly granted herein are expressly reserved.

7. Warranty

IN NO EVENT SHALL LICENSOR BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL OR INDIRECT DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

8. Limitations

8. Limitations

8. 1. **BOOKS ONLY:** Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).

9. Termination and Cancellation

9. 1. Licences will expire after the period shown in Clause 3 (above).

9. 2. Licensee reserves the right to terminate the Licence in the event that payment is not received in full or if there has been a breach of this agreement by you.

8. Curriculum Vitae

Angaben zur Person

Name, Vorname: Hemgesberg (geb. Heyer), Melanie Nicole

Berufstätigkeit

Seit Januar 2019

BASF Personal Care and Nutrition GmbH als Managerin Product Stewardship

Hochschulausbildung

Technische Universität Kaiserslautern; 04/2015 bis 06/2018

Promotion im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie in der Arbeitsgruppe von Herr Prof. Dr. Dr. Schrenk;

Thema: Bestimmung von Acrylamid bzw. Glycidamid-DNA-Addukten in Humanblut und tierischen Geweben

Technische Universität Kaiserslautern; 10/2009 bis 09/2014

Studium der Lebensmittelchemie, Diplomarbeit im AK von Junioprof. M. Esselen;

Thema: Gentoxizität von Asaron-Isomeren in transfizierten V79-Zellen

Abschluss: Diplom – Lebensmittelchemiker (1,3)

Praktika

Unilever Deutschland GmbH; Heilbronn; 01/2013 bis 06/2013

freiwilliges Industriepraktikum im Bereich Specification Management

Weiterbildungen und Zertifikate

Fortbildung zum Geprüften Qualitätsexperten GxP (GDCh); erfolgreiche Prüfung 2019

- Die Qualitätssysteme GMP (Gute Herstellungspraxis) und GLP (Gute Laborpraxis) im Überblick-Ein Leitfadender Guten Praxis
- Methodvalidierung in der Analytischen Chemie unter Berücksichtigung verschiedener QS-Systeme
- GLP-Intensivtraining mit QS-Übungsaufgaben: Methodvalidierung und Gerätequalifizierung unter GLP (Gute Laborpraxis) - mit Praxisteil
- GMP-Intensivtraining: Hintergründe und Essentials der GMP (Gute Herstellungspraxis) auf deutscher europäischer und amerikanischer Ebene - mit Praxisteil

Fortbildung im Bereich Durchflusszytometrie; seit März 2016

- Grundkurs-Einführung in die Durchflusszytometrie BDFACSCanto II Durchflusszytometer und BDFACSDivaSoftware
- Durchflusszytometrie für Anfänger

Weiterbildung zum Fachtoxikologen der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT); seit Februar 2015

- Grundlagen der Organtoxikologie und Pathologie1
- molekulare Zelltoxikologie
- Lebensmitteltoxikologie
- Versuchstierkunde und Biostatistik 1
- Fremdstoffmetabolismus und Toxikokinetik
- chemische Kanzerogenese und Mutagenese
- Fremdstoffallergie /Immuntoxikologie
- Grundlagen der Organtoxikologie und Pathologie2
- Epidemiologische Methoden
- Klinische Toxikologie
- Regulatorische Toxikologie
- Expositionsermittlung und Expositionsbeurteilung

- Reproduktionstoxikologie

Fortbildungen im Bereich LC-MS/MS; seit März 2015

- Liquid Chromatography and mass spectrometry; Powerful Tools for Detection, Quantification and structural elucidation
- Fehlersuche und Problembehebung in der LC-MS/MS

Fortbildungen im Bereich HPLC/UHPLC; seit Mai 2015

- HPLC-Methodenentwicklung
- HPLC-Troubleshooting: Fehler erkennen, beheben und vermeiden

Stipendien und Preise

- Fachbereichsstipendium der TU Kaiserslautern (04/2017 bis 03/2018)
- Chemiefond-Stipendium des Fonds der chemischen Industrie (FCI) (04/2015 bis 03/2017)
- Kofrányi-Preis für die beste Abitur-Schülerleistung im Fach Ernährungslehre im Regierungsbezirk Stuttgart (15 Punkte)

Mitgliedschaften

- Seit 2014 in der Gesellschaft für Toxikologie (GT) in der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT)

Publikationen

1. **Hemgesberg MN**, Bonk T, Merz KH, Sun Y, Schrenk D (**2016**). Crystal structure of Glycidamide: the mutagenic and genotoxic metabolite of acrylamide. *Acta Crystallographica*, E72: 1179-1182.
2. Hauptenthal S, Berg K, Gründkern M, Vallicotti S, **Hemgesberg M**, Sak K, Schrenk D, Esselen M (**2016**). In vitro Genotoxicity of carcinogenic Asarone Isomers. *Food & Function*, 8 (3): 1227-1234.
3. **Heyer M** (**2013**). Dem KopiLuwak auf der Spur. *ChemieXtra* (10):36-38.
4. **Heyer M** und Hemgesberg M (**2013**). Krank durch Zucker: Fructose auf dem Prüfstand. *ChemieXtra* (11): 36-38.

Poster

1. **Hemgesberg MN**, Stadler I, Schrenk D (**2016**). Optimized leucocyte isolation from human buffy coats. 82. DGPT-Jahrestagung, Berlin, Deutschland.
2. Übel T, Groh IAM, **Hemgesberg M**, Vallicotti S, Esselen M (**2015**). Genotoxicity of phenylpropanoids in mammalian cells. 28. GUM-Tagung, Düsseldorf, Deutschland.
3. Übel T, **Heyer M**, Vallicotti S, Esselen M (**2015**). Phenylpropanoids induce oxidative DNA strand breaks in mammalian cells. 81. DGPT-Jahrestagung, Kiel, Deutschland.
4. Hauptenthal S, Vallicotti S, **Hemgesberg M**, Esselen M (**2015**). The alkaline comet assay as a method to investigate the DNA strand breaking effect of phenylpropanoids in mammalian cells. ICAW – 11th international Comet Assay Workshop, Deutschland.
5. Hauptenthal S, Vallicotti S, **Heyer M**, Sak K, Berg K, Schrenk D, Esselen M (**2014**). DNA-schädigende Wirkung von α -Asaron und β -Asaronin V79-Zellen. 43. Deutscher Lebensmitteltag, Gießen, Deutschland.

.....
Langenfeld, den

Melanie Nicole Hemgesberg