

Metabolismus und Toxizität von 2-Methylfuran

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

DE - 386



vorgelegt von

Lebensmittelchemikerin, M.Sc.

Verena Kirsch

geboren in Kirchheimbolanden

Betreuerin: Prof. Dr. Elke Richling

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 30. Juni 2022

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2017 bis März 2021 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Elke Richling durchgeführt.

Prüfungskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. Werner Thiel

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. Elke Richling

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Georg Manolikakes

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Kurzzusammenfassung	VII
Abstract	VIII
1. Einleitung	1
2. Kenntnisstand	3
2.1. Allgemeine Grundlagen	3
2.1.1. Fremdstoffmetabolismus	3
2.1.2. Toxikologische Beurteilung	5
2.2. 2-Methylfuran (MF)	7
2.2.1. Physikalisch-chemische Eigenschaften	7
2.2.2. Bildung und Vorkommen	8
2.2.3. Toxikokinetik	11
2.2.3.1. ADME	11
2.2.3.2. Metabolische Aktivierung	11
2.2.3.3. Exkretion und Biomonitoring	14
2.2.4. Toxikodynamik	15
2.2.4.1. Akute Toxizität	15
2.2.4.2. Subakute Toxizität	15
2.2.4.3. Gentoxizität und Mutagenität	16
2.2.5. Risikobewertung	17
3. Problemstellung	20
4. Ergebnisse & Diskussion	23
4.1 <i>In silico</i> Betrachtung von 2-Methylfuran	23
4.1.1. Kategorisierung von MF via <i>ToxTree</i>	23
4.1.2. Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehung von MF via <i>QSAR toolbox</i>	27
4.2 Synthese, Charakterisierung und Reaktivität <i>in chemico</i> von 3-Acetylacrolein (AcA) und dessen Addukten	35
4.2.1 3-Acetylacrolein	36
4.2.1.1 Synthese von AcA	36
4.2.1.2 Charakterisierung und Stabilität von AcA	37
4.2.2 Aminosäure-Addukte von AcA <i>in chemico</i>	50
4.2.2.1 Das Addukt AcCys-AcA	51
4.2.2.2 Das Addukt AcLys-AcA	57

4.2.2.3	Reaktivität von AcA gegenüber AcLys und AcCys <i>in chemico</i>	78
4.2.3	DNA-Addukte von AcA <i>in chemico</i>	81
4.2.3.1	Das Addukt dC-AcA	81
4.2.3.2	Das Addukt dG-AcA.....	85
4.2.3.3	Das Addukt dA-AcA.....	89
4.2.3.4	Quantifizierung der DNA-Addukte von AcA.....	92
4.2.3.5	Reaktivität von AcA mit DNA <i>in chemico</i>	94
4.3	Metabolische Aktivierung von 2-Methylfuran.....	100
4.3.1	Bildung von 3-Acetylacrolein.....	102
4.3.2	Enzymkinetische Parameter	106
4.3.3	Umsatzrate von MF	111
4.4	Adduktbildung und Toxizität von 2-Methylfuran und 3-Acetylacrolein <i>in vitro</i>	113
4.4.1	Zytotoxizität von MF und AcA <i>in vitro</i>	113
4.4.2	Bildung von Aminosäure-Addukte <i>in vitro</i>	116
4.4.2.1	Bildung von AcCys-AcA in pRH.....	116
4.4.2.2	Bildung von AcLys-AcA in pRH	117
4.4.3	Bildung von DNA-Addukte <i>in vitro</i>	121
5	Zusammenfassung & Ausblick	125
6	Experimenteller Teil	132
6.1	Allgemeines.....	132
6.2	Material.....	132
6.3	<i>In silico</i> Betrachtung von 2-Methylfuran	139
6.3.1	<i>ToxTree</i>	139
6.3.2	<i>QSAR toolbox</i> (der OECD)	140
6.4	Synthesen.....	144
6.4.1	Synthese von Dimethyldioxiran (DMDO)	145
6.4.2	Synthese von 3-Acetylacrolein	146
6.4.3	Synthese von AcCys-AcA	148
6.4.4	Synthese von AcLys-AcA.....	149
6.4.5	Synthese von AcLys-BDA	151
6.4.6	Synthese von dA-AcA.....	152
6.4.7	Synthese von [¹⁵ N ₅]-dA-AcA	153
6.4.8	Synthese von dG-AcA	154
6.4.9	Synthese von [¹⁵ N ₅]-dG-AcA	155
6.4.10	Synthese von dC-AcA	156
6.5	Präparative und analytische (U)HPLC-Methoden.....	157
6.5.1	Präparative Methoden	157
6.5.2	Analytische Methoden	160
6.5.2.1	Massenspektrometrische Untersuchung von AcA	160

6.5.2.2. Quantifizierung von AcCys-AcA	161
6.5.2.3. Quantifizierung von AcLys-AcA.....	164
6.5.2.4. Quantifizierung von DNA-Addukten	171
6.5.2.5. Quantifizierung von 2'-Desoxyguanosin	179
6.6. Reaktivität von 3-Acetylacrolein <i>in chemico</i>	183
6.7. Metabolische Aktivierung von 2-Methylfuran.....	186
6.8. Adduktbildung und Toxizität von 2-Methylfuran und 3-Acetylacrolein <i>in vitro</i>	192
6.8.1. Zellkultur permanenter Zelllinien.....	192
6.8.2. Isolierung und Kultivierung primärer Rattenhepatozyten (pRH)	195
6.8.3. Bestimmung der Zytotoxizität von MF und AcA	196
6.8.4. Inkubation pRH mit MF und AcA zur Bestimmung der Adduktbildung	199
6.8.5. Aminosäure-Addukte in Zellüberständen pRH.....	200
6.8.6. DNA-Addukte in pRH	202
6.9. Statistik und mathematische Formeln	206
Literaturverzeichnis	207
Abbildungsverzeichnis	216
Tabellenverzeichnis	222
Anhang	i
Eigene Publikationen	i
Lebenslauf.....	ii
Danke.....	v
Erklärung.....	vii

Abkürzungsverzeichnis

AcA	3-Acetylacrolein
AcCys	N-Acetyl-L-Cystein
AcLys	N _α -Acetyl-L-Lysin
ADI	akzeptable, tägliche Aufnahmemengen (engl.: <i>acceptable daily intake</i>)
ADME	Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion
ALARA/ALARP	engl.: <i>as low als reasonably achievable/practicable</i>
ALT	Alanin-Aminotransaminase
AP	Alkalische Phosphase
AST	Aspartat-Aminotransaminase
BDA	<i>cis</i> -2-Buten-1,4-dial
BMDL ₁₀	Bezugspunktdosis der unteren Konfidenzgrenze bei 10 % Wirkung (engl.: <i>benchmark dose, lower confidence limit(s) at 10 % response</i>)
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
CL _{int}	intrinsische Clearance <i>in vitro</i>
CONTAM Panel	wissenschaftliches Gremium für Kontaminanten in der Lebensmittelkette der EFSA (eng.: <i>scientific panel on contaminants in the food chain</i>)
CYP	Cytochrom P450
dA	2'-Desoxyadenosin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dC	2'-Desoxycytosin
dG	2'-Desoxyguanosin
DHDMFu	2,5-Dihydro-2,5-dimethoxy-furan
DHDMMF	2,5-Dihydro-2,5-dimethoxy-2-methylfuran
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagles Medium</i>
DMF	2,5-Dimethylfuran
DMSO(-d ₆)	(deuteriertes) Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DOSY	Diffusionsgeleitete Spektroskopie (engl.: <i>diffusion ordered spectroscopy</i>)
dR	2'-Desoxyribose
dT	2'-Desoxythymidin
EC ₃	Effektive Konzentration (engl.: <i>effecitve concentration</i>) mit dreifach erhöhtem Effekt zur Negativkontrolle, sensibilisierende Potenz
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration, engl.: <i>half maximal effective concentration</i>
E _{cat}	Katalytische Effizienz
ECHA	Europäische Chemikalien-Agentur (engl.: <i>European Chemicals Agency</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (engl.: <i>European Food Safety Authority</i>)
EK	Endkonzentration
EL	Endlösung
EMS	Erweiterte massenspektrometrische Messungen (engl.: <i>enhanced mass spectrometry</i>)
FFA	Furfurylalkohol

FKS	Fetales Kälberserum
GL	Gebrauchslösung
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H,H-COSY	engl.: <i>H,H-correlated spectroscopy</i>
HMBC	engl.: <i>heteronuclear multiple bond coherence</i>
HMQC	engl.: <i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HLM	Humane Lebermikrosomen
HPLC-MS/MS	Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit Tandemmassenspektroskopie, engl.: <i>high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (triple quad)</i>
HS-SPME	<i>Headspace</i> -Festphasen-Mikroextraktion (engl.: <i>Headspace solid phase micro extraction</i>)
hSULT	humane Sulfotransferase
IL	Inkubationslösung
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravenös
Kap.	Kapitel
K_{cat}	Wechselzahl
KG	Körpergewicht
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LM	Lösungsmittel
LC	Flüssigchromatographie (engl.: <i>liquid chromatography</i>)
LOD	Nachweisgrenze, Detektionsgrenze (engl.: <i>limit of detection</i>)
log P	n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
LOQ	Bestimmungsgrenze, Quantifizierungsgrenze (engl.: <i>limit of quantification</i>)
mCPBA	<i>m</i> -Chlorperbenzoesäure (engl.: <i>m-chloroperoxybenzoic acid</i>)
MeCN- d_3	(deuteriertes) Acetonitril
MF	2-Methylfuran
3-MF	3-Methylfuran
MOA	engl.: <i>Mode of action</i>
MOE	engl.: <i>Margin of exposure</i>
MRM	engl.: <i>Multiple reaction monitoring</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie (engl.: <i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie (engl.: <i>mass spectrometry</i>)
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MWD	Multiwellenlängendetektor
NAD(P) ⁺	oxidierte Form von Nicotinamiddinukleotid(phosphat)
NAD(P)H	reduzierte Form von Nicotinamiddinukleotid(phosphat)
NK	Negativkontrolle
NMR	engl.: <i>nuclear magnetic resonance</i>
NOAEL	engl.: <i>no observed adverse effect level</i>
NOEL	engl.: <i>no observed effect level</i>
OECD	Organisation für Zusammenarbeit und Entwicklung (engl. <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>)
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PBS	Phosphatpufferlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PK	Positivkontrolle

<i>p.o.</i>	<i>per oral</i>
pRH	primäre Rattenhepatozyten
QSAR	quantitative Struktur-Wirkungs-Analyse (engl.: <i>quantitative structure-activity-relationship</i>)
RAAF	engl.: <i>read-across assessment framework</i>
REACH-Verordnung	Verordnung für die Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien (engl.: <i>registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals</i>)
RLM	Rattenlebermikrosomen
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl.: <i>reactive oxygen species</i>)
RPMI 1640	Medium entwickelt von Roswell Park Memorial Institute
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis (engl.: <i>signal-to-noise ratio</i>)
S9-Mix	Überstand von Leberhomogenat nach Zentrifugation mit 9000 <i>g</i> (engl.: <i>supernatant</i>)
SIVA	Stabilisotopenverdünnungsanalyse
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SL	Stammlösung
SGPT	Serum-Glutamat-Pyruvat-Transferase
SPE	Festphasenextraktion (engl.: <i>solid-phase extraction</i>)
SULT	Sulfotransferase
SS	Hautsensibilisierung (engl.: <i>skin sensitization</i>)
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin
TTC	engl.: <i>threshold of toxicological concern</i>
UGT	UPD-Glucuronosyl-Transferase
V_{\max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
ZV	Zwischenverdünnung

Multiplizitäten der NMR-Spektroskopie:

<i>s</i>	Singulett
<i>d</i>	Dublett
<i>t</i>	Triplett
<i>q</i>	Quartett
<i>p</i>	Quintett

Kurzzusammenfassung

2-Methylfuran (MF) ist eine Kontaminante, die vor allem in hitzebehandelten Lebensmitteln wie Kaffee oder Lebensmittelkonserven vorkommt. Jedoch ist die Datenlage für eine Risikobewertung lückenhaft hinsichtlich der Exposition und Toxizität (Knutsen *et al.*, 2017). *In vivo* Studien mit ¹⁴C-MF zeigten die Leber als Zielorgan histopathologischer Veränderungen, wie Nekrosen (Ravindranath *et al.*, 1986; Gill *et al.*, 2014). Es wurde die metabolische Aktivierung von MF zu reaktivem Acetylacrolein (AcA) angenommen, welches ein hohes Potential zeigte an Aminosäuren zu binden (Ravindranath *et al.*, 1984a; Ravindranath und Boyd, 1985). In dieser Arbeit wurden die molekularen und chemischen Mechanismen von MF und AcA untersucht, um Rückschlüsse auf die toxikologischen Effekte zu ermöglichen. Zunächst wurde MF *in silico* hinsichtlich seines toxikologischen Potentials klassifiziert und endpunktspezifisch quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR, engl. *quantitative structure-activity relationship*) analysiert. Positive toxikologische Abschätzungen basierten auf dessen metabolischer Aktivierung zu verschiedenen Metaboliten. Diese wurden in zwei Gruppen unterteilt, welche von AcA oder Furfurylalkohol (FFA) abstammten. Im Folgenden wurde AcA synthetisiert und dessen Reaktivität gegenüber *N*-Acetyl-L-cystein (AcCys), *N*_α-Acetyl-L-lysin (AcLys), 2'-Desoxyadenosin (dA), 2'-Desoxyguanosin (dG), 2'-Desoxycytosin (dC) sowie 2'-Desoxythymidin (dT) geprüft. Bis auf dT, welches keine Reaktivität zeigte, wurden alle Addukte von AcA charakterisiert, was die Entwicklung sensitiver Quantifizierungsmethoden via (U)HPLC-ESI^{+/−}-MS/MS ermöglichte. Anschließend wurde die metabolische Aktivierung von MF zu AcA unter Verwendung humaner (HLM) und Rattenlebermikrosomen (RLM) verifiziert und enzymkinetisch untersucht. Analog wurde die Umsetzung von MF mit CYP 2E1 charakterisiert, welches sich innerhalb der getesteten SupersomesTM CYP 1A2, 2A6, 2C9, 2D6, 2E1 und 3A4 als Schlüsselenzym herausstellte. Zuletzt wurde die Bildung der *in chemico* identifizierten AcA-Addukte *in vitro* untersucht. Hierzu wurde die Zytotoxizität von MF in primären Rattenhepatozyten (pRH) mit der in HepG2-Zellen verglichen als auch in Bezug zu der Zytotoxizität von AcA gesetzt. Wurden pRH mit MF und AcA inkubiert, konnte in den Zellüberständen AcLys-AcA zeit- und dosisabhängig nachgewiesen werden. Dies qualifiziert AcLys-AcA als potenzieller Biomarker. Gleichzeitig konnte hiermit gezeigt werden, dass AcA auch auf zellulärer Ebene gebildet wird. Dahingegen wurde weder AcCys-AcA noch die DNA-Addukte dA-AcA, dG-AcA oder dC-AcA *in vitro* nachgewiesen. Dies deutete auf eine effiziente Detoxifizierung, bzw. Reaktion mit Biomolekülen in der Zelle hin, obgleich die Induktion anderer DNA-Schäden, ggf. auch durch anderen Metabolit, nicht prinzipiell auszuschließen ist. So wurde erstmals *in vitro* AcA als reaktiver Metabolit von MF nachgewiesen und seine Addukte mit nukleophilen Zellbestandteilen als potenzielle Biomarker untersucht. Diese ermöglicht eine verbesserte Risikobewertung von MF.

Abstract

2-Methylfuran (MF) is a contaminant found primarily in heat-treated foods such as coffee or canned food. However, the data for risk assessment is not only incomplete in terms of exposure but also in terms of toxicity (Knutsen *et al.*, 2017). *In vivo* studies with ^{14}C -MF indicate that the liver is the target organ for histopathological changes, such as necrosis (Ravindranath *et al.*, 1986; Gill *et al.*, 2014). The metabolic activation of MF to the reactive intermediate acetylacrolein (AcA), which showed high potential to bind to amino acids, was assumed to be the fundamental cause (Ravindranath *et al.*, 1984a; Ravindranath and Boyd, 1985).

In this thesis, the molecular and chemical mechanisms of MF and AcA were investigated to draw conclusions about the toxicological effects of MF. To determine the toxicological potential of MF based on its structure, MF was first categorized and its endpoint-specific quantitative structure-activity relationships (QSAR) were analyzed *in silico*. Positive estimates were based on its metabolic activation to different metabolites, which were then divided into two groups derived from AcA or furfuryl alcohol (FFA). Based on the insights of the *in silico* analyses and existing literature, AcA was synthesized for further investigation as the most prominent metabolite. That enabled the testing of its reactivity toward *N*-acetyl-L-cysteine (AcCys), *N* $_{\alpha}$ -acetyl-L-lysine (AcLys), 2'-deoxyadenosine (dA), 2'-deoxyguanosine (dG), 2'-deoxycytosine (dC), and 2'-deoxythymidine (dT). Except for dT, which showed no reactivity, all adducts were characterized, allowing the development of sensitive quantification methods via (U)HPLC-MS/MS. In the next step, the metabolic activation of MF to AcA was verified using human (HLM) as well as rat liver microsomes (RLM) and characterized by enzyme kinetics. This was also possible for conversion with CYP 2E1, which was found to be a key enzyme within the tested supersomesTM CYP 1A2, 2A6, 2C9, 2D6, 2E1 and 3A4. The final part of this thesis focused on the formation of the defined AcA adducts *in vitro*. For this purpose, the cytotoxicity of MF in primary rat hepatocytes (pRH) and HepG2 cells was compared, before it was related to AcA in pRH. When pRH were incubated with MF and AcA, AcLys-AcA was detected in the cell supernatants in a time- and dose-dependent manner. Thus, AcLys-AcA qualifies as a potential biomarker. In addition, the results showed that AcA was indeed formed at the cellular level. Neither AcCys-AcA nor the DNA adducts dA-AcA, dG-AcA or dC-AcA were detected after *in vitro* incubations. This indicated efficient detoxification, or reaction with biomolecules in cells. Although induction of other DNA damage, possibly by other side metabolites, cannot be generally excluded.

In summary AcA was determined as a reactive metabolite of MF *in vitro*, its adduct formations with nucleophilic cellular components were characterized and investigated as potential biomarker *in vitro* for the first time. These results improve the risk assessment of MF.

1. Einleitung

2-Methylfuran (MF) ist als hitzeinduzierte Kontaminante in teilweise hohen Gehalten in Lebensmitteln zu finden. Insbesondere da sie durch thermische Behandlung aus ubiquitären Vorläufern wie Aminosäuren und Kohlenhydraten, aber auch Fettsäuren entstehen kann. Die Hauptexpositionsquelle für Erwachsene stellt Kaffee mit einem Gehalt von durchschnittlich 1328 µg/kg bis Höchstwerte von 8680 µg/kg dar (Fromberg *et al.*, 2014; Becalski *et al.*, 2010). Kleinkindern werden hingegen am stärksten durch Getreideprodukte wie Cerealien (23,5 µg/kg) oder Brei in Gläsern (68,3 µg/kg) belastet (Knutsen *et al.*, 2017; Habibi *et al.*, 2013). Dabei zeigten *in vivo* Versuche in Ratten leberschädigende Effekte von MF, die in ihrer Potenz vergleichbar mit den Auswirkungen von der besser untersuchten Kontaminante Furan ist. Diese wurde aufgrund ihrer hepatotoxischen und hepatokanzerogenen Wirkung in Ratten von der internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC, engl. *International Agency for Research on Cancer*) als „möglicherweise krebserregend im Mensch“ (Klasse 2B) eingestuft. Die Toxizität von Furan basiert auf der metabolischen Aktivierung zum reaktiven Intermediat *cis*-2-Buten-1,4-dial (BDA), welches mit nukleophilen Zellkomponenten reagieren kann. Während die Bildung von Proteinaddukten bereits *in vivo* nachgewiesen wurde, sind zwar kovalente Bindungen an DNA nach Furan-Exposition detektiert worden, jedoch konnten diese nicht BDA zugeordnet werden. Dennoch wurden mutagene Eigenschaften im Ames-Test und die Bildung von Cholangiofibrosen in einer Langzeitstudie mit Ratten beobachtet. Daher stellt sich für die Risikobewertung die Frage nach dem *Mode of Action* (MOA), sprich handelt es sich um ein genotoxisches Kanzerogen oder um einen indirekten Mechanismus (Knutsen *et al.*, 2017).

Für MF wird analog eine Cytochrom P450 (CYP)-vermittelte metabolische Aktivierung über oxidative Ringöffnung zu 3-Acetylacrolein (AcA) angenommen. Als α,β -ungesättigte Carbonylverbindung besitzt AcA das Potential mit Proteinen und DNA zu reagieren. Postuliert wurde eine Michael-Addition an die Doppelbindung oder nukleophile Addition an die Aldehyd- oder Ketogruppe (Ravindranath *et al.*, 1984a). Verteilungs- und Bindungsstudien mit ¹⁴C-markiertem MF zeigten zum einen die Bindung an Proteine und DNA *in vitro* als auch *in vivo*. Zum anderen wurden die höchsten Gehalte an radioaktiv markierter Substanz in Leber, gefolgt von Lunge, Niere und Blut, detektiert (Ravindranath *et al.*, 1986). Subakute *in vivo* Studien mit Ratten bestätigten die Leber als toxikologisches Hauptziel von MF. Nekrosen und Fibrosen wurden auch in geringerem Maße in der Lunge gefunden (Gill *et al.*, 2014). Jedoch fehlen Daten zur chronischen Exposition mit MF, um kanzerogene Effekte zu untersuchen, aber auch die chronische Belastung des Menschen realistischer abzuschätzen. Bisher wurde zur vorläufigen Risikoabschätzung durch das CONTAM Panel der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA, engl. *European Food Safety Authority*) die Gesamtexposition

von Furan, MF und 3-MF herangezogen. Bei Betrachtung der Zusammensetzung der Ernährung von Erwachsenen, lag in 50 % der Zusammensetzungen der *Margin of Exposure* (MOE) unter 100. Für dessen Berechnung wurde die Induktion von Cholangiofibrosen durch Furan als spezifischer Endpunkt herangezogen. Hinzu kommt, dass MF einen signifikanten Anteil an der Gesamtexposition der summierten Furane einnimmt, wobei einige Quellen eine 300 % höhere Exposition mit MF als angenommen vermuten lassen. Hieraus ergibt sich das Risiko von MF die Gesundheit durch Hepatotoxizität zu gefährden. Laut CONTAM Panel der EFSA besteht daher dringender Forschungsbedarf zu MF, um erstens das Vorkommen sowie die Beeinflussung der Gehalte durch Verarbeitungsschritte zu testen. Zweitens sollten Langzeitfolgen wie die Kanzerogenität *in vivo* untersucht werden. Und drittens stellt sich für die Risikobewertung die entscheidende Frage, welche molekularen und zellulären Mechanismen den toxikologischen Effekten zugrunde liegen (Knutsen *et al.*, 2017).

2. Kenntnisstand

2.1. Allgemeine Grundlagen

2.1.1. Fremdstoffmetabolismus

Im Zuge des Fremdstoffmetabolismus durchläuft eine nicht körpereigene Substanz vier Hauptphasen, die entscheidend für deren Toxikokinetik und –dynamik sind. Abgekürzt als ADME umfassen sie die Absorption, Verteilung (engl. *distribution*), Metabolisierung und Exkretion des Stoffes. Zusätzlich kann die Art der Applikation und Freisetzung aus einer komplexeren Matrix, wie Lebensmittel oder Arzneimittel, als Schritte vorangestellt werden. Absorption und Verteilung werden hauptsächlich durch die Löslichkeit –abhängig von der Polarität–, dem Molekulargewicht und teilweise spezifische Aufnahmemechanismen in unterschiedliche Organe des Körpers und Kompartimente der Zellen bestimmt. Während die Exkretion hydrophiler Substanzen primär renal stattfindet, werden lipophile Fremdstoffe typischerweise nach intestinaler Aufnahme zunächst in die Leber transportiert. Die in manchen Fällen stoffspezifische Aufnahme über Transportproteine wird als Phase 0 den drei klassischen Phasen der Metabolisierung vorangesetzt. Phase I dient der metabolischen Aktivierung durch Bildung elektrophiler (wie Epoxide, Aldehyde), bzw. nukleophiler (wie Hydroxy-, Carboxy- oder Aminogruppen) Strukturelemente. Sie wird neben Esterasen, Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen auch durch Monooxygenasen vermittelt. Sie sind unterteilbar in flavinabhängige Monooxygenasen (FMO) und Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (NADPH)-abhängige Cytochrom P450-Enzyme (CYPs). Letztere umfasst mit mehr als 60 humanen Enzymen die relevanteste Gruppe an Phase-I-Enzymen, die sich durch ihr hohes Sauerstoff-Transfer-Potential auszeichnet. Als prosthetische Gruppe dient Eisen-Häm. Dieses muss zunächst vorliegend als Fe^{3+} in Fe^{2+} durch Elektronentransfer von NAD(P)H durch NADPH-Cytochrom-P 450-Oxidoreduktasen (Cytochrom-c-Reduktase) reduziert werden. Fe^{2+} bindet O_2 , welches aktiviert, unter Einbezug von zwei Protonen in Wasser und ein Sauerstoffatom bindendes Fe^{3+} gespalten wird. Anschließend kann die Monooxygenierung der gebundenen Substanz erfolgen. So kommt es zur aromatischen und olefinischen Epoxidierung (Benzo[a]pyren), aliphatischen und aromatischen Hydroxylierung (*n*-Hexan), *N*-Hydroxylierung (Anilin), Dehalogenierung (Halothan) oder (oxidativen) Dealkylierung (Thioether). Lokalisiert sind die membrangebundenen CYPs am endoplasmatischen Retikulum, jedoch variiert ihr Gehalt stark abhängig vom Gewebe. Während sich in der Leber von Säugern die höchsten Konzentrationen fremdstoffmetabolisierender Enzyme befinden, sind solche auch im Darm, der Niere und Lunge lokalisiert (Tab. 1). Die Anteile verschiedener CYPs in humanen Lebermikrosomen sind in Abb. 1 zusammengefasst.

Tab. 1: Auswahl relevanter Cytochrom P450-Enzyme (CYP) im Phase-I-Metabolismus (Dekant, 2017; Luo *et al.*, 2002). *) den Zertifikaten der im experimentellen Teil verwendeter Mikrosomen entnommen. GIT: Gastro-Intestinal-Trakt.

Enzym	Vorkommen (hauptsächlich)	Substrate	Aktivitäts-Test*
CYP 1A2	Leber	Heterozyklische Aromaten Koffein	Phenacetin-[O]-Deethylase
CYP 2A6	Leber	Aflatoxin B ₁ Nikotin Cumarin N-Nitrosodiethylamin	Cumarin-7-Hydroxylase
CYP 3A4	Leber GIT	Aflatoxin B ₁ Cylcosporin Testosteron	Testosteron-6β-Hydroxylase
CYP 2C9*1	Leber	Ibuprofen (S)-Warfarin Tolbutamid	Diclofenac-4'-Hydroxylase
CYP 2D6*1	Leber, Lunge Dickdarm Nieren	Debrisoquin N-Nitrosamine Spartein	(+/-)-Bufuralol-1'-Hydroxylase
CYP 2E1	Leber, Lunge Dickdarm Leukozyten	Furan Ethanol Acrylamid	p-Nitrophenol-Hydroxylase

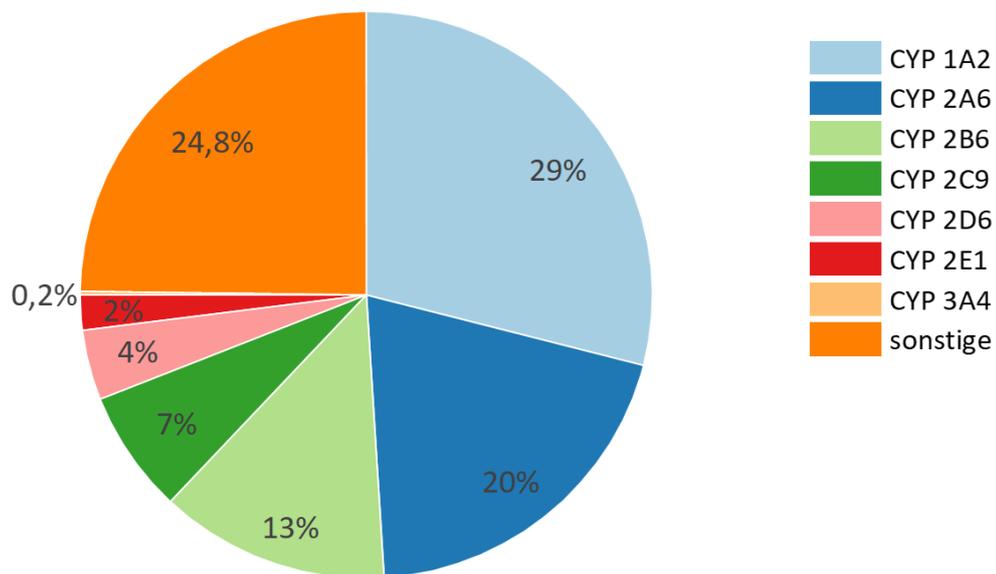


Abb. 1: Verteilung an Cytochrom P450-Enzymen (CYP) [pmol/mg Protein] in humanen Lebermikrosomen (Shimada *et al.*, 1994).

Allgemein dient die Funktionalisierung eines lipophilen Fremdstoffs als Ankergruppe für Konjugationen in Phase II. Die Übertragung von z.B. Glutathion (GSH) mittels Glutathion-S-Transferase (GST), Sulfonsäure (über PAPS, 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat) durch Sulfotransferase (SULT) oder Glucuronsäure via UDP-Glucuronyl-Transferase (UGT) ermöglicht durch Erhöhung der Wasserlöslichkeit die renale Exkretion. N-Acetylierungs- und Methylierungsreaktionen sind hingegen Ausnahmen, die zwar inaktivieren, jedoch den lipophilen Charakter erhöhen. Als Phase III wird ein aktiver Abtransport der Metabolite durch

Exportpumpen wie das *Multidrug-Resistance-Protein* (MRP) bezeichnet (Dorne *et al.*, 2005; Dekant, 2017).

Charakteristische Metabolite und deren Reaktionsprodukte können zur Untersuchung der Toxikokinetik, aber auch als Biomarker der Expositionsabschätzung herangezogen werden. Im Rahmen des **Humanbiomonitorings** unterscheidet man zwischen dem Belastungsmonitoring, welches die innere Belastung mit Schadstoffen und Metaboliten in biologischen Materialien betrachtet, und dem Effektmonitoring. Bei Letzterem werden als biochemische Endpunkte Protein- und/oder DNA-Addukte nach Exposition vermessen. Allerdings zählen auch biologische Effekte wie zytogenetische Parameter zum Effektmonitoring (Angerer, 2009). Bei der Erfassung von Addukten wird zwischen Langzeit- und Kurzzeitbiomarkern unterschieden (Eisenbrand *et al.*, 2005). Renal ausgeschiedene Aminosäure-Addukte gelten aufgrund ihrer Eliminationskinetik als kurzfristige Biomarker der Exposition. Ein klassisches Beispiel ist die Bindung eines Elektrophils an das Tripeptid Glutathion (GSH), welches abgebaut zur Mercaptursäure renal ausgeschieden wird. So wurde beispielsweise die Eliminationskinetik von Acrylamid, metabolisiert zu GAMA (*N*-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)-cystein) über dessen Detektion in Urin untersucht (Boettcher und Angerer, 2005; Watzek *et al.*, 2012). Daneben ist die Bindung von Acrylamid an das *N*-terminale Valin des Hämoglobins bekannt. Mit einer Lebensdauer der Erythrozyten von 120 Tagen zählen Hämoglobinaddukte zu den Langzeitbiomarkern, die im Blut bestimmt werden (Bergmark *et al.*, 1993). Prinzipiell ist auch die Bestimmung von substanz-spezifischen DNA-Addukten als Biomarker möglich. Jedoch werden diese aus methodische Gründe, wie der Zugänglichkeit und umfangreichen Aufarbeitung des Zielgewebes, weniger öfter genutzt. Hinzu kommt, dass für eine belastbare Interpretation der Ergebnisse, die Halbwertszeit der Addukte und ggf. Reparatur der DNA bekannt sein muss (Nestmann *et al.*, 1996).

2.1.2. Toxikologische Beurteilung

Bei der toxikologischen Bewertung einer Substanz wird zwischen der Gefährdung und dem Risiko unterschieden. Für Erstere wird die Gefahr als spezifischer Endpunkt identifiziert und zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung quantitativ charakterisiert. Zur Ableitung von Grenzwerten wird für die interspezifische und intraspezifische Extrapolation ein Sicherheitsfaktor (oft 100) angenommen. Dieser wird zur Berechnung der akzeptablen, täglichen Aufnahmemenge (ADI, engl.: *acceptable daily intake*) mit dem NOAEL (engl.: *no observed adverse effect level*) multipliziert. Handelt sich um eine Substanz, die nicht absichtlich zugesetzt wurde, wie Lebensmittelkontaminanten, wird von der tolerierbaren, täglichen Aufnahmemenge (TDI, engl.: *tolerable daily intake*) gesprochen. Besondere Berücksichtigung bedarf es bei Säuglingen, Kindern, Schwangeren, Kranken und älteren Menschen. Neben diesen Risikogruppen kann auch die genetische Disposition einen Einfluss haben, wenn die Metabolisierung über polymorphe Stoffwechselwege abläuft (Dorne *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1985, 1985).

Entscheidend für die toxikologische Einschätzung ist der MOA, weshalb das Wissen um zugrundeliegende Wirkungsmechanismen eines Effektes essentiell ist. Handelt es sich um gentoxische Kanzerogene kann theoretisch von keinem Schwellwert, bis zu dem kein Risiko besteht, ausgegangen werden. Da eine vollständige Elimination der Belastung nicht immer praktisch umsetzbar ist, wird hier das Minimierungskonzept ALARA/ALARP (engl.: *as low as reasonably achievable / practicable*) „so niedrig wie vernünftiger / praktischer Weise erreichbar“ angewandt (Sperber, 2001; Smith *et al.*, 1985; Renwick *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1985).

Die Risikobewertung bezieht die Exposition der Menschen ein, um eine statistische Aussage über die Häufigkeit eines Effektes zu treffen, und ist abhängig vom MOA. Handelt es sich um eine gentoxische Substanz, kann der *Margin of Exposure* (MOE) als Maß zur Priorisierung des Risikos angewandt werden. Er wird berechnet aus dem Quotienten des toxikologischen Endpunktes (oft der Bezugspunktdosis der unteren Konfidenzgrenze bei 10 % Wirkung, $BMDL_{10}$, engl.: *benchmark dose, lower confidence limit(s) at 10 % response*) zur humanen Exposition. Liegt er unter 10 000 wird eine gentoxische Substanz als besorgniserregend eingestuft, wohingegen Werte oberhalb 10 000 für ein Risikomanagement mit Minimierungsmaßnahmen geringer priorisiert werden. Im Falle einer nicht-gentoxischen Substanz wird dem NOAEL aus Tierstudien ein Sicherheitsfaktor von 100 zugerechnet, um einen gesundheitsbasierten Schwellenwert abzuleiten (Benford, 2016; Smith *et al.*, 1985; European Food Safety Authority, 2005).

Toxikologische Untersuchungen *in silico*

Die Bestimmung toxikologischer Endpunkte einer Substanz basiert stets auf Tierversuchen. Um diese zu minimieren, verfeinern und vermeiden wurde das 3R-Konzept (engl.: *reduce, refine, replace*) in der REACH-Verordnung (Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien, engl.: *registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals*) in europäisches Recht implementiert. Eine mögliche Umsetzung bietet die Analyse der quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehung (QSAR, engl.: *quantitative structure-activity relationship*) *in silico*. Sie basieren auf der Abhängigkeit der biologischen Aktivität von der chemischen Struktur mit ihren funktionellen Gruppen. Als *structural alerts* werden Strukturkomponenten bezeichnet, die einen adversen Effekt vermuten lassen (Raies und Bajic, 2016; Edler *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1985). Durch Identifikation von *structural alerts* in einen mehrstufigen Entscheidungsprozess mit Ja/Nein-Fragen, einem sogenannten Entscheidungsbaum, kann eine Substanz kategorisiert werden. Nach diesem Prinzip erfolgt die Einteilung einer Substanz nach Cramer in die Klassen I, II oder III mit zunehmendem toxikologischen Potential (Cramer *et al.*, 1976). Im Falle eines Lebensmittelzusatzstoffes mit unzureichender Datenlage, können den Cramer-Klassen gemäß dem TTC-Konzept (engl.: *threshold of toxicological concern*) Expositionsschwellenwerte zugeordnet werden. Der in Tab. 2 zugrundeliegende NOEL entstammt chronischen Tierstudien an Ratten, welcher mit einem

Sicherheitsfaktor von 100 multipliziert wurde. Wird der entsprechende Schwellenwert eingehalten, liegt der NOEL der unbekanntes Substanz mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % unterhalb des 5 %-Konfidenzintervalls (Kroes *et al.*, 2005; Munro *et al.*, 1996).

Tab. 2: Cramer-Klassifizierung mit Expositionsschwellenwerten gemäß dem TTC-Konzept. Der Expositionsschwellenwert bezieht sich auf eine 60 kg schwere Person und wurde aus dem 5 %-igen NOEL mit einem Sicherheitsfaktor von 100 berechnet (Munro *et al.*, 1996; Cramer *et al.*, 1976). KG: Körpergewicht, NOEL: (engl.) *no observed effect level*, TTC: (engl.) *threshold of toxicological concern*.

Cramer-Klasse	Potentielle Toxizität (oral)	Substanzeigenschaften	5 %-iger NOEL [mg/kg KG/Tag]	Humaner Expositionsschwellenwert [mg/Person/Tag]
I	Niedrig	Einfache chemischen Strukturen für die effiziente Stoffwechselwege existieren	3,0	1,8
II	Moderat	Weniger harmlose Strukturen als Klasse I, jedoch ohne <i>structural alerts</i> die eine Toxizität wie Klasse III vermuten lassen	0,91	0,54
III	Hoch	Strukturen, die keine starke anfängliche Vermutung der Sicherheit erlauben oder sogar eine signifikante Toxizität oder reaktive funktionelle Gruppen suggerieren	0,15	0,09

Zur toxikologische Einschätzung einer Substanz *in silico* können Computerprogramme herangezogen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Programme *ToxTree* und *QSAR toolbox* der OECD sind im experimentellen Teil (siehe Kap. 6.3) beschrieben.

2.2. 2-Methylfuran (MF)

2.2.1. Physikalisch-chemische Eigenschaften

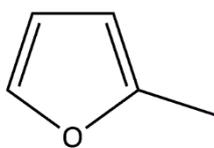


Abb. 2: 2-Methylfuran

2-Methylfuran (MF, Silvan, CAS-Nr. 534-22-5, Abb. 2) besitzt die Summenformel C_5H_6O mit einem Molekulargewicht von 82,10 g/mol. Bei Raumtemperatur liegt MF als leicht gelbe Flüssigkeit mit schokoladenähnlichem Geruch vor, die einen Siedepunkt von 63–64 °C (101 kPa), bzw. Schmelzpunkt von –88 °C aufweist. Die Chemikalie ist leicht entzündlich, hat bei 20 °C eine Dichte von 0,92 g/cm³ und einen Dampfdruck von 16 kPa. Mit 6 g/L ist MF schlecht wasserlöslich, jedoch löst es sich leicht in organischen Lösungsmitteln. Der heterozyklische Aromat ist anfälliger für elektrophile, aromatische Substitution als Furan, weißt jedoch sonst ähnliche chemische Eigenschaften wie sein nicht-methyliertes Analogon

auf (Hoydonckx *et al.*, 2012). Weitere physikalisch-chemischen Daten sind in Tab. 3 mit Derivaten verglichen, die für *in silico* Betrachtungen herangezogen wurden.

Tab. 3: Physikalisch-chemischen Daten von 2-Methylfuran und Derivaten zum Vergleich (Hoydonckx *et al.*, 2012; Terent'ev und Kazitsyna, 1949; Knutsen *et al.*, 2017; Gestis-Stoffdatenbank, 2021). DMF: 2,5-Dimethylfuran, FFA: 2-Furfurylalkohol, MF: 2-Methylfuran, Sdp.: Siedepunkt.

	M	ρ	Sdp.	Dampfdruck	Wasserlöslichkeit	Log P	H - Donor	H- Akzeptor	
	[g/mol]	[g/mL]	[°C]	[kPa]	[g/L]	[mol/L]			
MF	82,10	0,916	63-64	16 (20 °C)	6	0,073	1,791	0	1
Furan	68,07	0,940	31,4	66 (20 °C)	8	0,12	1,736	0	1
DMF	96,13	0,961	93,5	8 (25 °C)	4,3	0,045	1,830	0	1
FFA	98,10	0,981	171	0,05 (20 °C)	77	0,78	0,213	1	2

2.2.2. Bildung und Vorkommen

Industriell wird MF aus Furfural synthetisiert, um es vor allem als Edukt für weitere Synthesen von bspw. Chloroquin, Methylfurfural und stickstoff- oder schwefelhaltigen Heterozyklen zu verwenden. Zudem wird an der Nutzung von MF aus Biomasse als Treibstoff geforscht (Huang *et al.*, 2012; Corma *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2006).

Für den Menschen ist die Exposition von MF als Lebensmittelkontaminante am relevantesten, wobei die thermische Behandlung der Lebensmittel bzw. Rohprodukte eine entscheidende Rolle spielt. Es wurde die Bildung hoher MF-Gehalte auf die Maillard-Reaktion zurückgeführt. Sie ist als Gruppe komplexer, aufeinanderfolgender Reaktionen von reduzierenden Kohlenhydraten und Aminosäuren beim Erhitzen zu betrachten. Modellversuche zeigten, dass MF zum einen aus reinem Zucker wie D-Glucose unter Erhalt des Kohlenstoff-Grundgerüsts via Zyklisierung und Dehydratisierung gebildet werden kann. Zum andere kann die Kontaminante während der thermischen Degradation der Aminosäuren L-Alanin und L-Threonin entstehen (Abb. 3). Deren Streckeraldehyde Acetaldehyd und Lactaldehyd (2-Hydroxypropanal) kondensieren hierbei via Aldolreaktion zu 2,5-Didesoxypentose. Durch Zyklisierung und Dehydratisierung des Intermediats entsteht schließlich MF. Wurde D-Glucose mit D-Alanin und D-Threonin erhitzt, wurde das entstehende MF zu 57 % aus den Aminosäuren und 34 % aus D-Glucose gebildet. Dies wurde auf die gesteigerte Generierung von C2- und C3-Streckeraldehyden bei trockenen Röstbedingungen zurückgeführt. Die geringere Entstehung von MF aus Zucker zeigte sich insbesondere in wässrigem Milieu mit < 25 μmol MF/mol Zucker (121 °C, 25 min) im Vergleich zur trockenen Röstung mit 160–260 μmol MF/mol Zucker (200 °C, 10 min) (Limacher *et al.*, 2008).

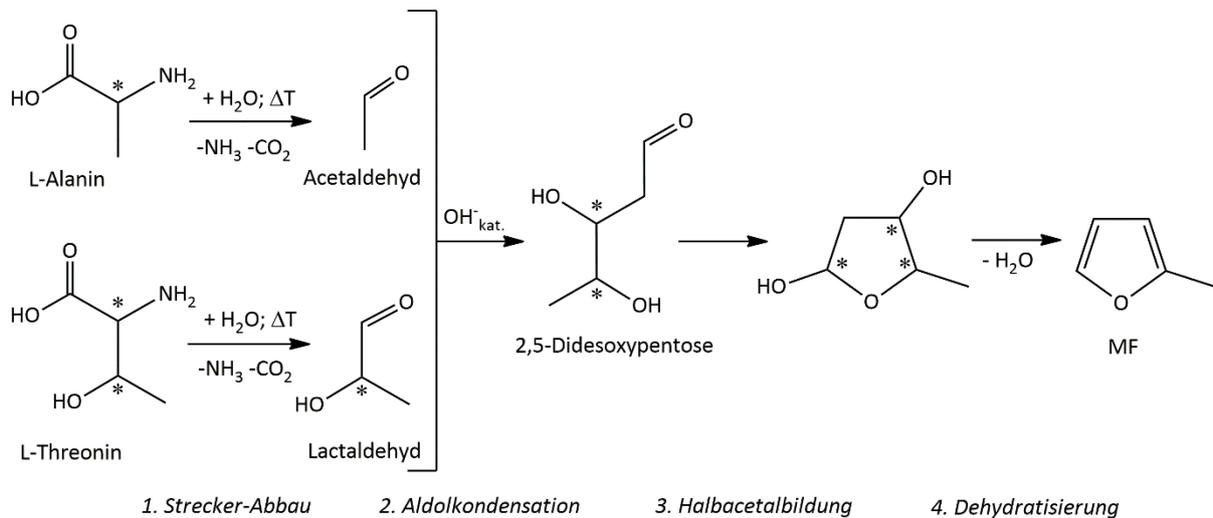


Abb. 3: Thermische Bildung von MF aus Aminosäuren über deren Streckeraldehyde. Modifiziert nach (Limacher *et al.*, 2008). MF: 2-Methylfuran.

Neben der Maillard-Reaktion stellt der Abbau von Fettsäuren Vorläufer, wie 2-Pentenal, für die Bildung von MF (Abb. 4). In Modellversuchen wurde unter Röstbedingungen aus Linolensäure (C18:3; 9, 12, 15) die 0,5-fache Menge an MF ermittelt im Vergleich zur Mischung aus D-Glucose, D-Alanin und D-Threonin (Märk *et al.*, 2006). Im Zuge der Lipidoxidation entstandene α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen bildeten in vergleichbaren Modellversuchen MF, wobei Aminosäuren oder prooxidative Kupferionen katalytisch wirkten. Intramolekulare Zyklisierung der 4-Hydroxyalkenale stellte dabei einen intermediären Schritt dar (Adams *et al.*, 2011; Elmore *et al.*, 1999).

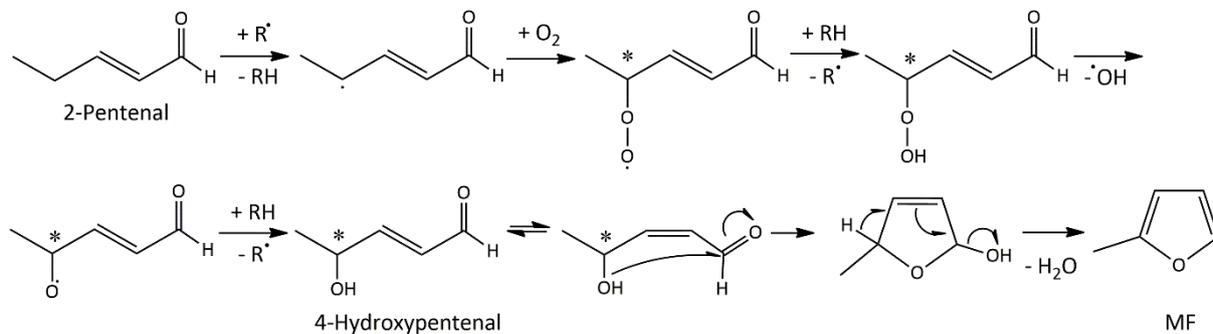


Abb. 4: Bildung von MF aus 2-Pentenal, einem Abbauprodukt des oxidativen Fettsäurestoffwechsels. Modifiziert nach (Adams *et al.*, 2011). MF: 2-Methylfuran.

Sekundär wurde auch die Bildung von MF aus thermischem Abbau von Ascorbinsäure mittels Rekombination von Fragmenten solcher beschrieben. Während MF weniger als 1 % der gebildeten Furane ausmachte, konnte der MF-Anteil durch Zugabe von Phenylalanin auf eine zu Furan vergleichbare Menge (1 mmol/mol) gesteigert werden (Limacher *et al.*, 2007). Der thermische Abbau von Melanoidinen, isoliert aus Lebensmitteln, zeigte ebenfalls die Freisetzung von MF als flüchtige Komponente, wobei auch hier von einem Nebenweg der MF-Exposition auszugehen ist (Adams *et al.*, 2005).

Tab. 4: MF-Gehalte in ausgewählten Lebensmitteln. Detektion mittels Headspace-GC-MS. LOQ: *limit of quantification*, MF: 2-Methylfuran, MW: Mittelwert, RL: *Reporting limit* (Meldegrenze).

Kategorie	Lebensmittel	MF-Gehalt [$\mu\text{g}/\text{kg}$]		<i>n</i>	Literatur
		Range	MW		
Getreide	Cerealien	12–86	23,5	18	(Knutsen <i>et al.</i> , 2017)
Gemüse	Tomaten	16,5–42,0	24,8	5	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
	Kichererbsen	13,9–21,6	18,2	5	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
	Grüne Bohnen	9,1–29,3	17,9	5	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
	Pilze	8,4–12,4	10,2	5	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
	Mais	5,9–14,2	8,9	5	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
	Karotten	4,1–22,0	8,9	5	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
Obst	Apfelmus	3,7–14,3	7,7	5	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
	Pfirsiche	4,6–9,6	7,1	2	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
	Ananas	1,9–3,8	2,9	3	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
Fleisch	Hühnerflocken	152	152	1	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
	Fleischaufstrich	26,2–54,8	36,9	5	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
	Fleischprodukte	< LOQ (1,0) –2,6	0,7	11	(Shen <i>et al.</i> , 2016)
Fisch/ Meeres- früchte	Austern	149	149	1	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
	Lachs	38,8–109	65,3	5	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
	Thunfisch	14,4–39,6	24,8	5	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
Milchprodukte		< LOQ (1,0) –7,9	2,1	15	(Shen <i>et al.</i> , 2016)
Kaffee- bohnen	Gemahlen, geröstet	4 724–34 378	18 300	117	(Knutsen <i>et al.</i> , 2017)
	Gemahlen, decaffeinert	6 570–13 500	10 400	7	(Becalski <i>et al.</i> , 2016)
Instantkaffee		135–15 932	761,5	64	(Knutsen <i>et al.</i> , 2017)
Kaffee- getränk	Kaffee	117–5 982	1 328	15	(Fromberg <i>et al.</i> , 2014)
	Espresso	135–1 360	583	12	(Becalski <i>et al.</i> , 2016)
	Dekoffeinierter Kaffee	24,4–365	184	12	(Becalski <i>et al.</i> , 2016)
Alkoholische Getränke		< LOQ (0,5) –2,0	0,9	3	(Shen <i>et al.</i> , 2016)
Gewürze	Sojasoße	1,7–43,6	15,2	14	(Shen <i>et al.</i> , 2016)
	Chili-Soße	5,4–13,5	9,5	2	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
	Ketchup	2,5–18,1	8,9	4	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
Baby- nahrung	Pürees	< LOQ (1,0) –13,5	3,6	11	(Shen <i>et al.</i> , 2016)
	Brei aus Getreide	30,5–88,8	68,3	6	(Habibi <i>et al.</i> , 2013)
	Im Glas	< RL (5) –12	6,8	35	(Knutsen <i>et al.</i> , 2017)
Fertig- produkte	Gebackene Bohnen	61,4–152	91,3	5	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
	Chili con carne	35,9–73,0	51,8	5	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)
	Tomatensoße	24,2–76,8	50,4	5	(Becalski <i>et al.</i> , 2010)

Durch die unterschiedlichen Bildungswege aus verschiedenen und zugleich ubiquitär vorkommenden Inhaltsstoffen als Vorläufer, kommt MF in einer Vielzahl an Lebensmitteln vor bzw. wird bei deren thermischen Zubereitung gebildet. Die Hauptexpositionsquelle für Erwachsene stellt dabei Kaffee dar. Während Furane quantitativ 30–50 % der flüchtigen Komponenten in geröstetem Kaffee ausmachen, ist MF mit 50 % der am häufigsten vorkommende Vertreter dieser Klasse. Tab. 4 zeigt variierende MF-Gehalte in Kaffeebohnen ($\sim 4,7$ – $34,4$ mg/kg) als auch dem zubereiteten Getränk ($\sim 0,02$ – $6,0$ mg/kg), welche vor allem durch die Art der Bohne, Lagerung, Röstbedingung und Zubereitungsart bedingt ist (Petisca *et al.*, 2013; Becalski *et al.*, 2016). Des Weiteren entsteht MF durch Erhitzung während der Herstellung von Konserven, fermentierten und Fertigprodukten, aber auch gereiften, alkoholischen Getränken. Allerdings kommt es auch in unbehandelten Obst und

Gemüsesorten vor, wie in Tab. 4 zusammengefasst (Becalski *et al.*, 2010; Becalski *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2016; Fromberg *et al.*, 2014; Habibi *et al.*, 2013; Knutsen *et al.*, 2017).

MF kann hitzebedingt bei der Zubereitung von Lebensmitteln entstehen, aber der Gehalt über die Dauer aufgrund des flüchtigen Charakters auch abnehmen, wie es bspw. bei aufgebrühten Kaffee der Fall ist (Becalski *et al.*, 2016). Die Inhalation von Furan während des Kochens ist abhängig vom Lebensmittel, der Zubereitungszeit und -art, jedoch mit 11–523 ng Furan relativ gering (Crews, 2009). Eine derartige Exposition mit MF ist nicht auszuschließen.

Neben Lebensmitteln kommt MF auch in Zigarettenrauch vor. In kontrollierter Atmosphäre eines 30 m³ Raums generierten sechs Zigaretten $35,5 \pm 4,9$ µg/m³ MF, was etwa der gleichen Menge so entstandenem Furan entspricht (Baek und Jenkins, 2004).

Die Belastung in der chemikalienherstellenden Industrie bezieht sich wie oben beschrieben auf einen eher kleinen Personenkreis, den es durch Arbeitsschutzmaßnahmen zu schützen gilt.

2.2.3. Toxikokinetik

2.2.3.1. ADME

Die Verteilung *in vivo* wurde mittels ¹⁴C-markiertem MF in Sprague-Dawley-Ratten verfolgt, welche mit 50–200 mg/kg KG einmalig *i. p.* appliziert wurden. Radioaktivität wurde dosisabhängig in absteigender Reihenfolge in der Leber, Niere, Lunge und im Blut detektiert, wobei innerhalb der getesteten 0,5–24 h nach 4 h jeweils der höchste Gehalt in den Geweben gemessen wurde. Ebenso wurde aus der Leber und geringem Maße der Niere Proteine sowie DNA isoliert, an welche radioaktiv markierte Substanz gebunden war. In der Lunge und im Blut konnten lediglich Protein-Addukte radioaktiv detektiert werden (Ravindranath *et al.*, 1986).

Die inhalative Aufnahme betrug in einer Studie mit Hunden abhängig von der Ventilationsrate 83–89 % MF (Egle und Gochberg, 1979).

2.2.3.2. Metabolische Aktivierung

Erstmals wurde die metabolische Aktivierung von MF mittels Rattenmikrosomen aus der Leber, Lunge und Niere von Ravindranath *et al.* (1984) untersucht. Der reaktive Metabolit wurde mit Semicarbazid abgefangen und als Disemicarbazon von 3-Acetylacrolein (AcA, auch 2-Oxo-pent-2-enal, CAS-Nr. 5729-47-5; C₅H₆O₂; M = 98,10 g/mol) mittels Massenspektrum bestimmt (Abb. 5). Für das detektierte Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (*m/z*) 212 wurde die Konjugation von je einem Molekül Semicarbazid an jede Aldehydgruppe der α,β-ungesättigten Carbonylverbindung mittel nukleophiler Addition postuliert (Ravindranath *et al.*, 1984a).

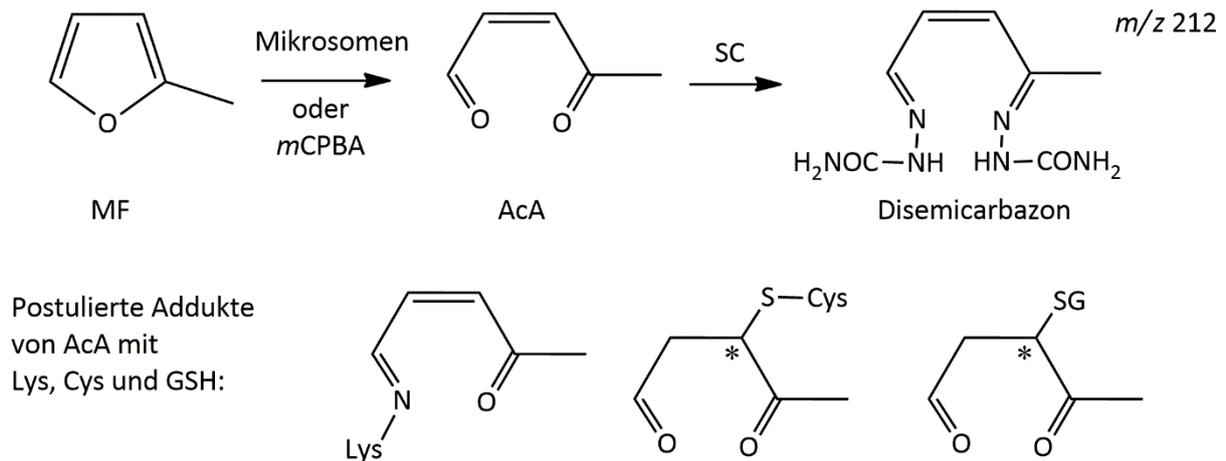


Abb. 5: Metabolische Aktivierung von 2-Methylfuran (MF) zu 3-Acetylacrolein (AcA) abgefangen mit Semicarbazid (SC) sowie hypothetischer Addukte von AcA mit Lysin (Lys), Cystein (Cys) und Glutathion (GSH, GS-). Zum Nachweis wurde MF mittels *m*-Chlorperbenzoesäure (*m*CPBA, engl. *m-chloroperoxybenzoic acid*) zu AcA oxidiert. Modifiziert nach Ravindranath *et al.* (1984a; Ravindranath und Boyd, 1985).

Metabolisch aktiviertes MF band kovalent, irreversibel an mikrosomales Protein, was zu dessen Inaktivierung führte und somit MF als Suizidsubstrat klassifiziert wurde. Synthetisch hergestelltes AcA inhibierte Mikrosomen teilweise vollständig. Die hohe Reaktivität des Intermediats zeigte sich auch gegenüber den eingesetzten Abfangreagenzien Cystein, GSH, Lysin und *N*-Acetylcystein (AcCys) in absteigender Reihenfolge. Hier wurden jedoch nicht die Addukte selbst, sondern die Menge radioaktiv-markiertem Material (MF oder dessen Metabolite) gebunden an Proteine detektiert. Da nach Isolation der Abfangreagenzien aus Mikrosomeninkubationen, bzw. Proteine aus Gewebe kein freies ^{14}C -MF vorliegt, wurde von kovalent gebundenem MF-Äquivalent/Intermediat ausgegangen. Der gewebsspezifische Vergleich zeigte den höchsten Gehalt an gebundenem Intermediat aus der Leber, dann der Lunge und schließlich der Niere. Zeitabhängige Inkubationen von ^{14}C -MF (10 mM) mit Rattenlebermikrosomen (RLM) ergaben einen linearen Anstieg an gebundenen MF-Äquivalent (MF, bzw. Metabolit) über 15 min. Dosisabhängige Inkubationen zur Bestimmung kinetischer Parameter wurden über eine Dauer von 5 min durchgeführt. Für unbehandelte RLM wurde eine maximale Umsatzgeschwindigkeit von $V_{\max} = 0,53 \mu\text{mol}/2 \text{ mg mikrosomales Protein}/\text{min}$ und eine Michaelis-Menten-Konstante von $K_M = 1,417 \text{ mM}$ ermittelt. Um die enzymatische Reaktion genauer zu charakterisieren, wurden Ratten mit CYP-spezifischen Induktoren oder Inhibitoren vor Isolierung der Lebermikrosomen vorbehandelt. Der Induktor Phenobarbital bewirkte eine signifikante Erhöhung der an mikrosomales Protein gebundenen MF-Äquivalente ($V_{\max} = 0,81 \mu\text{mol}/2 \text{ mg mikrosomales Protein}/\text{min}$; $K_M = 0,463 \text{ mM}$). Die Vorbehandlung mit dem Induktor 3-Methylcholanthren zeigte hingegen keinen Unterschied zur Inkubation mit unbehandelten RLM. Die Vorbehandlung der Ratten mit den Inhibitoren Piperonylbutoxid (0,5 mM) und *N*-Ocytlimidazol (0,5 mM) erzielten eine Reduktion des mikrosomalen Metabolismus (gemessen als Bindung von radioaktiv markiertem MF-Äquivalent an mikrosomales Protein) um 73,4 %, bzw. 98 % (Ravindranath und Boyd, 1985).

Der Einfluss der CYP-Induktoren und -Inhibitoren auf die metabolische Aktivierung von MF zeigte erstmals die Rolle der CYPs im Fremdstoffmetabolismus von MF.

In vitro konnte die Zytotoxizität von MF in primären Rattenhepatozyten (pRH) durch Vorbehandlung der Wistar-Ratten mit CYP-Induktoren signifikant erhöht werden. Nach 24 h betrug die EC_{50} (engl.: *half maximal effective concentration*) von MF in pRH aus unbehandelten Ratten 794 μM (Median, Range: 668–944 μM). Die Vorbehandlung *in vivo* mit Phenobarbital und β -Naphthoflavon reduzierte die EC_{50} *in vitro* um 77 %, bzw. 86 % (Phenobarbital: 34 μM Median, Range: 10–45 μM ; β -Naphthoflavon: 57 μM Median, Range: 10–211 μM). Dies unterstützt die Hypothese der CYP-vermittelten metabolischen Aktivierung (Hammond und Fry, 1991). Es wurden keine Rückschlüsse auf die Induktion spezifischer CYP-Enzyme basierend auf der Verwendung von Phenobarbital oder β -Naphthoflavon als CYP-Induktoren gezogen.

In Sprague-Dawley-Ratten, die vor Beginn eine einmalige Dosis von 100 mg/kg KG ^{14}C -MF *i. p.* verabreicht bekamen, wurden vergleichbare Trends der CYP-Induktoren, bzw. -Inhibitoren auf die Hepatotoxizität wie zuvor auf die Zytotoxizität beobachtet. Der CYP-Induktion folgte eine gesteigerte Leberschädigung. Diese wurde an der Konzentration von SGPT (Serum-Glutamat-Pyruvat-Transferase) im Blut bemessen. Der Effekt war begleitet von einer GSH-Depletion in der Leber (Ravindranath *et al.*, 1986). Eine partielle Depletion des Tripeptides wurde ebenfalls in Hämolysaten und intakten humanen Erythrozyten durch MF induziert. Ohne metabolische Aktivierung konnte allerdings keine Reaktivität von MF gegenüber GSH in wässrigem Milieu beobachtet werden (Palmen und Evelo, 1996). *In vivo* wurden der Einfluss von MF auf den GSH-Status durch Gabe von 100 mg/kg KG *i. p.* an Ratten, die mit verschiedenen GSH-Modulatoren vorbehandelt wurden, genauer untersucht. Die Modulatoren der GSH-Synthese (Diethylmaleat, Buthioninsulfoxim, Oxothiazolidincarboxylat) zeigten vielschichtigen Einfluss auf den GSH-Status, die Hepatotoxizität, als auch auf die Bindung an Proteine und DNA. Jedoch konnte aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse der Mechanismus der MF-Toxizität nicht vollständig geklärt, bzw. auf eine GSH-Depletion zurückgeführt werden (Ravindranath und Boyd, 1991).

Die Versuche zeigten jedoch, dass die metabolische Aktivierung, vermutlich CYP-katalysiert, eine entscheidende Rolle bei der Toxifizierung von MF spielt. Das m/z -Verhältnis des abgefangenen Addukts spricht für die Bildung von AcA als reaktiver Phase I-Metabolit von MF (Ravindranath *et al.*, 1984a).

Als zweiter potentieller Metabolit von MF wurde FFA erwähnt, welcher mittels Seitenkettenhydroxylierung gebildet würde. Jedoch gibt es bisher keine Daten, die für einen solchen Stoffwechselweg sprechen (Knutsen *et al.*, 2017).

2.2.3.3. Exkretion und Biomonitoring

Bisher sind Exkretion und Biomonitoring von MF in lediglich Studien ohne kontrollierte MF-Exposition untersucht worden. Sie zeigen jedoch die Relevanz von MF als Kontaminante als auch die mögliche Exkretionsroute.

Mochalski und Unterkofler (2016) untersuchten humanen Urin von 19 gesunden Nichtrauchern ohne spezielle Ernährung auf das Vorkommen flüchtiger, organischer Komponenten. Morgenurin wurde nach Aufarbeitung via *Headspace-Festphasemikroextraktion* (HS-SPME, engl.: *head-space solid-phase microextraction*) quantifiziert mittels Gaschromatographie gekoppelt mit selektive Reagenzien-Ionisation-Flugzeit-Massenspektrometrie (GC-SRI-TOF-MS, engl.: *gas chromatography selective reagent ionization time of flight mass spectrometry*). Dabei wurde u. a. MF im Urin aller Probanden im Bereich von 1,74–6,88 nM und einem Median von 4,06 nM nachgewiesen. Furan und 3-MF wurden mit 1,06–28,8 nM (Median 11,3 nM), bzw. 1,03–5,59 nM (Median 2,97 nM) vergleichbar in allen Proben detektiert.

Der Einfluss von Tabakrauch, aber auch Luftverschmutzung wurde in ausgeatmeter Luft (verglichen mit Innenraumluft) und Urin von Rauchern und Nichtrauchern untersucht. In der Kohorte zur Untersuchung der Atemluft waren 40 % der 115 Probanden (unterschiedlichen Geschlechts und Alters) aktive Raucher. Die Probanden konsumierten weniger als 1 h vor der Probenahme Lebensmittel (ohne spezifische Vorgaben) und weniger als 2 h vorher Tabakrauch. Die aufgefangene Luft wurde mittels *Multibed*-Sorptionsröhrchen getrappt und für die GC-MS-Analyse thermisch desorbiert. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Gehalte an MF, aber auch anderer Furane zwischen der Innenraumluft und Ausatemluft der Probanden gemessen werden. Die Autoren schlussfolgerten, dass es keine endogene Bildung gab. Zusätzlich wurde Morgenurin nach Fasten über Nacht von 50 Teilnehmern, worunter 26 % Raucher waren, mittels HS-SPME gekoppelt mit GC-MS untersucht. In beiden Probenarten (Atem und Urin) wurde eine signifikante Differenz zwischen Rauchern und Nichtrauchern festgestellt, die im Fall von Rauchern den ~5-fachen Gehalt an MF im Atem betrug (Filipiak *et al.*, 2012).

Dies verdeutlicht zum einen den Einfluss von Tabakrauch als Expositionsquelle für MF, zum anderen aber auch die ubiquitäre Belastung von Nicht-/Rauchern durch die Lebensmittelkontaminante. Offensichtlich kommt es zur Ausscheidung von MF über den Urin, jedoch ist der Ursprung der Verbindung in keiner der Studien untersucht worden. Metabolite von MF wurden in dieser Studie nicht untersucht.

2.2.4. Toxikodynamik

2.2.4.1. Akute Toxizität

Die **akute** Toxizität von MF wurde von Ravindranath *et al.* (1986) nach 24 h einer Einmalgabe von 50–400 mg/kg KG *i. p.* in Sprague-Dawley-Ratten erfasst. Histopathologische Veränderung in Form von zentrilobulären Nekrosen, die mit der Dosis zunahm, zeigten die Leber als primäres Zielorgan. Zudem wurde nach 24 h ein erhöhtes SGPT-Level, ein Hinweis auf Leberschädigung, kombiniert mit depletiertem GSH-Gehalt gemessen. Dies geht einher mit der Verteilung von radioaktiv-markiertem ¹⁴C-MF, dessen totale Menge, aber auch gebunden an Proteine und DNA (nach entsprechender Isolation) in der Leber am höchsten war. In der Lunge manifestierte sich dosisabhängig eine gewebsschädigende Wirkung von unregelmäßiger Zellform bis hin zu weitverbreiteter Nekrose des bronchialen Epithels. Dies wurde in den höchsten Dosisgruppen mit terminaler Bronchitis und fokaler Freilegung des Epithels begleitet. Währenddessen wies die Niere bis 400 mg/kg KG MF keine histopathologischen Veränderungen auf.

2.2.4.2. Subakute Toxizität

Subakute Effekte von MF wurden in einer 28 Tage-Studie an männlichen Fischer 344-Ratten mit 0,4–200 mg/kg KG/d MF *p. o.* getestet. Jedoch wurde in den höchsten drei Dosisgruppen von 50, 100 und 200 mg/kg KG/d nach 24 h, bzw. 48 h gehäuft letale Effekte oder ein zu ungesunder Zustand der Tiere beobachtet, sodass die Untersuchung dieser Gruppen gestoppt wurde. Histopathologische Untersuchungen der hohen Dosisgruppen zeigten entzündete, aber sonst unauffällige Mägen und zentrilobuläre Nekrosen der Leber. In den Dosisgruppen von 0,4–25 mg/kg/d wurde primär die Leber, genauer die Hepatozyten sowie das Gallengangssystem, geschädigt. Dies spiegelte sich nicht in den klinischen Markern Alanin-Aminotransaminase (ALT) und Aspartat-Aminotransaminase (AST; beides „Leakage“-Enzyme geschädigter Hepatozyten) oder alkalische Phosphatase (AP; Indikator für Gallengangsschäden) wider. Jedoch kam es zur signifikanten Veränderung hämatologischer Parameter wie der Serumamylase, Triglycerin, Cholesterin oder dem Bilirubin Gehalt, welche in Summe durch eine Hepatotoxizität begründet werden können. Zudem wurde eine Verschiebung des Elektrolythaushalts beobachtet, die aus einem veränderten Stoffwechsel bis hin zur gastrointestinalen und renalen Dysfunktion resultieren kann. Histopathologische Besonderheiten der Niere wurde jedoch nicht gesichtet (Gill *et al.*, 2014).

Eine weitere 28 Tage-Studie von Huo *et al.* (2020) fand ähnlichen Effekt in mit 0,625–20 mg/kg KG/d *p. o.* behandelten Sprague-Dawley-Ratten. Das Lebergewicht war erhöht und hämatologische sowie klinische Marker wiesen zusammen dem histopathologischen Befund der Ratten auf eine entzündete, nekrotische Leber hin. Hier wurden zudem in den höchsten Dosisgruppen von 10 und 20 mg/kg KG/d MF Effekte auf das Knochenmark und blutbildende System beobachtet. Für die Hepatotoxizität wurde ein NOAEL von 5 mg/kg KG/d ermittelt.

Eine anschließende 7 Tage-Studie fokussierte sich auf die Leber als Zielorgan, wozu C57BL/6J-Mäusen 3 oder 30 mg/kg KG/d MF *p. o.* verabreicht wurde. Neben signifikantem Gewichtsverlust der Tiere wiesen nach 7 Tagen die hämatologischen Marker AST, ALT, AP und Gesamtgallensäure (TBA, engl.: *total bile acid*) auf eine hepatotoxische Wirkung hin. Dies wurde durch histopathologische Untersuchungen bestätigt, die dosisabhängig hepatische Nekrosen und Fibrosen zeigten. Western-Blot-Analysen von Lebergewebe wiesen über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor erythroid related factor-2* (Nrf2) gefolgt von erhöhter Expression der Häm-Oxidase-1 auf die Induktion von oxidativem Stress hin (Dorne *et al.*, 2005; Jarabek *et al.*, 2009). Die ungezielte Metabolitenanalyse (engl. *untargeted metabolomics*) der Leber von Mäusen zeigte einen Einfluss von MF auf den Stoffwechsel von u. a. Linolsäure und Aminosäuren. Betroffen war der Metabolismus von Glycin, Serin, Threonin, Methan, Ascorbat, Aldarat, Arachidonsäure, Alanin, Aspartat, Glutamat, Cystein, Methionin, Inositolphosphat, Pyruvat sowie die Biosynthese von Valin, Leucin, Isoleucin und aminoacyl-tRNA (Hu *et al.*, 2021).

Langzeitstudien zur sub-/chronischen Toxizität, bzw. Kanzerogenität sind nicht bekannt.

2.2.4.3. Gentoxizität und Mutagenität

Im klassischen Ames-Test zeigte MF mit und ohne metabolischer Aktivierung (mittels Leberhomogenat, S9-Mix) bis auf ein ambivalentes Ergebnis kein mutagenes Potential. Getestet wurde MF in *Salmonella typhimurium* der Stämme TA98, TA100 und TA102 in Konzentrationen von 0,011–1 100 µmol/Platte (Aeschbacher *et al.*, 1989) sowie in TA97, TA98, TA100, TA102, TA104 und TA1535-Stämmen 1–10 00 µM/Platte MF (Zeiger *et al.*, 1992), jeweils mit und ohne S9-Mix. Shinohara *et al.* (1986) erreichten im Ames-Test mit oben genannten Stämmen und Konzentrationsbereichen ebenfalls negative Testergebnisse. In *Bacillus subtilis* H17 (*rec*⁺) und M45 (*rec*⁻) wurde in Konzentrationen von 0,16–1600 µg/Platte nicht eindeutige Ergebnisse hinsichtlich einer DNA-Schädigung erzeugt (Subramanyam *et al.*, 1989).

Chromosomenaberrationen wurden in CHO-Zellen nach Inkubation mit MF mit und ohne S9-Mix (10–75 mM MF ohne S9; 40–150 mM MF mit S9) detektiert. Das klastogene Potential erwies sich jedoch mit S9-Mix, bzw. ohne NADPH-Zugabe zum S9-Mix als geringer, was als inhibierende Effekte von MF auf das Enzymsystem interpretiert wurde (Stich *et al.*, 1981). Es konnten keine Chromosomenaberrationen *in vivo* in Knochenmarkzellen und Spermatozyten von Mäusen bei Gabe von 100–400 mg/kg KG/d über 5 Tage beobachtet werden.

Eine DNA-schädigende Wirkung wurde in permanenten HepG2-Zellen im Vergleich zu pRH nach 3-, bzw. 24-stündiger Inkubation mit MF ohne S9-Mix untersucht. Es konnten keine DNA-Strangbrüche oder alkalilabilen Stellen via Comet-Assay in HepG2-Zellen (0,5–2 mM MF) oder pRH (100–500 µM) detektiert werden. Der Mikrokernstest hingegen zeigte in HepG2-Zellen nach 24 h Inkubation mit 0,5–2 mM MF einen dosisabhängigen signifikanten Anstieg der Mikrokernfrequenz. In pRH mit 0, 5–1 mM MF wurde nach 3 h und 24 h ein leichter Trend

beobachtet, jedoch als nicht signifikant gewertet. Zytotoxische Effekte könnten jedoch zu falsch-negativen Ergebnissen führen, laut der Autoren (Jochum, 2020).

Die sub-/akute Gentoxizität von MF untersuchten Huo *et al.* (2019, 2020) *in vivo* an Sprague-Dawley-Ratten in einer 3 Tage- und 28 Tage-Studie mittels Comet-Assay, Pig-a-Genmutationstest und Mikrokerntest. Für Erstere wurden die Ratten 3 Tage mit 25–150 mg/kg KG/d MF *p. o.* behandelt und peripheres Blut für die Untersuchungen genutzt. Während in der höchsten Dosisgruppe im alkalischen Comet-Assay ein signifikanter Anstieg der *tail intensity* beobachtet wurde, konnte im Mikrokerntest und Pig-a-Genmutationstest kein Unterschied zu Negativkontrollen detektiert werden (Huo *et al.*, 2019). Für die 28 Tage-Studie wurde den Ratten 0,625–20 mg/kg KG/d MF *p. o.* verabreicht, wobei der alkalische Comet-Assay (peripheres Blut, Leber), Pig-a-Genmutationstest (peripheres Blut) sowie Mikrokerntest (peripheres Blut, Knochenmark) negativ ausfielen (Huo *et al.*, 2020). Die Autoren schlussfolgerten, dass *in vivo* von MF weder von einer akuten noch subakuten mutagenen Wirkung auszugehen ist.

Verteilungs- und Bindungsstudien mit ¹⁴C-markiertem MF (50–200 mg/kg KG an Sprague-Dawley-Ratten) zeigten *in vivo* die höchste Radioaktivität gebunden an DNA isoliert aus der Leber sowie in geringerem Maße aus der Niere (Ravindranath *et al.*, 1986). Konkrete Addukte sind allerdings bisher nicht bekannt.

Somit konnte weder eindeutige gentoxische oder mutagene Wirkung von MF nachgewiesen werden noch eine Hypothese bezüglich eines Mechanismus aufgestellt werden. Für die Gefährdungsbeurteilung von MF als Lebensmittelkontaminante erachtete die EFSA es als notwendig, den der Toxizität zugrundeliegenden Mechanismus weiter zu untersuchen (Knutsen *et al.*, 2017).

2.2.5. Risikobewertung

Becalski *et al.* (2010) ermittelte den Gehalt an Furan, MF und 3-MF in 176 Lebensmitteln inklusive Säuglingsnahrung, wobei die meisten Proben verpackt in Konserven und Gläser waren. MF wurde mit einer Nachweisgrenze (LOD, engl.: *limit of detection*) von 1 ng/g in 96 % der Proben ohne Säuglingsnahrung ermittelt, wobei der Median bei 12,8 ng/g und die maximale Konzentration bei 152 ng/g (exklusive Kaffee) lag. Alle untersuchten Säuglingsnahrungsproben enthielt MF mit einem Median von 8,7 ng/g und maximaler Konzentration von 50,2 ng/g. Die Abschätzung der täglichen Aufnahme wurde über die Gesamtexposition von Furan, MF und 3-MF summiert, deren prozentualer Nachweis in Lebensmitteln (mit einem LOD von 1 ng/g), dem Median und der maximalen Konzentration in Tab. 5 aufgelistet sind. In der Tabelle wurde Kaffee als Hauptexpositionsquelle von Erwachsenen nicht einberechnet, um die mittleren MF-Gehalte durch die deutlich erhöhte Gehalte in Kaffee nicht zu verzerren. Für Furan, MF und 3-MF wurden maximale Konzentrationen von 4590, 8680, bzw. 450 ng/g in gemahlenem, gerösteten Kaffee bestimmt.

Die Gesamtexposition über die drei Furan-Derivate wurde für erwachsene Nichtraucher auf 0,71 µg/kg KG/d und für Kleinkinder auf 1,34 µg/kg KG/d kalkuliert.

Tab. 5: Furan, MF und 3-MF-Gehalte in Lebensmittelproben (aus Becalski *et al.*, 2010). Angaben als prozentualer Anteil an entsprechendem Furan nachgewiesen in Proben, dem Median und der maximalen gemessenen Konzentration (Kaffeeproben wurden hier nicht einberechnet). MF: 2-Methylfuran, 3-MF: 3-Methylfuran.

	Proben, ohne Babynahrung			Babynahrung		
	Nachweis [%]	Median [ng/g]	Max. Konz.* [ng/g]	Nachweis [%]	Median [ng/g]	Max. Konz. [ng/g]
Furan	100	28	1230	100	8,5	331
MF	96	12,8	152	100	8,7	50,2
3-MF	81	6	151	65	1,6	22,9

Das wissenschaftliche Gremium für Kontaminanten in der Lebensmittelkette (eng.: *scientific panel on contaminants in the food chain*, CONTAM Panel) der EFSA evaluierte 2017 aufgrund der limitierten Datenlage das Risiko von MF ausgehend von der Gesamtexposition von Furan, MF und 3-MF. Für Erwachsene wurde die mittlere, chronische, tägliche Gesamtexposition zwischen 0,21–2,29 µg/kg KG/d mit einem Median zwischen 1,14–1,18 µg/kg KG/d (95-stes Perzentil: 0,46–5,78 µg/kg KG/d) ermittelt. Für Kleinkinder wurde eine mittlere, tägliche Gesamtexposition von 0,17–1,35 µg/kg KG/d berechnet (Median: 1,54–17,0 µg/kg KG/d; 95-stes Perzentil: 0,34–2,36 µg/kg KG/d). Die höchste mittlere Exposition wurde für Ältere mit 3,3 µg/kg KG/d und dem höchsten 95-sten Perzentil von 6,1 µg/kg KG/d berechnet. Aufgrund der limitierten Datenlage von MF und 3-MF basiert der MOE auf der Gesamtexposition von Furan, MF plus 3-MF und dem Vorkommen von Cholangiofibrosen in Langzeitstudien von Furan. Das CONTAM Panel der EFSA ging davon aus, dass die vergleichbare akute bis subchronische Hepatotoxizität der drei Derivate auf dem gleichen Mechanismus nach CYP-vermittelter metabolischer Aktivierung beruht und damit auch ähnliche Ergebnisse in Langzeitstudien postuliert werden können. Der BMDL₁₀ von 0,064 mg/kg KG/d Furan basierte auf der Entstehung von Cholangiofibrosen als nicht-neoplastischer Endpunkt in einer 2 Jahres-Studie an Ratten. Mit diesem BMDL₁₀ von Furan und der kumulierten Expositionsabschätzung von Furan, MF und 3-MF wurde ein gemeinsamer MOE berechnet. Es ergab sich für die Summe an Furan, MF und 3-MF ein MOE von 430 (minimale, untere Grenze)–20 (maximale, obere Grenze) bezogen auf die mittlere Expositionsabschätzung, bzw. 220 (minimale, untere Grenze)–10 (maximale, obere Grenze) kalkuliert mit dem 95-sten Perzentil der Expositionsabschätzung. Somit liegt der MOE unter 100 für die Inzidenz von Cholangiofibrosen in mehr als 50 % der Nahrungsmittelzusammensetzungen von Erwachsenen (inklusive Ältere, über die Abschätzung der mittleren Exposition sowie des 95-sten Perzentils). Der Kaffeekonsum wurde als Hauptexpositionsquelle für Erwachsene hervorgehoben, insbesondere da MF mit einer durchschnittlich 4-fach höheren Konzentration als Furan einen signifikanten Einfluss auf die Gesamtexposition der drei untersuchten Furan-Derivate hat. Aufgrund der unzureichenden Datenlage zur MF-Exposition wurde eine potentielle Steigerung der Gesamtexposition der drei Furan-Derivate um mehr als 300 %

diskutiert. Basierend auf einigen Ernährungserhebungen, liegt für Jüngere der MOE zum Teil ebenfalls unter 100. Das CONTAM Panel bewertete, dass MF die Gesamtexposition der drei Furan-Derivate signifikant steigern und damit die Gefahr der Hepatotoxizität erhöhen kann. Es sei jedoch unabdingbar die limitierte Datenlage zu ergänzen, besonders hinsichtlich des Vorkommens, der Entstehung in Lebensmitteln und Mechanismen der Toxizität von MF (Knutsen *et al.*, 2017).

3. Problemstellung

Als hitzeinduzierte Kontaminante zeigt sich die Relevanz von MF durch deren ubiquitäres Vorkommen in Lebensmitteln. Sie kann aus allgegenwärtigen Vorläuferinhaltsstoffen wie Aminosäuren, Kohlenhydrate oder Fettsäure bei thermischer Prozessierung entstehen (Limacher *et al.*, 2008; Adams *et al.*, 2011). In geringeren Konzentrationen kommt MF auch in unbehandeltem Gemüse oder Obst vor. Die Hauptexpositionsquelle für Erwachsene ist Kaffee, während Kinder hauptsächlich durch Getreideprodukte wie Cerealien und Fertigbrei exponiert sind (Becalski *et al.*, 2010; Becalski *et al.*, 2016). Studien zeigten unabhängig von einer spezifischen Ernährung die Exkretion von MF im Urin. Bei Rauchern wurden höhere Gehalte erfasst (Filipiak *et al.*, 2012).

Studien mit Ratten zeigen hepatotoxische Effekte von MF in Form von Nekrosen, sowie in geringerem Ausmaß eine Schädigung des Lungengewebes (Gill *et al.*, 2014). Via Verteilungs- und Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem MF wurde die Leber als Hauptzielorgan bestätigt. Hier wurde neben der totalen Radioaktivität der höchste Gehalt radioaktiver Substanz gebunden an Proteine und DNA, nach deren Isolation, detektiert. Inkubationen mit Mikrosomen aus der Leber, Nieren und Lunge von Ratten ließen auf eine CYP-vermittelte, metabolische Aktivierung von MF zu AcA schließen. Die signifikante Beeinflussung des MF-Umsatzes durch den Einsatz von CYP-Induktoren als auch -Inhibitoren untermauert die Relevanz der CYPs für den MF-Metabolismus. Synthetisch hergestelltes als auch mikrosomal aus MF gebildetes AcA reagierte mit Aminosäuren wie Cystein, Lysin und dem Tripeptides GSH. Die Reaktion des α,β -ungesättigte Carbonyl AcA mit mikrosomalem Protein führte teilweise zu dessen Inaktivierung (Ravindranath *et al.*, 1984a; Ravindranath und Boyd, 1985; Ravindranath *et al.*, 1986).

Jedoch fehlen entscheidende Daten für eine vollständige Risikobewertung von MF. So wurde lediglich basierend auf der Gesamtexposition von Furan, MF und 3-MF in Bezug auf die Induktion von Cholangiofibrosen durch Furan ein MOE für MF bestimmt. Bezogen auf die mittlere Expositionsabschätzung wurde eine obere, bzw. untere Grenze des MOE von 430–20 berechnet (bzw. 220–10 bezogen auf das 95-sten Perzentil der Expositionsabschätzung). Insbesondere bei einer möglichen Unterschätzung der MF-Exposition, hat MF das Potential zur Hepatotoxizität beizutragen, laut CONTAM Panel der EFSA. Daher empfiehlt es neben weiterer Erforschung der Exposition sowie dem Durchführen chronischer Tierstudien, die Untersuchung zugrundeliegender Mechanismen. Der MOA ist demnach entscheidend für die Wahl und Gewichtung der Bewertungskriterien (Knutsen *et al.*, 2017).

An die Frage nach dem molekularen und chemischen Mechanismus der toxischen Effekte anknüpfend, wurden die folgenden Schwerpunkte dieser Arbeit gewählt.

Zu Beginn sollte MF *in silico* basierend auf der chemischen Struktur toxikologisch eingestuft werden, auch um das 3R-Konzept der REACH-Verordnung umzusetzen. Das Programm *ToxTree* wurde zunächst genutzt, um MF als unmetabolisierte Komponente in klassische Kategorien, wie die Cramer-Klassen aber auch mögliche Reaktionsmuster und Endpunkte einzuordnen. Dies ermöglichte den direkten Vergleich mit den Derivaten Furan samt seinem bekannten Metaboliten BDA, 2,5-Dimethylfuran (DMF) als dimethyliertes Derivat sowie den von MF abgeleiteten, potentiellen Metaboliten Furfurylalkohol (FFA) und AcA. Angeschlossen wurde eine umfangreiche Analyse der quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehung (QSAR, engl.: *quantitative structure-activity relationship*) via *QSAR toolbox* der Organisation für Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD, engl. *organisation for economic co-operation and development*). Unter Einbezug metabolischer Schritte wurden eine generelle Einstufung sowie endpunktspezifische Abschätzungen durchgeführt und validiert. Darauf basierend und in Einklang mit der Literatur wurde AcA als primärer Metabolit von MF weiter untersucht.

***In chemico* sollte AcA als auch dessen Addukte mit Aminosäuren und DNA identifiziert, synthetisiert und charakterisiert werden. Quantitative Analysemethoden sollten entwickelt und die Reaktivität untersucht werden.** Synthetisiertes AcA wurde auf seine Stabilität in verschiedenen Lösungsmitteln und seine Reaktivität gegenüber *N*-Acetyl-L-cystein (AcCys) und *N*_α-Acetyl-L-lysin (AcLys), zwei *N*_α-geschützte Aminosäuren eine Amino- bzw. Thiolgruppe präsentierend, getestet. Ebenso wurden die Reaktion von AcA mit den Nukleosiden 2'-Desoxyadenosin (dA), 2'-Desoxyguanosin (dG), 2'-Desoxycytosin (dC) und 2'-Desoxythymidin (dT) untersucht. Die Syntheseprodukte der Addukte dienten als Standard für die Etablierung sensitiver (U)HPLC-MS/MS-Methoden zur Quantifizierung unter Einbezug analog synthetisierter isotope markierter Standards. Dies schaffte die Grundlage für die folgenden Versuche.

Es galt die metabolische Aktivierung von MF zu AcA zu verifizieren und die interspezifische Umsetzung zu vergleichen. Zudem sollte die Frage nach (dem) verantwortlichen Schlüsselenzym(en) für die oxidative Ringöffnung von MF beantwortet werden. Da in bisherigen Studien die Bildung von AcA als Phase I-Metabolit von MF meist indirekte über die Bindung von ¹⁴C-markierter Substanz an mikrosomalem Protein untersucht wurde, war das Ziel in dieser Arbeit die direkte Erfassung des Produkts. Dabei wurde hochreaktives AcA mit AcLys abgefangen und via HPLC-ESI⁺-MS/MS quantifiziert. Zu Beginn wurde die metabolische Aktivierung von MF in RLM *versus* HLM zeit- und dosisabhängig bestimmt, um diese über enzymkinetische Parameter zu vergleichen. Im Anschluss wurden die Umsatzrate von MF mit CYP 1A2, CYP 2A6, CYP 2C9, CYP 2D6, CYP 2E1 und CYP 3A4 untersucht. Für das Schlüsselenzym wurden ebenfalls die enzymkinetischen Parameter bestimmt.

Desweiteren sollte die Bildung von AcA und dessen Addukte *in vitro* getestet werden, um potentielle Biomarker zu identifizieren, aber auch die Frage nach einem genotoxischen Mechanismus zu untersuchen. Zur Untersuchung des Einflusses der metabolischen Kapazität auf die Zytotoxizität von MF, wurden pRH und HepG2-Zellen mit MF und AcA inkubiert. In metabolisch kompetenteren Zellen wurde daraufhin die Bildung der zuvor *in chemico* charakterisierten AcA-Addukte nach Exposition mit MF oder AcA analysiert. Neben den Aminosäure-Addukte AcLys-AcA und AcCys-AcA wurden die DNA-Addukte dA-AcA, dG-AcA und dC-AcA untersucht.

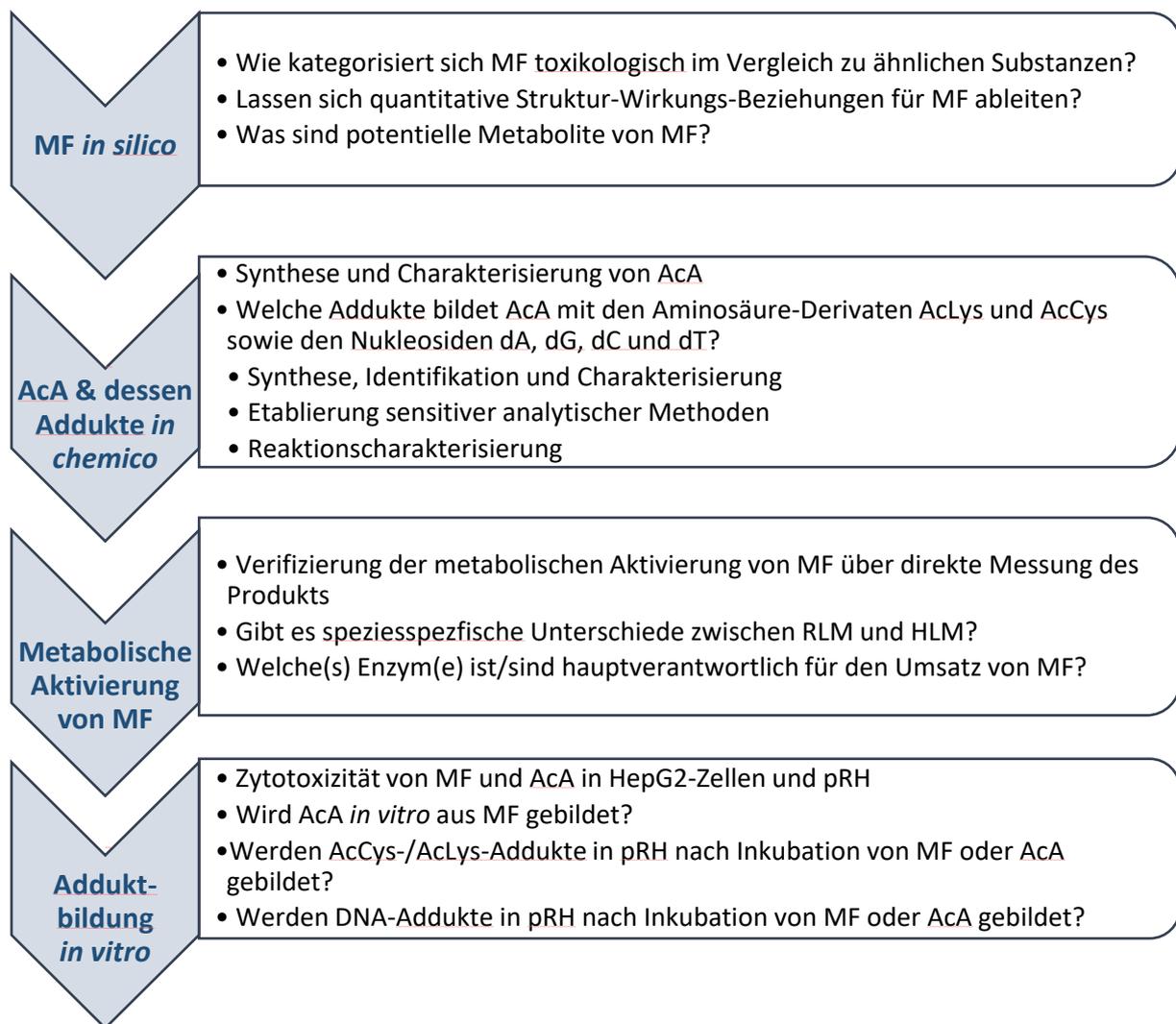


Abb. 6: Fragestellungen dieser Arbeit zur Untersuchung des Metabolismus von 2-Methylfuran (MF). AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: *N*-Acetyl-L-cystein, AcLys: *N*_α-Acetyl-L-lysin; dA: 2'-Desoxyadenosin, dC: 2'-Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, pRH: primäre Rattenhepatozyten, dT: 2'-Desoxythymidin.

4. Ergebnisse & Diskussion

4.1 *In silico* Betrachtung von 2-Methylfuran

MF wurde *in silico* mittels der Programme *ToxTree* und *QSAR toolbox* (der OECD) untersucht. *ToxTree* wurden zur ersten Klassifizierung hinsichtlich toxikologisch relevanter Strukturelemente von MF genutzt und mit strukturelle ähnlichen Substanzen verglichen. Abb. 7 zeigt eine Auswahl an Substanzen, die im Zuge der *in silico* Untersuchung von MF zur Diskussion herangezogen wurden. Im Anschluss wurde mit *QSAR toolbox* eine umfangreichere (quantitative) Struktur-Wirkungs-Beziehung-Analyse von MF durchgeführt. Einbezogen wurden die metabolische Transformation und der direkte Vergleich von Strukturelementen analoger Substanzen sowie deren Abbauprodukte. Die Durchführung und Programme sind in Kap. 6.3 des experimentellen Teils zu finden.

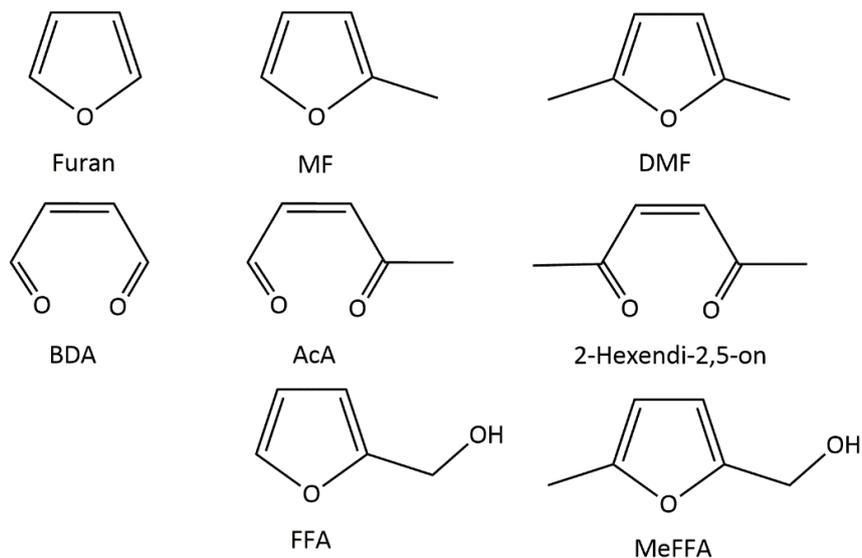


Abb. 7: Strukturen, die im Zuge der *in silico* Untersuchung von MF diskutiert wurden. AcA: 3-Acetylacrolein, BDA: 2-Buten-1,4-dial, 2,5-Dimethylfuran, FFA: 2-Furfurylalkohol, MeFFA: 5-Methyl-furfurylalkohol, MF: 2-Methylfuran.

4.1.1. Kategorisierung von MF via *ToxTree*

ToxTree ermöglichte nicht nur die Einteilung der Substanzen in Cramer-Klassen, sondern auch davon abgeleitete Abschätzungen weiterer Endpunkte, welche in Tab. 6 zusammenfasst wurden. Für diese Arbeit wurden folgende Substanzen zum Vergleich via *ToxTree*-Analyse gewählt: Furan wurde als heterozyklisches Grundgerüst und DMF als ebenfalls methyliertes Analoga betrachtet. Weiterführend wurde AcA als Metabolit von MF in Anlehnung an BDA als bekannter Metabolit von Furan überprüft. FFA wurde als weiterer hypothetischer Metabolit in Hinblick auf die diskutierte Seitenkettenhydroxylierung von DMF im Zug einer metabolischen Aktivierung mitgeführt (Knutsen *et al.*, 2017). Da 5-Methyl-Furfurylalkohol als Metabolit von DMF jedoch noch nicht nachgewiesen wurde, lagen keine solchen Daten zur

Einbindung in die *in silico* Abschätzung von MF vor. Eine Übersicht der verglichenen Strukturen gibt Abb. 7 mit *in silico* relevanten Daten in Tab. 6.

Tab. 6: *In silico* verglichene Strukturen. Daten aus *ToxTree* und QSAR toolbox der OECD (und ergänzt nach Evans und Relling, 1999; American Chemical Society, 2017). *) wenn $-0,4 \leq \log P \leq 5,6$. AcA: 3-Acetylacrolein, BDA: 2-Buten-1,4-dial, 2,5-Dimethylfuran, FFA: 2-Furfurylalkohol, MF: 2-Methylfuran.

	CAS-Nr.	M [g/mol]	Log P	Drug likeness*	H-Donor	H-Akzeptor
MF	534-22-5	82,10	1,791	ja	0	1
Furan	110-00-9	68,07	1,736	ja	0	1
DMF	625-86-5	96,13	1,830	ja	0	1
FFA	98-00-0	98,10	0,213	ja	1	2
AcA	5729-47-5	98,10	-0,460	(nein)	0	2
BDA	3675-13-6	84,07	-0,249	ja	0	2

Die Module von *ToxTree* wurden in die Gruppen Konzepte (mit dem klassischen Cramer-Entscheidungsbaum und verwandten Schemata), Reaktivität sowie definierte Endpunkte wie Irritation/Sensibilisierung und Mutagenität & Kanzerogenität aufgeteilt. Die Ergebnisse von MF, Furan, DMF, FFA, BDA und AcA sind dementsprechend in Tab. 6 gegenübergestellt. Bis auf Letztere wurden alle Einstufungen automatisch in *ToxTree* kategorisiert, wohingegen für AcA analog zu BDA, mit den gleichen, entscheidenden Strukturelementen, die Entscheidungsabfrage manuell durchgeführt wurde. Während MF, Furan, DMF und FFA von *ToxTree* in Cramer-Klasse III mit einem hohen toxikologischen Potential eingestuft wurden, lag für BDA und AcA nur eine niedrige Klassifizierung (I) in diesem Modul vor. Das Modul „überarbeiteter Cramer-Entscheidungsbaum“ zeigte FFA, BDA und AcA jedoch bereits als Intermediate (Klasse II) mit einer unspezifischen Reaktivität (Klasse 3) im Verhaar-Schema für toxikologisch relevante MOA. Für die Muttersubstanzen MF, DMF und Furan wurden in spezifischen Modulen bis auf die Rubrik „Hautirritation“ und „DNA-Bindung“ keine *structural alerts* identifiziert. Währenddessen wurde für BDA und AcA in diesen mindestens ein *alert* gefunden, was für FFA nur teilweise zutraf. So wurde im „Kroes“-Entscheidungsbaum für einen TTC im Falle von MF, Furan, DMF sowie FFA kein Sicherheitsrisiko erwartet. BDA und AcA wurden hier eine geringe Wahrscheinlichkeit eines lebenslangen Krebsrisikos größer als 1 von 10^6 zugeordnet, welche als vernachlässigbares Risiko gilt. Jeder substanzspezifischen Einschätzung in den verschiedenen Modulen wurde durch *ToxTree* eine strukturelle Erklärung zugrunde gelegt. Während die einzelnen Entscheidungen dem elektronischen Anhang (I) zu entnehmen sind, lassen sie sich wie folgt zusammenfassen. MF, Furan und DMF sind als „substituierte, aromatische Heterozyklen mit Etherkomponente“ charakterisiert. FFA definiert sich in seiner toxikologischen Bewertung zusätzlich mit einer guter Abgangsgruppe an α -Position. Im Gegensatz dazu wurde bei BDA und AcA die α,β -ungesättigte Carbonylkomponente sowie das Potential als Michael-Akzeptoren zu agieren als *structural alerts* genannt.

Tab. 7 (Fortsetzung): *In silico* Einstufung von MF, Furan, DMF, FFA, BDA und AcA via *ToxTree*. Die Einstufung von AcA wurde manuell nach dem Entscheidungsbaum analog zu BDA durchgeführt, während die Abfrage der übrigen Substanzen automatisch durchlaufen wurden. AcA: 3-Acetylacrolein, BDA: 2-Buten-1,4-dial, DMF: 2,5-Dimethylfuran, FFA: Furfurylalkohol, MF: 2-Methylfuran. *) Zusammenfassung der entscheidenden Strukturelemente.

Gruppe	ToxTree-Modul	MF	Furan	DMF	FFA	BDA	AcA
Mutagenität & Kanzerogenität	<i>In vitro</i> Mutagenität (Ames-Test), Alerts von ISS	Kein <i>alert</i>	Kein <i>alert</i>	Kein <i>alert</i>	Kein <i>alert</i>	potenziell mutagen in <i>S. typhimurium</i> (TA100)	potenziell mutagen in <i>S. typhimurium</i> (TA100)
		Klasse II (keine <i>alert</i>)	Klasse II (keine <i>alert</i>)	Klasse II (keine <i>alert</i>)	Klasse I (mind. 1 <i>alert</i>)	Klasse I (mind. 1 <i>alert</i>)	Klasse I (mind. 1 <i>alert</i>)
	Mikronukleus-Assay <i>in vivo</i> (Nagern)					- <i>alert</i> für genotox. Kanzerogenität	- <i>alert</i> für genotox. Kanzerogenität
Benigni/Bossa-Regeln für Kanzerogenität und Mutagenität		Kein <i>alert</i>	Kein <i>alert</i>	Kein <i>alert</i>	Kein <i>alert</i>	- potenziell mutagen in <i>S. typhimurium</i>	- potenziell mutagen in <i>S. typhimurium</i>
						- Mutagenität und Kanzerogenität nicht auszuschließen	- Mutagenität und Kanzerogenität nicht auszuschließen
	ILSI/Kroes Entscheidungsbaum für TTC	Es wird nicht erwartet, dass ein Sicherheitsrisiko besteht.	Es wird nicht erwartet, dass ein Sicherheitsrisiko besteht.	Es wird nicht erwartet, dass ein Sicherheitsrisiko besteht.	Es wird nicht erwartet, dass ein Sicherheitsrisiko besteht.	Vernachlässigbares Risiko (geringe Wahrscheinlichkeit eines lebenslangen Krebsrisikos größer als 1 von 10 ⁶)	Vernachlässigbares Risiko (geringe Wahrscheinlichkeit eines lebenslangen Krebsrisikos größer als 1 von 10 ⁶)
Entscheidende <i>Structural alerts</i> *		Substituierter, aromatischer Heterozyklus mit Ether- Komponente	Substituierter, aromatischer Heterozyklus mit Ether- Komponente	Substituierter, aromatischer Heterozyklus mit Ether- Komponente	Aromatischer Heterozyklus substituiert mit guter Abgangsgruppe an α -Position	α, β -ungesättigte Carbonylverbindung	α, β -ungesättigte Carbonylverbindung

Deutlich wird hier die teilweise unterschiedliche Einstufung der gleichen Substanz abhängig vom Modul mit den unterschiedlichen Entscheidungsbäumen. Besonders auffällig ist die gegensätzliche Einstufung der Substanzen MF, Furan und DMF. Sie wurden als Cramer-Klassen mit hohem toxikologischem Potential gekennzeichnet, aber in den meisten Endpunkten wurde ihnen kein *structural alert* zugeordnet. Im Gegensatz dazu wurden AcA und BDA einerseits über die Cramer-Klassifizierung als weniger toxikologisch eingestuft, während ihnen andererseits in Bezug auf spezifische Endpunkte und Reaktivitäten ein entsprechend toxikologisches Potential zugesprochen wurde. Dies spiegelt die isolierte Abhandlung von einzelnen Modulen als unabhängige Algorithmen wider, was eine deutliche Limitierung der Risikoeinstufung mittels *ToxTree* darstellt. Die Einschätzung von *ToxTree* zeigte sich als geeignet zur Hervorhebung akuter struktureller Komponenten, jedoch wird hier lediglich die Substanz selbst ohne ihre Umwandlung im Fremdstoffmetabolismus betrachtet. Somit stehen die betrachteten Substanzen und ihr Ergebnis aus *ToxTree* voneinander losgelöst gegenüber. Dabei sind für eine Risikobetrachtung Zusammenhänge, bzw. strukturelle Gemeinsamkeiten und daraus folgende ähnliche toxikologische Endpunkte von großem Interesse. Nach dieser ersten Einschätzung wurden die Substanzen daher mittels *QSAR toolbox* (der OECD) genauer betrachtet, welche ermöglichte eigene Erfahrungen in den Prozess interaktiv einfließen zu lassen.

Publikationen zur Betrachtung von MF (oder der anderen diskutierten Vergleichssubstanzen) *in silico* sind bisher nicht bekannt. Der Vergleich experimenteller Untersuchungen wird im nächsten Kapitel mit den mittels *QSAR toolbox* generierten Daten diskutiert, um ein zusammenhängendes Bild der Einschätzung von MF *in silico* aufzuzeigen.

4.1.2. Analyse der Struktur-Wirkungs-Beziehung von MF via *QSAR toolbox*

Das Programm *QSAR toolbox* der OECD wurde genutzt, um *in silico* mögliche Intermediate von MF zu identifizieren und unter Einbezug deren endpunktspezifischer Effekte im Vergleich mit ähnlichen Strukturen zu extrapolieren.

Der automatisierte oder standardisierte Prozess (*workflow*) eignete sich nicht zur Abschätzung eines hautsensibilisierenden Potentials, da die automatische Auswahl an Analoga mit abweichenden funktionellen Gruppen nicht zufriedenstellend war. Die manuelle, schrittweise Durchführung nach den Vorgaben der OECD, bzw. europäischen Chemikalien-Agentur (ECHA, engl. *European Chemicals Agency*) brachte dabei den Vorteil der Transparenz und die Möglichkeit eigene Kenntnisse einfließen zu lassen mit sich.

In diesem Kapitel wird zunächst erläutert wie ein Profil von MF erstellt wurde, wie die Auswahl der zu untersuchenden Endpunkte getroffen wurde und wie bei der Kategorisierung der ermittelten Vergleichssubstanzen vorgegangen wurde. Daran anschließend werden die Ergebnisse zu den untersuchten Endpunkten „Genetische Toxikologie“, „Hautsensibilisierung“ und „Kancerogenität“ eingeordnet. Tab. 9 fasst die Ergebnisse der QSAR-Analyse zusammen.

Die einzelnen Schritte der Durchführung sind im experimentellen Teil (Kap. 6.3.2) erläutert, während die Protokolle der einzelnen Untersuchungen im elektronischen Anhang (Anhang I) zu finden sind.

Erstellung des Profils von MF

Im Zuge der Profilerstellung (*profiling*) wurde MF in Cramer-Klasse III mit hohem toxikologischem Potential zugeordnet sowie der Option via Michael-Addition an DNA zu binden (nach OECD). Der Simulator „*in vivo* Ratten“ der *QSAR toolbox* ermöglichten den Metabolismus *in vivo* (Ratte) der untersuchten Substanz zu simulieren, um potentielle Metabolite zu ermitteln. Für MF wurden die in Tab. 8 aufgelisteten Metabolite, ihre mögliche Entstehung, *structural alerts*, Reaktionsmechanismen, toxikologischen Potentiale und zugrunde gelegter Literatur postuliert. Anschließend wurden die Metabolite nach ihrer Struktur und Eigenschaft manuell gruppiert. Abgeleitet von ihrer Stammstruktur wurden die Gruppen „AcA“ und „FFA“ benannt.

Tab. 8: Metabolite von MF generiert via *QSAR toolbox* (der OECD) mit dem Metabolismus/Transformations-Simulator „*in vivo* Ratte“. Die vom Programm ermittelten potentiellen Metabolite wurden im Anschluss manuell basierend auf ihrer Grundstruktur und Eigenschaften gruppiert. *) aus AcA; **) vermutlich instabile Vorstufe von AcA (Hudzik und Bozzelli, 2017); ***) (Peterson *et al.*, 2000; Høie *et al.*, 2016). AcA: 3-Acetylacrolein, FFA: Furfurylalkohol, Fu: Furan, MeFFA: 5-Methylfurfurylalkohol.

Gruppe	„AcA-Gruppe“	„FFA-Gruppe“
Metabolite	AcA Lakton* Epoxide**	FFA Fu-CHO Fu-COOH
Entstehung	- Oxidative Ring-Öffnung - P450 vermittelte Aktivierung von heterozyklischen Ringsystemen	- Alkyloxydation - P450 vermittelte Aktivierung von heterozyklischen Ringsystemen
<i>Structural alerts</i>	α,β -ungesättigte Carbonylverbindung, Schiff'sche Base	Aromatischer Heterozyklus mit Alkylgruppe
Reaktionsmechanismus	Michael-Addition Nukleophile Addition (A_N2)	Michael-Addition
Potential	DNA-Bindung (nach OASIS, OECD)	DNA-Bindung (nach OECD)
Literatur***	BDA als bekannter Metabolit von Furan	MeFFA als Metabolit von DMF diskutiert

Verbindungen der „**AcA-Gruppe**“ entstünden durch oxidative Ringöffnung aus MF, der eine CYP-vermittelte Aktivierung möglicherweise zum Epoxid an Stelle der Doppelbindung vorhergehen. Die entstehende α,β -ungesättigte Carbonylverbindung hat ein hohes Potential via nukleophiler oder Michael-Addition, z. B. an DNA, zu reagieren. Die oxidative Ringöffnung als metabolische Aktivierung der Phase I ist für ähnliche Substanzen aus der Literatur bekannt: So ist BDA als bekannter Metabolit von Furan zu nennen (Chen *et al.*, 1995; Peterson *et al.*, 2005; Peterson *et al.*, 2006). Ebenso wurde die oxidative Ringöffnung von DMF zu 3-Hexen-2,5-dion beschrieben (Wang *et al.*, 2015).

In der „**FFA-Gruppe**“ sind von *QSAR toolbox* postulierte MF-Metabolite zusammengefasst, die als aromatische Heterozyklen eine Alkylgruppe mit unterschiedlichem Oxidationsgrad besitzen. Auch hier wurde eine CYP-vermittelte Aktivierung und Michael-Addition als mögliches Reaktionsmuster postuliert. In der Literatur wurde die Alkyloxydation als metabolische Aktivierung im Falle von DMF zu 5-Methyl-furfurylalkohol (MeFFA) diskutiert: Eine der Aktivierung folgende, PAPS-abhängige Sulfokonjugation durch SULT könne durch spontane Desintegration zu einem hoch reaktiven Carbeniumion führen mit dem Potential an DNA zu binden. Davon ausgehende genotoxische Effekte wurden in humanes SULT 1A2 exprimierenden Mäusen (hSULT 1A2-Mäusen) nach 6-wöchiger, oraler Gabe von DMF untersucht. Zwar zeigten weibliche Tiere eine signifikant erhöhte Tumorraten im Intestinaltrakt, jedoch war eine Fehlinterpretation durch eine auffallend niedrige Tumorraten in unbehandelten Mäusen nicht auszuschließen (Høie *et al.*, 2016). Auch im alkalischen Comet-Assay *in vivo* mit hSULT 1A1 und 1A2-Mäusen konnte kein genotoxisches Potential von DMF nachgewiesen werden (Høie *et al.*, 2015b). Im Comet-Assay *in vitro* wurde in V79-Zellen dagegen ein konzentrationsabhängiger Anstieg an DNA-Strangbrüchen beobachtet, unabhängig davon, ob sie humane CYP 2E1 und SULT 1A1 co-exprimierten (Huffman *et al.*, 2016). Während AcA als reaktiver Metabolit von MF bereits beobachtet wurde (Kap. 2.2.3.2), sind bisher keine Hinweise von FFA als MF-Metabolit bekannt. Jedoch ist die toxikologische Datenlage des seitenketten-hydroxylierten Aromaten, FFA, weitaus erforschter. So resultierte die einmalige FFA-Exposition von 250 mg/kg KG in hSULT 1A1 und 1A2 exprimierenden Mäusen in DNA-Addukten in Leber, Niere und Kolon (Høie *et al.*, 2015a). Die Bindung eines 2-Methylfuran-yl-Rests an dG wurde ebenfalls in einer 28 Tage-Studie in Leber-, Lunge- und Kolongewebe von transgenen Mäusen beobachtet (Monien *et al.*, 2011). Die Relevanz der SULT für die Toxifizierung von FFA wurde im Ames-Test auf Mutagenität verdeutlicht. Während die klassischen „Standardtests“ mit *Salmonella typhimurium*-Stämmen im Ames-Test keine mutagene Wirkung aufzeigten, wurde ein solcher Effekt in Stämmen mit humaner SULT-Expression beobachtet (Glatt *et al.*, 2012; Monien *et al.*, 2011). Ebenso wurde in FVB/N-Mäusen bereits nach einmaliger Gabe von 400 mg/kg KG die Bindung von FFA an Hämoglobin nachgewiesen. Das 2-Methylfuran-yl-Addukt am N-terminalen Valin des Hämoglobins lässt ebenfalls auf die metabolische Aktivierung über SULT schließen. In beiden Fällen wurde die PAPS-abhängige Konjugation von Sulfat über SULT, gefolgt von spontanem Zerfall des instabilen Konjugats und Bildung eines reaktiven Carbeniumions angenommen (Sachse *et al.*, 2017). In einer 90 Tage-Studie an Ratten war die Leber das Zielorgan der FFA-Exposition, was sich in Form von Nekrosen zeigte und eine Parallele zur Wirkung von MF darstellt. Zudem wurde eine Erhöhung der AST- wie ALT-Aktivität in Kombination mit Schäden am tubulären Epithelium der Niere verzeichnet (Sujatha, 2008).

Wahl der zu untersuchenden Endpunkte

„Metabolismus-Simulationen“ (wie „in vivo, Ratte“) von *QSAR toolbox* ließen auf ein hohes Potential an Proteine und DNA zu binden schließen, was die Wahl der Endpunkte *in silico* bestimmte und eine grundlegende Fragestellung dieser Arbeit aufgriff. Als toxikologischer Endpunkt stand zum einen die „genetische Toxikologie“ (Modul: „Genetische Tox.“), welcher mechanistische Grundlagen wie DNA-Bindung, Mutationen, Chromosomenaberrationen oder die Induktion von Mikrokernen zugrunde gelegt werden. Die Literaturdaten wurden in *in vitro* und *in vivo* unterteilt, welche zum Endpunkt „Kanerogenität“ führten.

Zur Nutzung des toxikologischen Endpunkts Hautsensibilisierung musste unterschieden werden, welche Parameter herangezogen wurden. Beruhte er auf der chemischen Reaktivität gegenüber Cystein oder GSH, konnten proteinbindende Eigenschaften abgeleitet werden. Gemäß des Hapten-Carrier-Prinzips (die Bildung eines Antikörpers durch Bindung einer Substanz an Proteine/Aminosäuren einhergehend mit der Aktivierung eines Prohaptens) ist das Potential somit nicht auf eine immunologische Reaktion alleine beschränkt. Der EC3-Wert beschreibt hingegen das sensibilisierende Potential als effektive Konzentration einer Substanz, die im Vergleich zu nicht-exponierten Kontrollen eine dreifache Zunahme der Zellteilung in Lymphknoten-Zellen induziert (Basketter *et al.*, 1999). Spezifisch wird dieser auch als hautsensibilisierendes Potential (SS, engl.: *skin sensitisation*) angegeben und erlaubt die Ableitung eines proliferierenden Potentials. Der entsprechende Endpunkt wurde bei der Ergebnisinterpretation angegeben. Die Wahl der Kategorisierungsmethoden (sprich des Endpunkts „Hautsensibilisierung“) wurde kombiniert mit dem Metabolismus-Simulator „*in vivo* Ratten-Metabolismus“. So wurden die generierten Metabolite nicht auf die Haut, sondern den Umsatz in der Leber, dem Hauptzielorgan von MF, bezogen. Schlussendlich war es auch eine Frage der verfügbaren Daten, die für den Endpunkt Hautsensibilisierung deutlich umfangreicher waren als für den Parameter „Chemische Reaktivität“. Das primäre Ziel war somit mittels QSAR eine Vorhersage zu den Endpunkten „Genetische Tox *in vivo*“ und „Hautsensibilisierung“ zu treffen. Nachgeordnet wurde die „Chemische Reaktivität“ und „Kanerogenität“ betrachtet, um das Gesamtbild zu ergänzen. Insbesondere bei letzterem Endpunkt war die Datenlage geringer und die Übertragbarkeit eingeschränkt. Denn die Aussagekraft der Vorhersage wird schwächer mit Zunahme der Komplexität des Endpunkts. Im Falle des mehrstufigen Prozesses der Kanerogenese spielen äußerst viele Faktoren eine Rolle, um zum Endpunkt zu führen.

Kategorisierung der Vergleichsubstanzen

Die erste Kategorisierung, sprich Gruppierung vergleichbarer Substanzen, basierte auf struktureller Ähnlichkeit. Es folgte die Übereinstimmung mechanistischer und endpunktspezifischer Eigenschaften in der Subkategorisierung. Eine Substanz wurde nur aus der Vergleichsgruppe herausgenommen, wenn die ausschlaggebende Struktureinheit, der

Reaktionsmechanismus, bzw. die endpunktspezifische Eigenschaft offensichtlich nicht mit der der Testsubstanz übereinstimmen. Der Vergleich von Gruppierungsmethoden und eine konservative Eliminierung stellte eine solide, reproduzierbare Auswahl an Analoga sicher, die eine kritische Schlüsselrolle einer QSAR-Analyse darstellt.

Die Sub-/Kategorisierung von MF ohne Einbezug des Metabolismus generierte keine zuverlässige Vergleichsgruppe, da entscheidende funktionelle Gruppen und damit verbundene Reaktionsmechanismen stark von der Struktur des MF abwichen. Daher wurde unter Einbezug der bei der Profilerstellung prognostizierter Metabolite fortgefahren, deren strukturelle Ähnlichkeit zu Analoga in Abb. 8 prozentral dargestellt wurde.

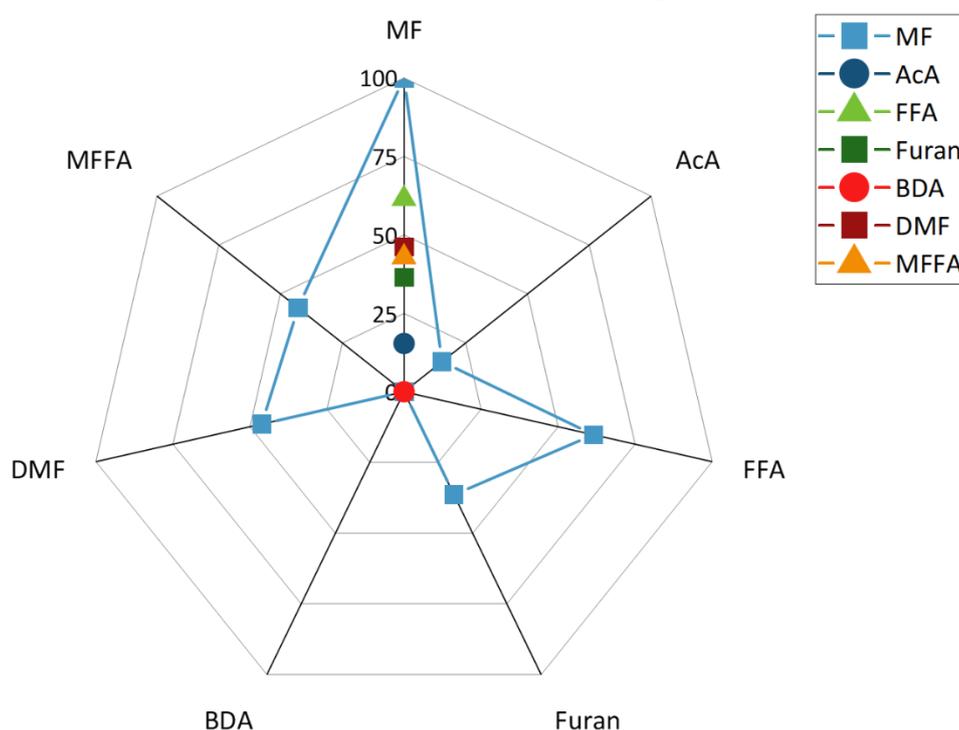


Abb. 8: Strukturelle Ähnlichkeit [%] von MF zu Furan, DMF, BDA und MeFFA berechnet mit *QSAR toolbox*. AcA: 3-Acetylacrolein, BDA: 2-Buten-1,4-dial, DMF: 2,5-Dimethylfuran, FFA: Furfurylalkohol, MF: 2-Methylfuran, MFFA: 5-Methylfurfurylalkohol.

Die primäre Kategorisierung war geleitet von der chemischen Struktur. Hierzu wurde die Kombination von Analoga mit x%iger Übereinstimmung zur Ausgangssubstanz MF sowie den Metaboliten AcA und FFA unter Simulation des Metabolismus („*in vivo*, Ratte“) bestimmt. Eine strukturelle Ähnlichkeit von 20 % generierte 612 analoge Substanzen, deren chemische Struktur zu unspezifisch war, wohingegen ab 40 % eine zu geringe Variabilität und Anzahl an Analoga generiert wurde. Als geeignet stellte sich eine 30%ige strukturelle Übereinstimmung mit 34 Vorschlägen für Vergleichssubstanzen heraus. Um die Startgruppe zu maximieren, wurde die Schnittmenge der 30%igen Übereinstimmung von Analoga der Ausgangssubstanz MF, AcA als auch FFA, unterschiedlich kombiniert, hinzugezogen. Um Substanzen mit grundlegend anderen funktionellen Gruppen auszuschließen, wurden zwei strukturelle Eingrenzungen vorgenommen. Zum einen wurde auf die chemischen Elemente auf C, H und O beschränkt, wodurch vor allem Halogenide und primäre Amide nicht berücksichtigt wurden.

Zum anderen wurden gezielt stark abweichende, funktionelle Gruppen herausgefiltert, zu denen Naphthalene und fusionierte, aromatische Systeme zählten. Bei diesen war von einem grundlegend unterschiedlichen Wirkmechanismus auszugehen, was sie gemäß den Kriterien aus Kap. 6.3.2 ausschloß. Weitere Subkategorisierung wurde endpunktspezifisch durchgeführt.

QSAR-Analyse des Endpunkts „Genetische Toxikologie“

Für den Endpunkt „Genetische Toxikologie“ *in vitro* konnte bei der Profilerstellung von MF auf bereits vorhandene Daten zurückgegriffen werden, die für MF ein negatives gentoxisches Potential angaben. Die vom Programm zitierte Literatur bezog sich auf Ames-Tests zur Bestimmung der Mutationsneigung in vornehmlich TA 98, 100 und 102 *Salmonella typhimurium*-Stämmen. Deren adäquate metabolische Kompetenz konnte jedoch ohne Wissen, welches Enzym für die Aktivierung verantwortlich ist, nicht beurteilt werden. Da zudem unterschiedliche Mechanismen zu gentoxischen Ereignissen führen können, ist eine gesonderte Betrachtung der Gentoxizität *in vivo* notwendig. Ohne vorliegende experimentelle Daten wurde hier mittels QSAR eine Abschätzung getroffen, für welche eine mechanistische als auch endpunktspezifische Subkategorisierung (DNA-bindend nach OECD) erfolgte. Zum Vergleich wurden sieben Analoga herangezogen, sodass mittels *read across* über sechs Endpunkte (wie z. B. Chromosomenabberation, DNA-Schäden und -Reparatur) das allgemeine gentoxische Potential für MF *in vivo* zunächst als negativ abgeschätzt wurde. Diese Vorhersage bezog sich jedoch auf keinen konkreten Endpunkt, weshalb keine Validierung mittels *read across*-spezifischem Bewertungsraster (RAAF, engl.: *read across assesement framework*) durchgeführt werden konnte. Im Folgenden wurde nach der strukturellen Gruppierung unter Einbezug des „Metabolismus-Simulators“ („*in vivo*, Ratte“) ein gentoxischer Endpunkt definiert. Neben der wissenschaftlichen Relevanz war auch das Vorhandensein von Vergleichsdaten von Bedeutung, welcher Endpunkt herangezogen wurde. Für den Endpunkt „Chromosomenaberrationen“ war die Vorhersage positiv und RAAF wurde erfolgreich durchgeführt. Hinsichtlich Mikrokerntests und DNA-Schäden (bzw. Schädigung von Proteinen, die relevant für die Zellteilung oder DNA-Reparatur sind) war eine Vorhersage nicht möglich, da die Vergleichbarkeit der Analoga ungenügend war.

QSAR-Analyse des Endpunkts „Hautsensibilisierung“

Der Endpunkt „Hautsensibilisierung“ wurde zunächst ohne Festlegung einer spezifischen „Einheit“ geprüft. In der mechanistischen, bzw. endpunktspezifischen Subkategorisierung wurden zwar keine weitere Substanz ausgeschlossen, jedoch für die vorangegangenen Gruppierungen der „Simulator“ für hautspezifische Metabolismen miteinbezogen. Elf verbleibenden Analoga wurden im *read across* positiv oder negativ eingestuft. Der Empfehlung der OECD folgend wurden die Vergleichsubstanzen, deren $\log K_{ow}$ dem $\log K_{ow}$ der Zielsubstanz am nächsten liegen, für die Beurteilung der Zielsubstanz herangezogen.

Darauf basierend wurde das hautsensibilisierende Potential von MF als positiv eingestuft. Die allgemeine Einschätzung galt es mittels Bewertungselementen zu prüfen, die der Validierung der Einstufung dienen. Als spezifischer Endpunkt wurden EC3-Werte herangezogen, zu denen genügend Daten mit kategorisierbaren Werten zur Verfügung standen. Es wurde ein *read across* unter Eingrenzung auf Substanzen mit Protein bindenden Eigenschaften (*protein binding by OECD*) durchgeführt. Aus den zehn angenommenen Vergleichssubstanzen wurde die Abschätzung für MF aus den fünf Werten, die am nächsten um den log K_{ow} von MF lagen, abgeleitet. Unter erfolgreicher Implementierung der Bewertungselemente zur Validierung der Kategoriekonsistenz im Rahmen des RAAF (Szenario 4) wurde ein Hautsensibilisierungspotential für MF bestätigt.

QSAR-Analyse des Endpunkts „Kancerogenität“

Für die Gruppierung zum Endpunkt „Kancerogenität“ wurde die jeweils erste Kategorisierung aus der Abschätzung der „Genetischen Tox.“ und „Hautsensibilisierung“ (unter dem Aspekt Proteinbindung und Proliferation) vereint. Dies galt dem Zweck, zum einen mehr Ausgangsanaloge für die weitere Subkategorisierung bereitzustellen, da die Datenlage von Kancerogenitätsstudien deutlich geringer war, um anderen sollten mehr Mechanismen (DNA- und Proteinbindung) miteinfließen. Jedoch standen nach Eliminierung von strukturell deutlich abweichenden stickstoffhaltigen Verbindungen (CAS# 88-19-7; 88-72-2) lediglich vier Substanzen zum Vergleich zur Verfügung. Zwar wird bei kontinuierlichen Daten eine Trendanalyse durchgeführt, jedoch wurde aufgrund der geringen Datenmenge auch *read across* zur Analyse getestet. Beide stellten sich als unzureichend heraus, weshalb die Einschätzung nicht angenommen wurde. In Tab. 9 sind die spezifischen Endpunkte der QSAR-Analyse von MF mittels *QSAR toolbox* zusammengefasst.

Tab. 9: QSAR-Analyse von MF in spezifischen Endpunkten via *QSAR toolbox* (der OECD). CA: Chromosomenaberrationen, MF: 2-Methylfuran, MNT: Mikronukleus-Test, RAAF: *Read across assessment framework*, SS: Hautsensibilisierend (engl.: *skin sensitisation*).

Effekt/Endpunkt	Test/spez. Endpunkt	Analyse	Analoga	Ergebnis	Anmerkung
Genetische Tox. <i>in vitro</i>	Ames-Test	Profil	-	negativ	<i>S. typhimurium</i>
Genetische Tox. <i>in vivo</i>	Mix (CA, MNT, DNA-Schäden, u.a.)	<i>Read across</i>	7	negativ	
	CA	<i>Read across</i>	4	positiv	RAAF (Szenario 6)
Haut-sensibilisierend	Mix (EC3, NOEL, SS)	<i>Read across</i>	11	positiv	
	EC3	<i>Read across</i>	10	positiv	RAAF (Szenario 4)

Fazit zur Analyse von MF in silico

Die *in silico* Untersuchung von MF lässt eine Steigerung des toxikologischen Potentials durch metabolische Aktivierung erwarten. Diese ist grundlegend für die (hypothetische) Reaktion mit Proteinen und DNA. Die potentiellen Metaboliten von MF wurden gruppiert als Derivate von AcA und FFA. Während die oxidative Ringöffnung bereits für die Metabolisierung von Furan zu BDA als auch DMF zu Hex-3-en-2,5-dion beschrieben wurde, war die Seitenkettenhydroxylierung von DMF zu MeFFA lediglich theoretisch in der Literatur betrachtet worden. Zwar können durch den *in silico* Ansatz keine endgültigen Aussagen über spezifische Endpunkte getroffen werden, jedoch geben die Ergebnisse Hinweise, die Toxizität von MF weiter zu untersuchen. Von besonderem Interesse ist das Potential von MF Protein- oder DNA-Addukte nach metabolischer Aktivierung zu bilden.

4.2 Synthese, Charakterisierung und Reaktivität *in chemico* von 3-Acetylacrolein (AcA) und dessen Addukten

Die *in silico* Untersuchungen ließen einen potentiell toxischen Charakter von MF nach metabolischer Aktivierung vermuten. Dabei wurden die vorgeschlagenen Metabolite in zwei Gruppen unterteilt, eine Gruppe abgeleitet von AcA und eine von FFA. AcA kann durch oxidativen Ringöffnung aus MF entstehen (Ravindranath *et al.*, 1984a). Analog dazu ist in der Literatur die metabolische Aktivierung von Furan zu BDA als hoch reaktiver Metabolit bereits nachgewiesen worden (Chen *et al.*, 1995; Peterson *et al.*, 2005). Die gleiche metabolische Aktivierung wurde für die zweifach methylierte Version DMF beschrieben (Wang *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu sind noch keine Hinweise für die Hydroxylierung der Methylgruppe zu FFA im Phase I-Metabolismus bekannt. Daher wurde der Fokus auf AcA als primäres Intermediat gelegt.

Die Synthese von AcA erfolgte in dieser Arbeit über zwei Wege, die sich durch ihren Syntheseschritten und Reinheit unterschieden. Der schnellere und leichter zugänglichere Weg war über die Freisetzung von AcA aus der sauren Hydrolyse von 2,5-Dihydro-2,5-dimethoxy-2-methylfuran (DHDMMF). Das Gleichgewicht auf Seiten des Edukts ließ keine Isolierung von AcA zu, jedoch konnte durch Zugabe eines Reaktanten das Gleichgewicht auf Seiten des Produkts verschoben werden. Zur Untersuchung der Reaktivität bei bestimmten pH-Werten sowie der Untersuchung *in vitro*, bedurfte es jedoch AcA als Reinsubstanz. Hierzu wurde AcA durch Oxidation von MF mittels Dimethyldioxiran (DMDO) synthetisiert, was zeitaufwendiger und mit geringerer Ausbeute, jedoch hoher Reinheit verbunden war.

Dies schuf die Grundlage die Reaktivität von AcA und MF gegenüber Aminosäuren und Nucleosiden zu untersuchen. Es wurden zwei N_{α} -acetylierte Aminosäuren gewählt, sodass unter Ausschluss der Aminogruppe in α -Position jeweils eine funktionelle Gruppe primär als potentieller Angriffspunkt vorlag: *N*-Acetyl-L-cystein (AcCys) mit einer Thiolgruppe und N_{α} -Acetyl-L-lysin (AcLys) mit einer zugänglichen Aminogruppe. Als Monomere der DNA wurden die vier Nucleoside dA, dG, dC und dT als Reaktanten eingesetzt. Zu Beginn wurde AcA aus der sauren Hydrolyse von DHDMMF mit den sechs Reaktanten separat umgesetzt und basierend auf den gebildeten Addukten die Synthesen der Referenzsubstanzen etabliert. Mit Ausnahme von dT konnte bei allen Inkubationen eine Adduktbildung beobachtet werden. Die Inkubation von MF mit den Reaktanten zeigte, dass eine solche Reaktion vernachlässigt werden konnte, da sich nur in Spuren Reaktionsprodukte bildeten.

Neben der Synthese von AcA sowie dessen Addukten mit AcLys, AcCys, dA, dG und dC, wurden AcLys-BDA, $^{15}N_5$ -dA-AcA und $^{15}N_5$ -dG-AcA als interne Standards hergestellt. Die Reinheit der Synthesen wurde primär über Messungen der 1H -NMR (engl.: *nuclear magnetic resonance*) bestimmt und zur weiteren Charakterisierung via ^{13}C -NMR-Spektroskopie vermessen. In diesem Kapitel wurden die Multiplizitäten abgekürzt als Singulett (*s*), Dublett (*d*), Triplett (*t*), Quartett (*q*) und Quintett (*p*). Bei Bedarf wurden verschiedene Lösungsmittel zur

Untersuchung der Stabilität genutzt. Zur Aufklärung nicht eindeutiger NMR-Spektren wurden komplexere 2D-NMR-Spektren aufgenommen sowie *high resolution scans* am Massenspektrometer durchgeführt.

Alle Syntheseprodukte wurden via Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS, engl.: *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) charakterisiert. Via *Fullscan* galt es zunächst die molare Masse zu bestätigen und das Chromatogramm kombiniert mit dem zugehörigen Spektrum konnte zur weiteren Beurteilung der Reinheit herangezogen werden. Der Produktionenscan (MS^2) bei zusätzlich unterschiedlichen Fragmentierungsbedingungen diente der Identifizierung bzw. Bestätigung struktureller Merkmale. Er bildete die Grundlage für die Entwicklung sensitiver Quantifizierungsmethoden im *multiple reaction monitoring* (MRM)-Modus. Die Methoden wurden auf die folgenden Versuche (Kap. 4.3–4.4) angepasst. Zur Validierung der Quantifizierungsmethoden wurde stets die Lauf-zu-Lauf- sowie die Tag-zu-Tag-Variabilität der Analyten bestimmt. Mit dem LOD und der Bestimmungsgrenze (LOQ, engl.: *limit of quantification*) wurde über die Peakhöhe die Analytkonzentration mit dem 3-fachen, bzw. 6- oder 10-fachen Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N , engl.: *signal to noise*) angegeben. Während der LOQ meist als kleinste Konzentration der Kalibriergerade eingesetzt wurde, wurde der LOD vorwiegend rechnerisch bestimmt. Methodische Parameter samt deren Validierung werden in Kap. 6.5.2 aufgeführt.

Es folgte eine genauere Charakterisierung der Reaktionen hinsichtlich folgender Fragestellungen: Die metabolische Aktivierung von MF zu AcA in Kap. 4.3 sowie das Screenen und Quantifizieren von AcA-Addukten in mit MF und AcA inkubierten Zellen *in vitro* (Kap. 4.4).

4.2.1 3-Acetylacrolein

AcA wurde synthetisiert und via NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert. Dabei war die Untersuchung der Stabilität und seines Verhaltens in wässrigen Lösungen von Bedeutung für noch folgenden Versuche.

4.2.1.1 Synthese von AcA

Die Synthese von AcA erfolgte über zwei Wege, die sich durch die Anzahl an Syntheseschritten, Ausbeute, Reinheit und daraus resultierenden Verwendungen für verschiedene Untersuchungen unterschieden (siehe Experimentalteil Kap. 6.4.1–6.4.2).

Die **saure Hydrolyse von DHDMMF** zur Herstellung von AcA in Lösung wurde zum einen für Vorversuche der Reaktionsstudie *in chemico*, zum anderen als Vorstufe der Synthese von AcA-Addukten in wägbaren Mengen genutzt. Sie zeichnet sich durch ihre einfache Handhabung und schnelle Durchführbarkeit aus. Der wässrigen DHDMMF-Lösung mit 0,1 % Essigsäure wurde ein Reaktant zugeben, wodurch das Reaktionsgleichgewicht auf Seiten des Produkts verschoben wurde. Als Reaktanten wurden die Aminosäure-Derivate AcLys und AcCys, sowie die Nukleoside dA, dG, dC wie dT einzeln eingesetzt. Die Adduktbildung wurden in

Reaktivitätsstudien mit freiem AcA verifiziert (siehe Kap. 4.2.2.3, 4.2.3.5). Um BDA (in Lösung vorliegend) zu generieren, nutzten Chen *et al.* (1995) die saure Hydrolyse des Dihydro-dimethoxy-Derivats von Furan (2,5-Dihydro-2,5-dimethoxyfuran, DHDMFu). Da das mit DHDMMF im Gleichgewicht stehende AcA nicht isoliert werden konnte, wurde eine zweite Syntheseroute entwickelt.

Die **Oxidation von MF mittels DMDO** bedurfte der vorangestellten Synthese des Oxidationsmittels mit teils hoch reaktivem Zwischenprodukt bei einer geringeren Ausbeute. Allerdings konnte AcA als Reinsubstanz isoliert werden, was die Voraussetzung für nachfolgende Stabilitäts-, Reaktions- und Inkubations-Untersuchungen war. DMDO wurde in der Literatur vermehrt verwendet, um chemisch die enzymatische (CYP-vermittelte) Monooxygenierung einer Substanz im Fremdstoffmetabolismus zu simulieren. So wurde DMDO zur Oxidation von Furan genutzt, um BDA in acetonhaltiger Lösung zu generieren (Peterson *et al.*, 2000; Adger *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1995). Ein entscheidender Vorteil ist zudem, dass DMDO zu Aceton abreagiert, welches einfach entfernt werden konnte. Zu Beginn dieser Arbeit wurde gemäß der Synthesevorschrift nach Ravindranath *et al.* (1984b) MF mit *m*-Chlorperbenzoesäure oxidiert, jedoch konnte keine vollständige Abtrennung der Nebenprodukte erreicht werden. Wenn auch mit abweichendem Oxidationsmittel zeigten bereits sie, dass AcA prinzipiell aus DHDMMF oder direkter Oxidation von MF generiert werden kann. In dieser Arbeit wurde zuerst DMDO nach Adam *et al.* (1991) synthetisiert und direkt zur Oxidation der äquimolaren Menge MF eingesetzt. Aceton wurde destillativ entfernt und das Produkt über Kieselgel aufgereinigt. Im Folgenden wurde das Produkt charakterisiert und auf seine Stabilität und Verhalten in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht. Es wurde eine Reinheit von 91 % in organischem Lösungsmittel bestimmt (via $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, $\text{DMSO-}d_6$, gelagert bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$).

4.2.1.2 Charakterisierung und Stabilität von AcA

Nach der Synthese von AcA wurde zunächst das selektiv gebildete Produkt charakterisiert und die zeit- und temperaturabhängige Umlagerung in organischem Lösungsmittel untersucht. Weiterhin wurde das Verhalten in wässrigem Medium getestet und die (Lager-/) Stabilität beobachtet. Abb. 14 fasst die beobachteten Konformitäten von AcA zusammen, auf die im Folgenden detailliert eingegangen wird.

cis-AcA in organischem Lösungsmittel

Die Oxidation von MF via DMDO führte zur Ringöffnung des Aromaten, mit dem *cis*-Isomer von AcA als selektives Produkt der Synthese. Tab. 10 zeigt die Signale des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz) von *cis*-AcA in deuteriertem Chloroform (CDCl_3), wobei die strukturelle Zuordnung der Signal A–D mit denen in Tab. 10 (*cis*-AcA in $\text{DMSO-}d_6$) übereinstimmte. In beiden, organischen Lösungsmitteln lässt die vicinale Kopplung zwischen H_B und H_C von $^3J_{B,C} = 11,8\text{ Hz}$ auf *cis*-Formation der ungesättigten Verbindung schließen. Deren chemische Verschiebung

lagen zwischen 7,20–6,22 ppm und stellten sich in ihrer Multiplizität als Dublett (H_B), bzw. Dublett-von-Dublett im Falle von H_C dar. Letzteres koppelt mit ${}^3J_{B,C} = 7,1$ Hz (in $CDCl_3$), bzw. 6,9 Hz (in $DMSO-d_6$) mit dem Proton der Aldehydgruppe, dessen Signal bei $\delta = 10,09$ ppm (in $CDCl_3$), bzw. 9,94 ppm (in $DMSO-d_6$) zu sehen war. Der Literaturvergleich des 1H -NMR der AcA-Synthese von Ravindranath *et al.* (1984b) zeigte eine gute Übereinstimmung der Signale und Kopplungskonstanten (Tab. 10), wobei diese *m*-Chlorperbenzoesäure als Oxidationsmittel eingesetzt.

Tab. 10: 1H -NMR-Signale von *cis*-AcA in $CDCl_3$ der eigenen Synthese (400 MHz) verglichen mit Literaturdaten in $CDCl_3$ (Ravindranath *et al.*, 1984b). AcA: 3-Acetylacrolein.

Signal	Protonen	Eigene Synthese			Referenzliteratur		
		δ [ppm]	M	J [Hz]	δ [ppm]	m	J [Hz]
A	1 H	10,09	d	7,1 (${}^3J_{A,C}$)	10,2	d	7
B	1 H	6,94	d	11,8 (${}^3J_{B,C}$)	6,96	d	12
C	1 H	6,78	dd	11,8 (${}^3J_{B,C}$) 7,1 (${}^3J_{A,C}$)	6,15	q	12;7
D	3 H	2,32	s		2,38	s	

Das 1H -NMR von *cis*-AcA in $DMSO-d_6$ (Abb. 9) war vergleichbar.

Das ${}^{13}C$ -NMR-Spektrum (151 MHz, $DMSO$, Abb. 10) bestätigte mit fünf deutlichen Signalen die Bildung von AcA. Dem Signal der stärksten Hochfeldverschiebung von 30,31 ppm wurde das Kohlenstoffatom der Methylgruppe zugeordnet, während die Höchsten bei $\delta = 199,40$ ppm und 193,08 ppm im Bereich für Carbonyleinheiten, hier der Aldehydgruppe, bzw. dem Keton, entsprachen. Die übrigen zwei Signale bei $\delta = 142,51$ ppm sowie 136,53 ppm sind den zwei vinylen Kohlenstoffatomen zuzuweisen.

Wurde das Produkt gleich nach Synthese bei -20 °C gelagert, zeigte sich nach einem Monat keine Abnahme der Signalstärke, bzw. Zunahme der Signalanzahl (von Abbauprodukten). Hieraus wurden Ansätze für Reaktions- und Inkubationsversuche entnommen.

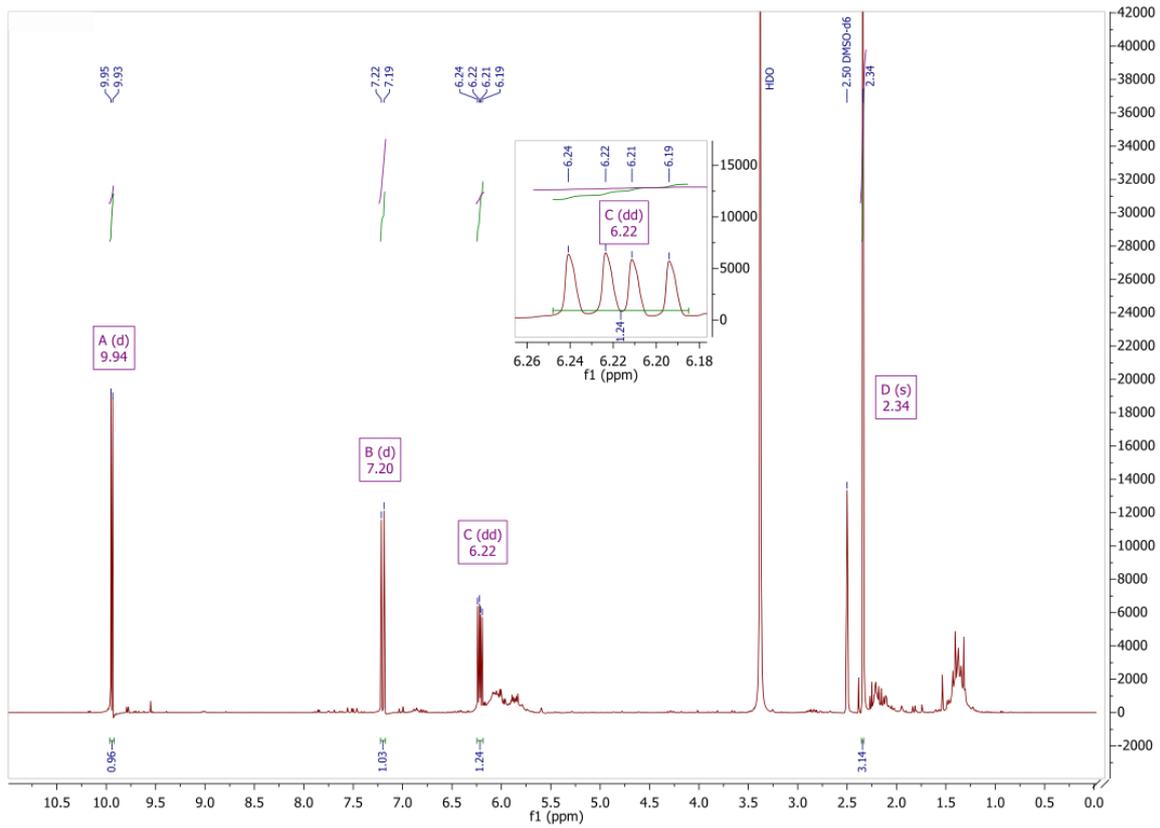


Abb. 9: ¹H-NMR-Spektrum von *cis*-AcA (400 MHz, DMSO-*d*₆). AcA: 3-Acetylacrolein.

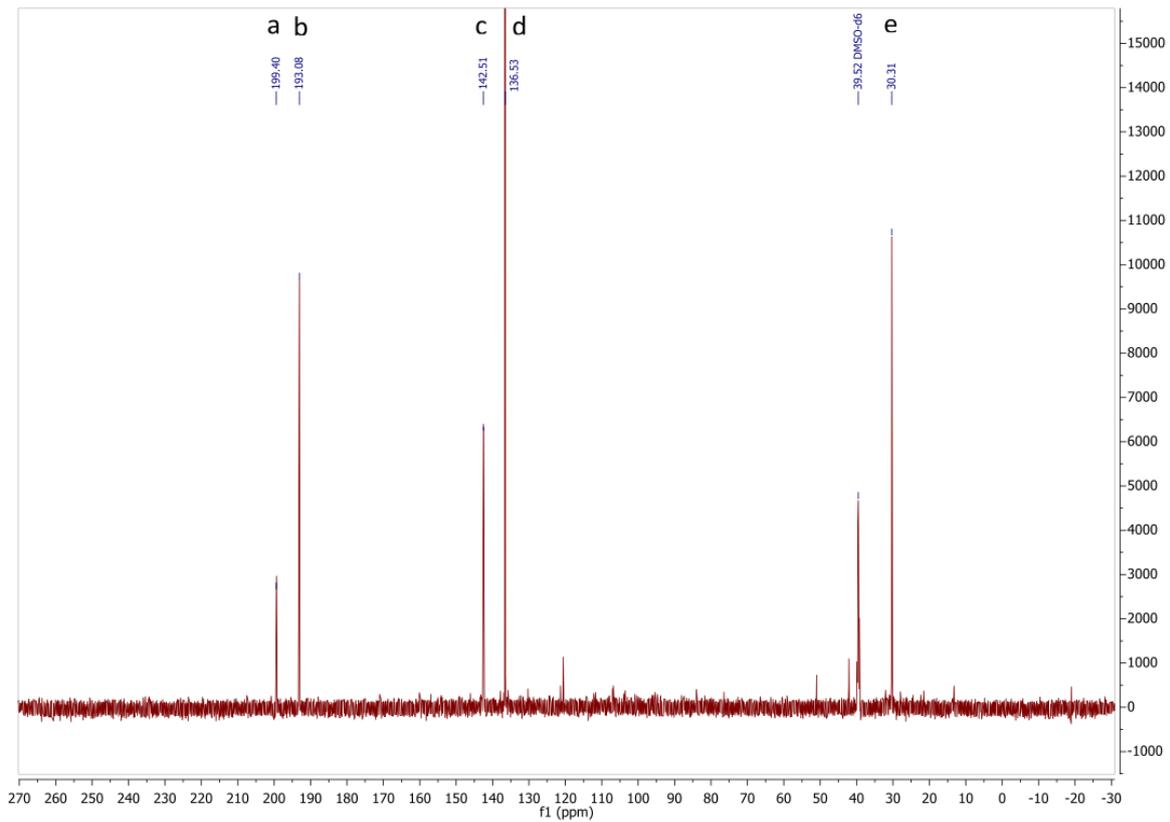


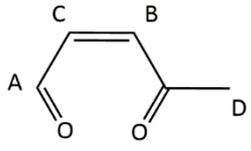
Abb. 10: ¹³C-NMR-Spektrum von *cis*-AcA (151 MHz, DMSO). AcA: 3-Acetylacrolein.

trans-AcA in organischem Lösungsmittel

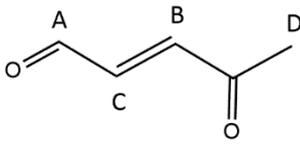
In organischem Lösungsmittel (DMSO- d_6) wurde die zeit- und temperaturabhängige Umlagerung zum *trans*-Isomer (***trans*-AcA**, (*E*)-3,5-Dihydroxypent-4-en-2-on) beobachtet. So wurde bereits nach zwei Tage bei Raumtemperatur eine Mischung aus *cis*- und *trans*-AcA im Verhältnis 0,45:1 mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie (400 MHz, DMSO- d_6) nachgewiesen. Nach fünf Tagen bei Raumtemperatur lag AcA ausschließlich *trans*-konfiguriert vor. Für die Charakterisierung wurde die vicinale Kopplung der Protonen der Doppelbindung mit $^3J_{\text{B,C}} = 16,2$ Hz herangezogen, welche gemeinsam mit den anderen Signalen in Tab. 11 strukturell Abb. 11 zugeordnet wurde. Die fünf Signale im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum ließen sich entsprechend denen von *cis*-AcA einordnen. Das Produkt wies zu Beginn eine Reinheit von 90 % auf. Nach Lagerung von 4,5 Monaten in DMSO- d_6 bei 4 °C betrug diese nur noch 37 % durch Verunreinigungen um Signalbereich von 1,25–2,25 ppm im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum. Dabei wurde die Zunahme des Wasser-Signals (HDO; $\delta = 3,45$ ppm) nicht einberechnet, welches 88 % der summierten Integrale betrug. Nach 11 Monaten war die Reinheit von *trans*-AcA auf 21 % reduziert, ohne Berücksichtigung des Wasser-Signals mit einem Anteil von 83 % am summierten Integralbetrag. Die Zunahme an unspezifischen Signalen im Bereich von 1,25–2,25 ppm kann auf Polymerisation des reaktiven Produkts über die Zeit hinweisen.

Tab. 11: $^1\text{H-NMR}$ -Signale von *cis*-AcA und *trans*-AcA mit deren Konformation abhängig von Zeit und Bedingungen in DMSO- d_6 . Rein: Vorliegen als Reinsubstanz, Mix: Vorliegen als Isomerenmischung. Verhältnisse von Gemischen wurden über Integration der Protonen im $^1\text{H-NMR}$ bestimmt. *) nur direkt nach D_2O -Zugabe messbar ($t = 0$ h); nicht integrierbar durch starke Überlappung mit HDO. AcA: 3-Acetylacrolein.

Signal	<i>cis</i> -AcA				<i>trans</i> -AcA			
	δ [ppm]	f	m	J [Hz]	δ [ppm]	f	m	J [Hz]
A	9,94	1 H	d	6,9 ($^3J_{\text{A,C}}$)	9,78	1 H	dd	7,4 ($^3J_{\text{A,C}}$) 1,1 ($^4J_{\text{A,B}}$)
B	7,20	1 H	d	11,8 ($^3J_{\text{B,C}}$)	7,01	1 H	dd	16,2 ($^3J_{\text{C,B}}$) 1,2 ($^4J_{\text{A,B}}$)
C	6,22	1 H	dd	11,8 ($^3J_{\text{B,C}}$) 6,9 ($^3J_{\text{A,C}}$)	6,78	1 H	ddd	16,2 ($^3J_{\text{C,B}}$) 7,4 ($^3J_{\text{A,C}}$) 1,6
D	2,34	3 H	s		2,38	3 H	s	



Synthese; 1 Monat bei -20 °C



5 d bei 25 °C

Mix: 1 d, 25 °C: *cis*-/*trans*-AcA (0,45:1)

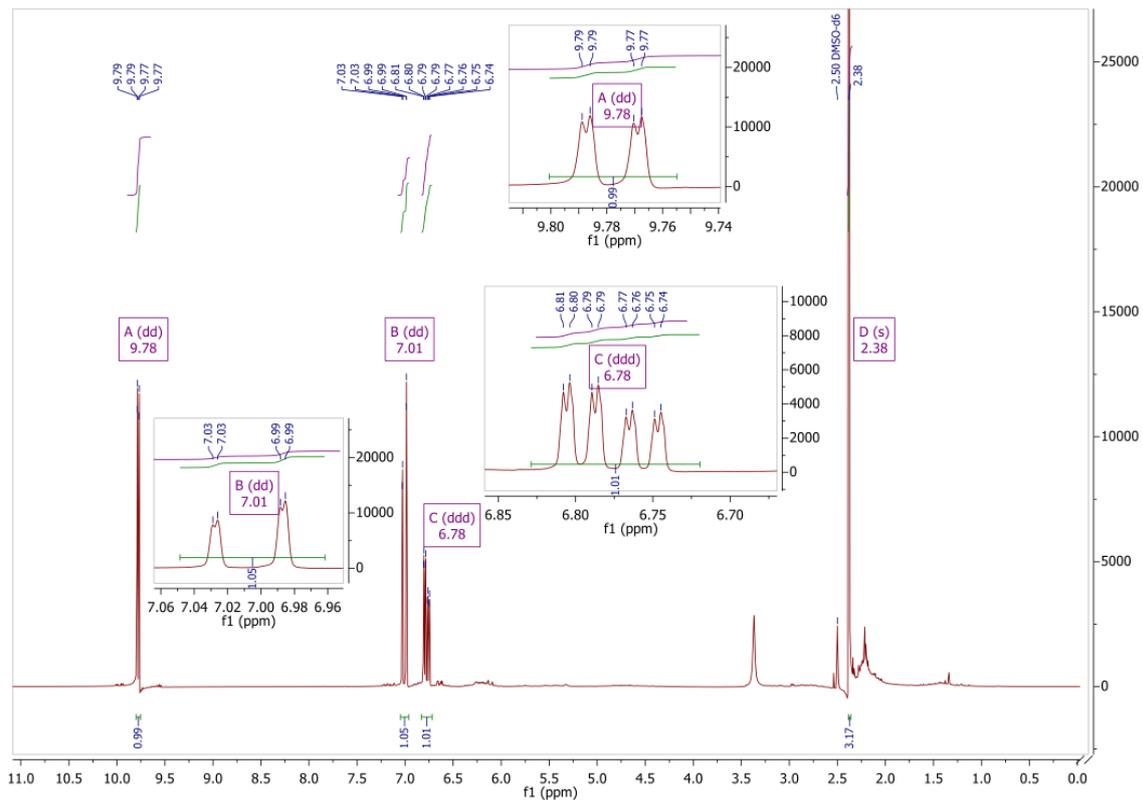


Abb. 11: ^1H -NMR-Spektrum von *trans*-AcA in $\text{DMSO-}d_6$ (400 MHz). AcA: 3-Acetylacrolein.

cis-AcA in wässrigem Milieu

Durch Oxidation von MF mit DMDO lag das entstandene AcA *cis*-konfiguriert vor. Zur Untersuchung der Stabilität von AcA in wässrigem Milieu wurden *cis*- und *trans*-AcA einzeln untersucht.

Wurde ***cis*-AcA in D_2O** gelöst, waren im ^{13}C -NMR-Spektrum unmittelbar 15 Signale sichtbar, was bei einem Grundgerüst mit fünf C-Atomen auf das Vorliegen von drei verschiedenen Verbindungen schließen ließ. Darunter waren drei Signale im Bereich $\delta = 27\text{--}31$ ppm, die als C-Atome von drei Methylgruppen der vermutlich drei verschiedenen Verbindungen gedeutet wurden. Unterdessen waren lediglich zwei Signale bei $\delta = 203$ ppm und 196 ppm tieffeldverschoben. Deren stark entschirmte Kerne konnten Carbonylverbindungen zugeordnet werden und stimmten mit der Aldehyd- und Ketongruppe des ^{13}C -NMR-Spektrums von *cis*-AcA in reinem $\text{DMSO-}d_6$ überein. Sollte sich somit eine der drei Verbindungen als *cis*-AcA (oder *trans*-Isomer) herausstellen, konnte keine der weiteren zwei Verbindungen ein entsprechendes Strukturelement (wie $\text{C}=\text{O}$) enthalten. Dies sollte vor allem bei der Überlegung einer Laktonstrukturelement bedacht werden (Abb. 14). Die übrigen zehn Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum lagen zwischen 144–101 ppm, einem Bereich chemischer Verschiebung charakteristisch für vinyl-, bzw. aromatische C-C-Doppelbindungen oder hochfeldverschobene allylische C-Atome. Über 0–48 h veränderte sich das Spektrum des ^{13}C -NMR nicht erkennbar.

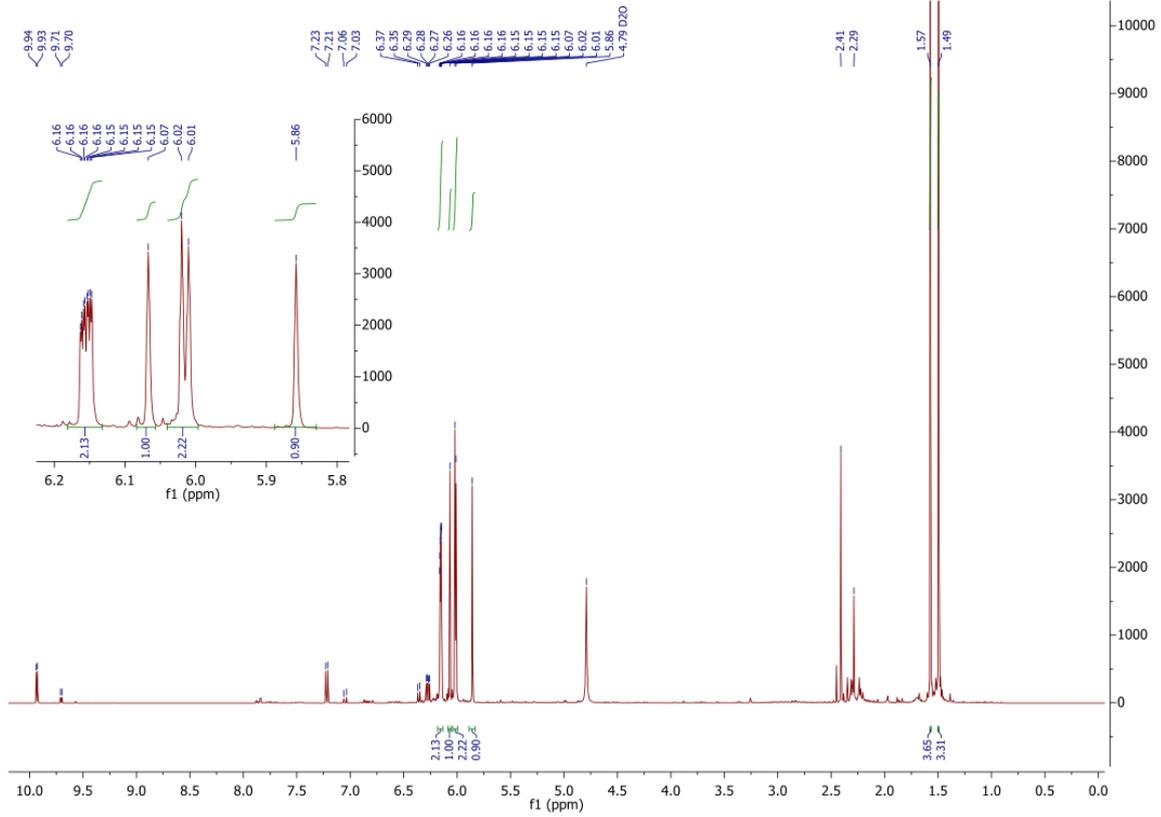


Abb. 12: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz) von *cis*-AcA in D_2O . Die Zuordnung der Signale ist in Tab. 12 gezeigt. AcA: 3-Acetylacrolein.

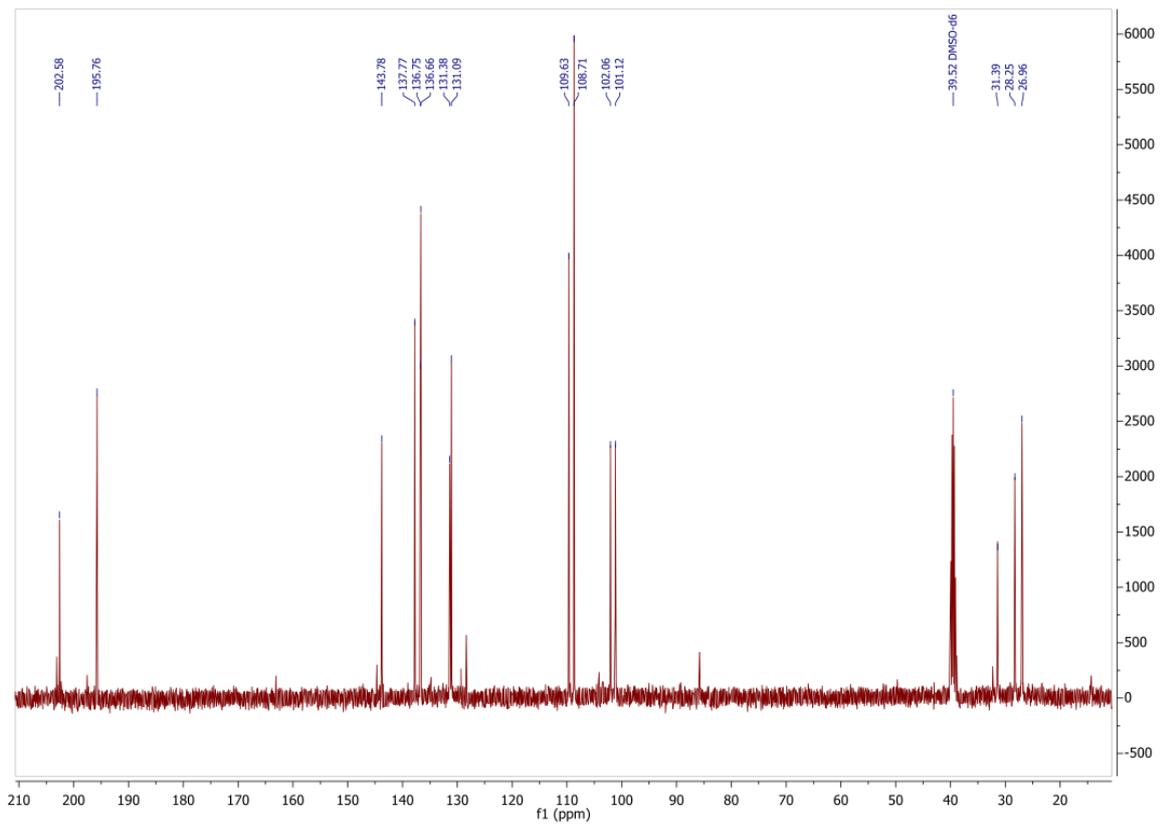


Abb. 13: ^{13}C -NMR-Spektrum (101 MHz) von *cis*-AcA in DMSO nach H_2O -Zugabe. AcA: 3-Acetylacrolein.

Im ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, D_2O , Abb. 12) konnten drei Hauptprodukte im Verhältnis 1:1:0,2 erfasst werden. Weitere Nebenprodukte wurden aufgrund ihrer zu geringen Signalintensität nicht weiter zugeordnet. Die mit $\sim 9\%$ am geringsten vorkommende Hauptverbindung wurde als *cis*-AcA identifiziert, basierend auf der klaren Übereinstimmung des Spektrums in reinem $\text{DMSO}-d_6$. Dies wurde durch das ^{13}C -NMR-Spektrum (Abb. 13) bestätigt. Bei den übrigen Signalen im ^{13}C -NMR-Spektrum war auffallend, dass sie streng gepaarte als stets zwei nah beieinanderliegende Signale auftraten (∞), was auf zwei sehr ähnliche Verbindungen hindeutete (^{13}C NMR; 101 MHz; DMSO ; δ [ppm]: 202.58, 195.76, 143.78, 137.77, 136.75 ∞ 136.66, 131.38 ∞ 131.09, 109.63 ∞ 108.71, 102.06 ∞ 101.12, 31.39, 28.25 ∞ 26.96; Abb. 12).

Im ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 12) konnte den im gleichen Verhältnis, am häufigsten vorkommenden Hauptprodukten je eine isoliert vorliegende Methylgruppe zugeordnet werden. Die je drei äquivalenten Protonen traten als Singulett bei $\delta = 1,57$ ppm und $1,49$ ppm, bzw. die C-Atome bei $28,25$ ppm sowie $26,99$ ppm auf. Das Vorkommen der restlichen acht vinylischen, bzw. allylischen C-Atome im ^{13}C -NMR-Spektrum wurde bestätigt durch vier Signale mit integralem Verhältnis von sechs vinylischen, bzw. allylischen Protonen. Zwei Protonen spalteten sich bei $\delta = 6,16$ ppm als Dreifach-Dublett auf und weitere zwei Protonen als Dublett bei $\delta = 6,01$ ppm. Zudem wurden zwei Protonen als je ein Singulett bei $\delta = 6,07$ ppm sowie $5,86$ ppm detektiert. Basierend auf den Untersuchungen von Tee und Swedlund (1983) und Chen *et al.*, (1997) zur Stabilität von *cis*-BDA in wässrigen Lösungen wurden hier die Signale den *cis*- und *trans*-Isomeren des hydratisierten, zyklisierten AcA zugeschrieben. Tab. 12 zeigt, wie die einprotonigen Singuletts bei $6,07$ ppm und $5,86$ ppm als Methin-Proton (H_B ; H_D) je eines Diastereomers zugeordnet werden konnten. Das Dreifach-Dublett ($\delta_A = 6,16$ ppm) und Dublett ($\delta_C = 6,01$) mit je zwei Protonen wurde den vinylen Protonen der beiden Isomere zugeschrieben (Tab. 12).

In der Literatur wurde ein Verhältnis des *cis*-/*trans*-BDA-Hydrats von 1:1, bzw. 2:1 beschrieben (Tee und Swedlund, 1983; Chen *et al.*, 1997). Während sie die Methin-Protonen des *cis*-Isomers ebenfalls als scharfe Singuletts ($\delta = 5,86$; $5,90$ ppm) beschrieben, schilderten sie die vinylen Protonen als breites, nicht aufgespaltenes Signal ($\delta = 6,20$ – $6,14$ ppm) (Chen *et al.*, 1997; Tee und Swedlund, 1983). Der Unterschied zu den hier aufgespaltenen Signale der vinylen Struktur kann messtechnische Gründe (wie die genutzte Frequenz) darstellen.

Tab. 12: $^1\text{H-NMR}$ -Signale von *cis*-AcA und *cis*-AcA-OH₂ und deren verhältnismäßiges Vorliegen in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Mix: Vorliegen als Diastereomere. Verhältnisse von Diastereomergemisch wurden über Integration der Protonen im $^1\text{H-NMR}$ bestimmt. AcA: 3-Acetylacrolein.

Signal	<i>cis</i> -AcA-OH ₂ 600 MHz, D ₂ O				<i>cis</i> -AcA 400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆			
	δ [ppm]	\int	<i>m</i>	<i>J</i> [Hz]	δ [ppm]	\int	<i>m</i>	<i>J</i> [Hz]
A	6,16	2 H	ddd	5,8 2,8 1,2	9,94	1 H	d	6,9 ($^3J_{A,C}$)
B	6,07	1 H	s		7,20	1 H	d	11,8 ($^3J_{B,C}$)
C	6,01	2 H	d	5,8	6,22	1 H	dd	11,8 ($^3J_{B,C}$) 6,9 ($^3J_{A,C}$)
D	5,86	1 H	s		2,34	3 H	s	
E	1,57	3 H	s					
F	1,49	3 H	s					

- I -

- II -

Mix: *cis*-AcA:*cis*-AcA_I-OH₂:*cis*-AcA_{II}-OH₂ (0,2:1:1)

Tab. 12 gibt eine Übersicht der beschriebenen Verbindungen mit strukturell zugeordneten $^1\text{H-NMR}$ -Signalen. Dabei wurde die unterschiedliche Konfiguration des Methin-Protons zur Methylgruppe (bzw. die Stellung der zwei Hydroxylgruppe zueinander) als Isomer I und II bezeichnet. Der Mechanismus der Hydratisierung und Zyklisierung von *cis*-AcA in Wasser zu *cis*-AcA_I-OH₂ und *cis*-AcA_{II}-OH₂ ist in Abb. 14 postuliert. Er wurde ergänzt durch die theoretisch erneute Dehydratisierung zum α - und γ -Angelika-Lakton sowie dessen Enol-Form. Diese können möglicherweise Nebenprodukte darstellen.

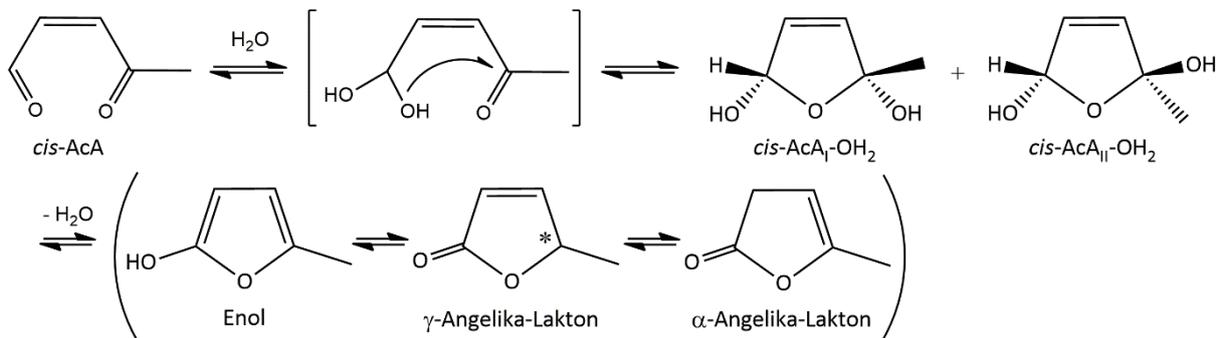


Abb. 14: Postulierter Mechanismus der Hydratisierung von *cis*-AcA in Wasser zu *cis*-AcA-OH₂. Während die Isomere von *cis*-AcA-OH₂ NMR-spektrometrisch nachgewiesen wurden, stellt die anschließende Dehydratation einen theoretischen Bildungsweg von Nebenprodukten dar. AcA: 3-Acetylacrolein.

Die erneute Vermessung von *cis*-AcA in D₂O nach 12 h und 24 h zeigte praktisch keine Abweichung zur ersten Messung direkt nach dem Lösen von AcA.

Wurde D₂O (25 V-%) zu *cis*-AcA in DMSO-*d*₆ zugegeben, lagen *cis*-AcA, *cis*-AcA_I-OH₂ und *cis*-AcA_{II}-OH₂ im Verhältnis 0,4:1:1 vor. Auch hier wurde die Bildung von Nebenprodukten beobachtet. Nach 24 h und 48 h nahm die Anzahl an Signalen über den Bereich der chemischen Verschiebung $\delta = 1\text{--}10$ ppm zu. Die weitere Reaktion der Hauptverbindungen wurde nicht weiter verfolgt.

trans-AcA in wässrigem Milieu

Wurde ***trans*-AcA in D₂O** gelöst, verdoppelte sich die Anzahl an Signalen im ¹³C-NMR-Spektrum auf 10 (siehe Kap. 6.4.2), was auf zwei C5-Verbindungen hindeutete. Zwei Signale im Hochfeld bei $\delta = 28$ und 26 ppm wurden zwei Methylgruppen zugeordnet und drei Signale im Tieffeld bei $\delta = 204$, 203 und 197 ppm drei Carbonyleinheiten. Des Weiteren wurde ein allylisches C-Atom bei $\delta = 90$ ppm und vier vinyllische im Bereich chemischer Verschiebung von 130–146 ppm gemessen. Das ¹H-NMR-Spektrum (Abb. 15) zeigte *trans*-AcA und seine hydratisierte Form (*trans*-AcA-OH₂) im Verhältnis 1:0,64. Zum einen konnte *trans*-AcA den bereits bekannten Signalen in organischen Lösungsmittel (Tab. 11: „*trans*-AcA“) wie in Tab. 13 zugeordnet werden: Das aldehydische Proton bei $\delta_A = 9,63$ ppm koppelte als Dublett mit dem ersten vinyllischen H_C ($\delta_C = 6,76$ ppm, $^3J_{AC} = 7,5$ Hz). Dieses zeigte sich als Dublett-vom-Dublett zusätzlich vicinalen koppelnd mit $^3J_{CB} = 16,2$ Hz als *trans*-konfiguriert an H_B (d, $\delta = 6,97$ ppm). Das Signal der drei äquivalenten Protonen der isolierten Methylgruppe von *trans*-AcA lag bei $\delta = 2,38$ ppm. Zum anderen unterschied sich *trans*-AcA-OH₂ jedoch deutlich von *cis*-AcA-OH₂. Es wurden drei weitere Signale jeweils Dublett-von-Dubletts bei $\delta = 6,72$, 6,22 und 5,51 ppm sowie ein Singulett bei $\delta = 2,27$ ppm mit dreifachem Integralwert gemessen. Die vicinale Kopplungskonstanten von $J = 16,2$ Hz und 7,5 Hz wiesen darauf hin, dass eine der Bindungen *trans*-konfiguriert vorlag. Während das Singulett drei methylenischen Protonen zugeordnet wurde (Signal D), sprach die Hochfeldverschiebung des Dublett-von-Dubletts im ¹H-NMR-Spektrum sowie die übrigen Signale im ¹³C-NMR-Spektrum für nur eine Ketogruppe, welche das Singulett isolierte. Die übrigen NMR-Signale von *trans*-AcA-OH₂ sind gemäß Tab. 13 eingeordnet. Im Falle der Hydroxylprotonen (Signal E/E') wurde von einem Austausch mit Deuterium ausgegangen. Somit wurde für *trans*-AcA in wässrigem Milieu die Hydratisierung der Aldehydgruppe zu *trans*-5,5-Dihydroxypent-3-en-2-on, hier *trans*-AcA-OH₂ genannt, bestimmt (Abb. 16).

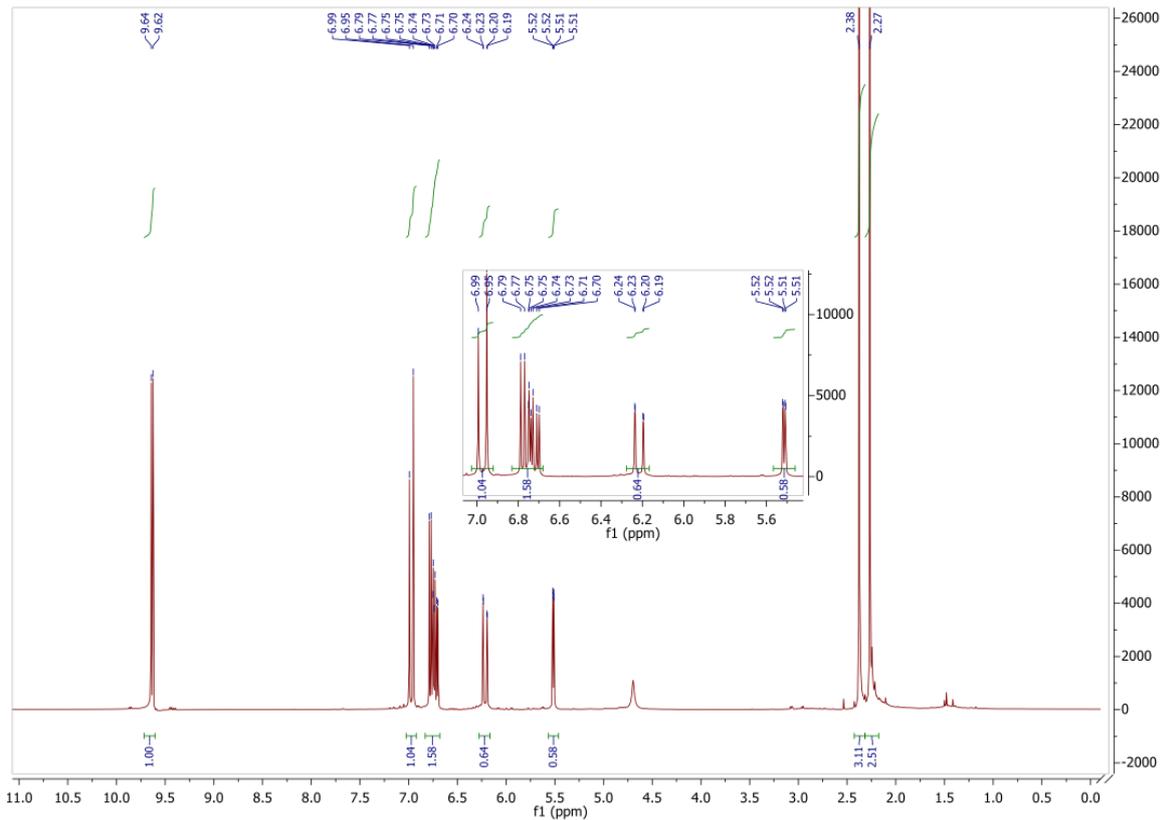


Abb. 15: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von *trans*-AcA in D_2O . Die Zuordnung der Signale ist in Tab. 13 gezeigt. AcA: 3-Acetylacrolein.

Tab. 13: ^1H -NMR-Signale von *trans*-AcA und *trans*-AcA- OH_2 und deren verhältnismäßiges Vorliegen. Mix: Vorliegen als Gemisch. Verhältnisse von Gemischen wurden über Integration der Protonen im ^1H -NMR bestimmt. *) nur direkt nach D_2O -Zugabe messbar ($t = 0$ h); nicht integrierbar durch starke Überlappung mit HDO. AcA: 3-Acetylacrolein.

Signal	<i>trans</i> -AcA- OH_2 400 MHz, D_2O				<i>trans</i> -AcA 400 MHz, D_2O			
	δ [ppm]	J	m	J [Hz]	δ [ppm]	J	m	J [Hz]
A	6,62	1 H	dd	16,1 ($^3J_{A,B}$) 4,7 ($^3J_{A,C}$)	9,63	1 H	d	7,5 ($^3J_{A,C}$) 1,1 ($^4J_{A,B}$)
B	6,10	1 H	d	16,1 ($^3J_{A,B}$)	6,97	1 H	d	16,2 ($^3J_{C,B}$) 1,2 ($^4J_{A,B}$)
C	5,31	1 H	dd	4,7 ($^3J_{A,C}$) 1,0	6,76	1 H	dd	16,2 ($^3J_{C,B}$) 7,5 ($^3J_{A,C}$) 1,6
D	2,19	3 H	s		2,38	3 H	s	
E/E'	4,09	H*	s					

OH_{E'}
H_EO
C
A
B
D
O

A
B
C
D
O

Mix: *trans*-AcA- OH_2 :*trans*-AcA (0,65:1)

Im Folgenden sollte der Verlauf der Hydratisierung und das Verhalten von *trans*-AcA in organischem Lösungsmittel mit terminierter Wasserzugabe getestet werden. In DMSO-*d*₆ gelöstem *trans*-AcA wurde D₂O (25 %, V/V_Z) zugeben und nach 0–48 h bei Raumtemperatur (0, 0,5, 2,5, 8,5, 24, 48 h) ¹H-NMR-spektroskopisch (400 MHz) vermessen. *Trans*-AcA und *trans*-AcA-OH₂ lagen über den kompletten Zeitraum in einem stabilen Verhältnis von 1:0,45 (Range 0,43–0,47) ohne erkenntliche Zunahme an Signalen vor. Lediglich bei t = 0 h wurde ein zusätzliches Signal bei δ = 4,09 ppm detektiert, was auf einen H/D-Austausch an der Hydroxylgruppen hindeutet. Jedoch überlappte es stark mit dem Signal von Wasser bei δ = 4,15 ppm und war ab t = 0,5 h nicht mehr messbar. An dieser Stelle sei angemerkt, dass auch bei t = 0 h messtechnisch bedingt Zeit zwischen D₂O-Zugabe und Abschluss der Messung verging. Diese reichte bereits aus, um ein Gleichgewicht zwischen den zwei *trans*-Formen ausbilden. Während der Lagerung von *trans*-AcA in reinem DMSO-*d*₆ wurde nicht die hydratisierte Form gebildet, obwohl die Intensität des Wassersignals merklich anstieg (auf 88 % der Summe der Integrale). Das spricht für die Notwendigkeit eines deutlichen Wasserüberschusses (wie 25 V-%) zur Ausbildung von *trans*-AcA-OH₂ aus *trans*-AcA.

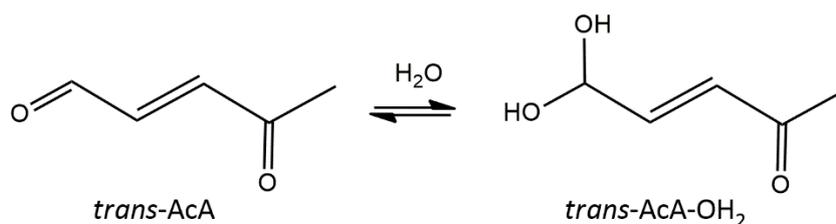


Abb. 16: Hydratisierung von *trans*-AcA in Wasser zu *trans*-AcA-OH₂. AcA: 3-Acetylacrolein.

Zur weiteren Charakterisierung wurde *trans*-AcA (1 μM und 5 μM AcA, Stammlösung gelagert in DMSO) via **ESI⁺-MS²** mit 0,5%iger Ameisensäure in Wasser als Fließmittel untersucht (Methode siehe Kap. 6.5.2.1). Das konzentrationsabhängig auftretende Prekursorion [M+H]⁺ mit dem *m/z* 117 wurde im Produktionenscan (MS²) in die in Abb. 17 zugeordnete Fragmente aufgespalten. Dabei lässt sich *trans*-AcA-OH₂ mit einer berechneten Masse von 116,02 Da dem Prekursorion [M+H]⁺ zuweisen und untermauert die via NMR-Spektroskopie beobachtete Hydratisierung von *trans*-AcA im wässrigen Milieu. Da für die massenspektrometrische Messung *trans*-AcA in saure, wässrige Lösung gebracht wurde, ist das Vorliegen der hydratisierten Form schlüssig. Neben der Bildung von *trans*-AcA-OH₂ kann jedoch auch die zur Detektion notwendige, unterschiedliche Ionisierbarkeit der Substanzen eine entscheidende Rolle spielen.

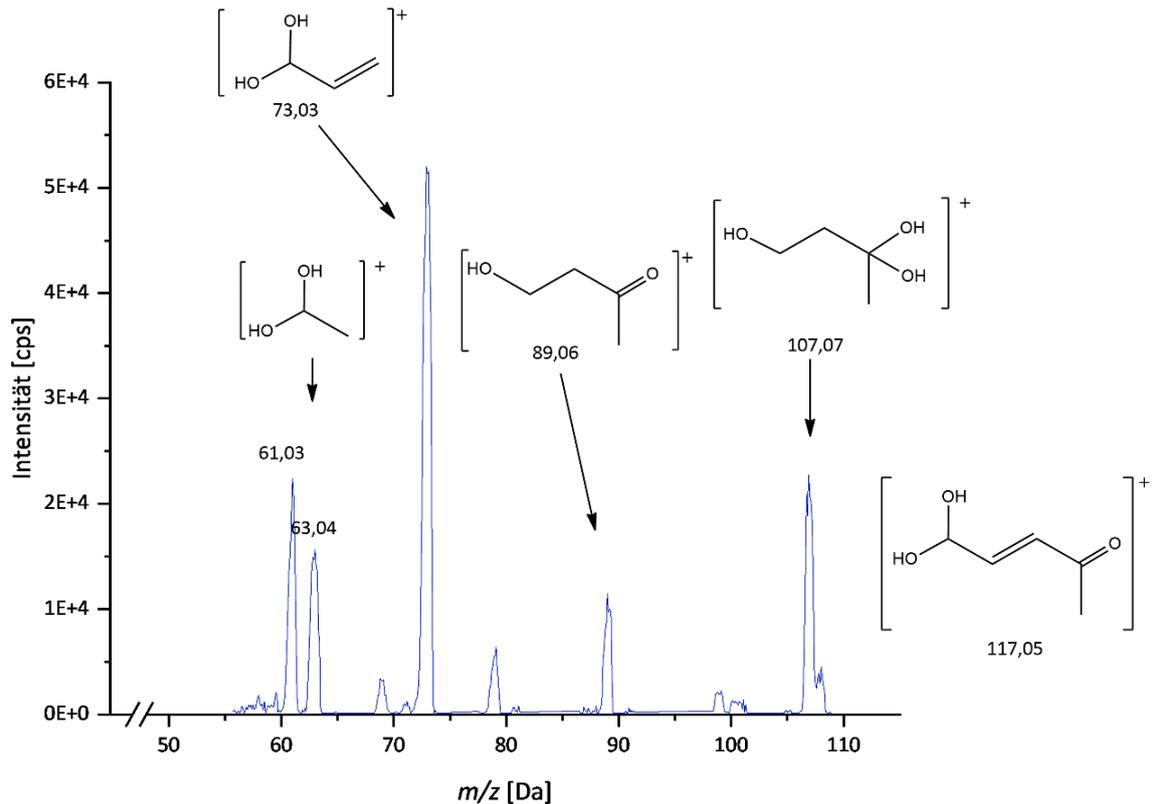


Abb. 17: ESI⁺-MS²-Scan von AcA (5 µM) mit zugeordneten Strukturfragmenten (in wässriger 0,5%iger Ameisensäure). Ausgehend vom Prekursorion mit dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis m/z 117 wurde im Bereich von m/z 55–110 gescannt nach Methode in Kap. 6.5.2.1. AcA: 3-Acetylacrolein, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

In der Literatur wurde für Acrolein in wässriger, alkoholischer Lösung die Hydratisierung zu 3-Hydroxypropionaldehyd und weiter 1,3,3-Propantriol beschrieben. Über die Zeit konnte mit Abnahme des Acrolein-Gehalts die Zunahme der beiden hydratisierten Produkte beobachtet werden (Kächele *et al.*, 2014).

Zusammenfassung zur Stabilität von AcA

AcA liegt je nach Lösungsmittel, aber auch Lagerbedingungen unterschiedlich *cis-/trans*-konfiguriert und hydratisiert vor (basierend auf NMR- und MS-Untersuchungen). Dieses Umlagerung ist in Abb. 18 veranschaulicht und zu beachten, wenn im Folgenden zur Simplifizierung von AcA gesprochen wird. Für Studien wurde stets *cis*-AcA als Stammlösung in DMSO, bei –20 °C gelagert eingesetzt. Da in allen Versuchen in wässrigen Medien gearbeitet wurde, ist jedoch von einer entsprechenden Umlagerung und Hydratisierung auszugehen.

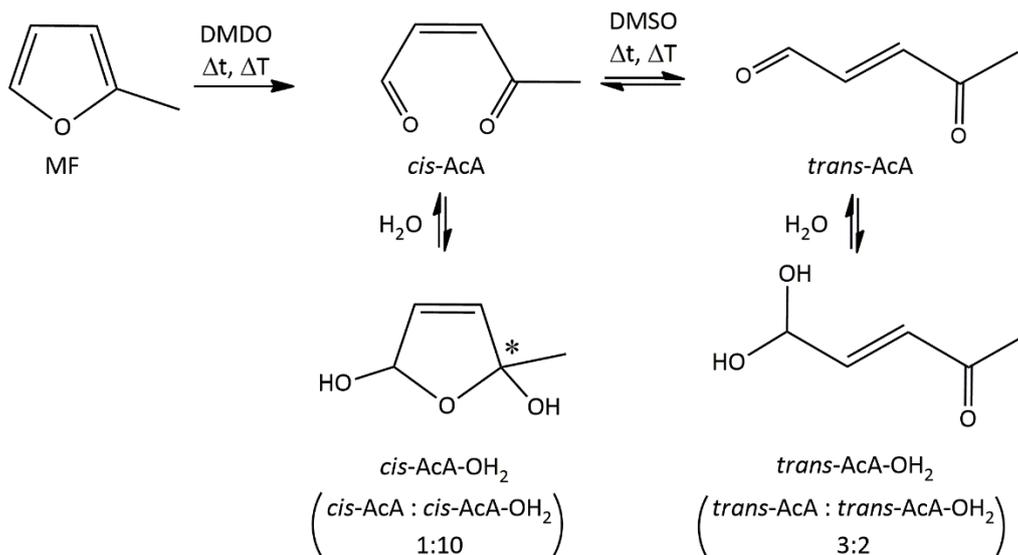


Abb. 18: Umlagerung von AcA in unterschiedlichen Lösungsmitteln und Bedingungen. Ausgehend von der Synthese aus MF mit DMDO. AcA: 3-Acetylacrolein, DMDO: Dimethyldioxiran, MF: 2-Methylfuran.

In der **Literatur** ist für die Oxidationsprodukte von Furan ein ähnliches Verhalten beschrieben worden:

So wurde *cis*-BDA von Chen *et al.* (1995) ebenfalls selektiv über die Oxidation von Furan mit DMDO oder saurer Hydrolyse von 2,5-Dimethoxy-2,5-dihydrofuran (DHDMFu) synthetisiert. Das *trans*-Isomer von BDA gewannen sie hingegen aus der sauren Hydrolyse von 1,1,4,4-Tetramethoxy-*trans*-2-buten. Ausgehend von der Synthese mit DHDMFu wurde die Stabilität von *cis*-BDA in wässriger Lösung über 0–24 h untersucht. Dabei wurde die Bildung von zyklischem *cis*-BDA-hydrat in *cis*- und *trans*-isomerer Form (der Methin-Protonen zueinander) im Verhältnis 1:1 erhalten. Ebenso wurde im organischen Lösungsmittel bei Raumtemperatur in geringerem Umfang die Isomerisierung zu *trans*-BDA beobachtet (Chen *et al.*, 1995). Die Hydratisierung von *cis*-BDA zu zyklischem *cis*- und *trans*-BDA-OH₂ wurde an anderer Stelle im Verhältnis 2:1, jedoch mit vergleichbaren NMR-Signalen wie oben, diskutiert. Des Weiteren wurde der Mechanismus als reversible Hydratation des Aldehyds in zwei Schritten beschrieben. Zuerst wurde Wasser säure- oder basekatalysiert an einen aldehydischen Kohlenstoff addiert, was zur Bildung zweier geminaler Hydroxygruppen (im Falle der Base eine deprotoniert) führte. Diesem langsamen Schritt, folgte eine schnell ablaufende Zyklisierung zu 2,5-Dihydrofuran-2,5-diol mit isomeren Methin-Protonen (Abb. 19, A). Durch (vermutlich) den induktiven Effekt der drei Sauerstoffatome (auf der Zwischenstufe) wurde die Reaktivität der Doppelbindung herabgesetzt. Die Auswirkung einer Substitution an der Doppelbindung auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydratisierung wurde im Vergleich von BDA zu *o*-Benzoldicarbaldehyd (Phthalaldehyd) deutlich (Abb. 19, B). Im Fall von BDA findet die Transmission des konjugativen Effekts von einer Formylgruppe zur anderen nur über eine Doppelbindung statt. Im Gegensatz dazu reagiert *o*-Benzoldicarbaldehyd in Wasser zum zyklischen Hydrat langsamer, da die Transmission über den Benzolring aromatisch stabilisiert ist (Tee und Swedlund, 1983).

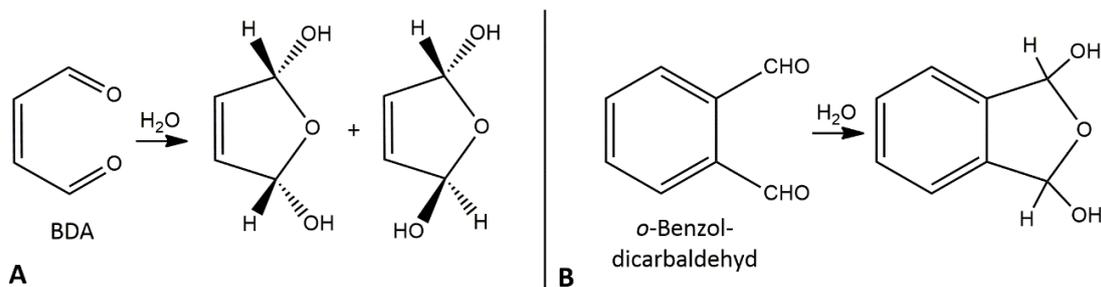


Abb. 19: Hydratisierung von BDA (A) und *o*-Benzoldicarbaldehyd (B) in Wasser nach Tee und Swedlund (1983). BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial.

Im Vergleich zu BDA ist bei AcA eine Aldehydgruppe durch eine Acetylgruppe substituiert. In den folgenden Unterkapiteln wurde die Reaktivität von AcA gegenüber Thiol- und Aminogruppen untersucht und der Reaktivität von BDA gegenübergestellt.

Fazit zur Synthese, Charakterisierung und Stabilität von AcA

Die Herstellung von AcA erfolgte über zwei unterschiedliche Syntheserouten. Während die Freisetzung von AcA über die saure Hydrolyse von DHDMMF für Vorversuche und zur Synthese von Standards genutzt wurde, gelang auch die aufwendigere Synthese von AcA über die Oxidation von MF mittels DMDO. Bei letzteren Synthese konnte AcA isoliert werden, sodass eine strukturelle Charakterisierung und Stabilitätsuntersuchung möglich war. Hier zeigte sich in organischem Lösungsmittel die Entstehung von *cis*-AcA (nach MF-Oxidation mittels DMDO). Bei Raumtemperatur erfolgte in organischem Lösungsmittel eine Umlagerung zu *trans*-AcA. In wässrigem Milieu wurde für beide Isomere die Ausbildung hydratisierter Formen beobachtet. In weiterführenden Versuchen wurde *cis*-AcA für Inkubationen *in chemico* und *in vitro* genutzt.

4.2.2 Aminosäure-Addukte von AcA *in chemico*

In Hinblick auf die Rolle von AcA als Metabolit von MF war die Untersuchung des Verhaltens von AcA in wässriger Lösung ein entscheidender Schritt. Allerdings gestaltete sich die Extraktion von AcA aus wässrigen Medien mit proteineren Bestandteilen, wie im Falle von Mikrosomeninkubationen oder Zellüberständen, als nicht zielführend. Aufgrund der hohen Reaktivität gegenüber mikrosomalem Protein war AcA nicht direkt detektierbar, sodass auf Abfangreagenzien zurückgegriffen wurde. So gingen bereits Ravindranath und Boyd (1985) vor, die AcA als Suizidsubstrat für mikrosomales Protein bezeichneten.

In diesem Kapitel wurde die Reaktivität von AcA gegenüber Thiol- und Aminogruppen in Protein über die Reaktion mit *N*_α-acetyliertem Cystein (AcCys) und Lysin (AcLys) untersucht. Die Addukte sind im Folgenden charakterisiert und in die Methodik zur analytischen Quantifizierung implementiert, um so die Reaktivität für weitere Versuche zu bestimmen.

Die Addukte wurden zunächst mit AcA aus der sauren Hydrolyse von DHDMMF (Kap. 6.4.2) synthetisiert. Ihre ermittelte Struktur wurde mit den entsprechenden Reaktionsprodukten von isoliertem AcA aus der Oxidation von MF durch DMDO verifiziert.

4.2.2.1 Das Addukt AcCys-AcA

4.2.2.1.1 Synthese und Charakterisierung von AcCys-AcA

Für die **Synthese** von AcCys-AcA wurde AcA aus der sauren Hydrolyse von DHDMMF hergestellt und mit AcCys bei Raumtemperatur für 24 h versetzt (siehe Experimenterteil Kap. 6.4.3). Da nur ein Produkt gebildet wurde, konnte das Synthesegemisch semipräparative leicht aufgereinigt werden. Das lyophilisierte Produkt lag mit einer Reinheit von 97 % vor.

UV/Vis-spektroskopisch wurden für AcCys-AcA (1 mM) in Wasser zwei Absorptionsmaxima bei $\lambda_{\max} = 250 \text{ nm}$ und 223 nm ermittelt (NanoDrop™), wobei letzteres von geringerer Intensität war.

Bei der **massenspektrometrischen** Identifizierung wurde das singular auftretende Molekülion im positiven Modus mit $m/z = 244,2 \text{ Da}$ $[M+H]^+$ und im negativen Modus bei $m/z = 241,8 \text{ Da}$ $[M-H]^-$ detektiert. Die berechnete, ungeladene Masse von $243,06 \text{ Da}$ ($M = 243,28 \text{ g/mol}$) entspricht der addierten, atomaren Massen von AcCys und AcA unter Verlust der atomaren Masse von Wasser. Es wurde im negativen Modus deutlich sensitiver detektiert. Dem Produktionscan (MS^2) im ESI- MS^2 -Spektrum wurden Fragmentstrukturen wie in Abb. 20 zugeordnet. Das aufgereinigte Syntheseprodukt sowie Reaktionsprodukte, die via etablierter LC-ESI-MS/MS-Methode (Kap. 6.5.2.2) vermessen wurden, zeigten ein Peak mit dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von m/z 242.

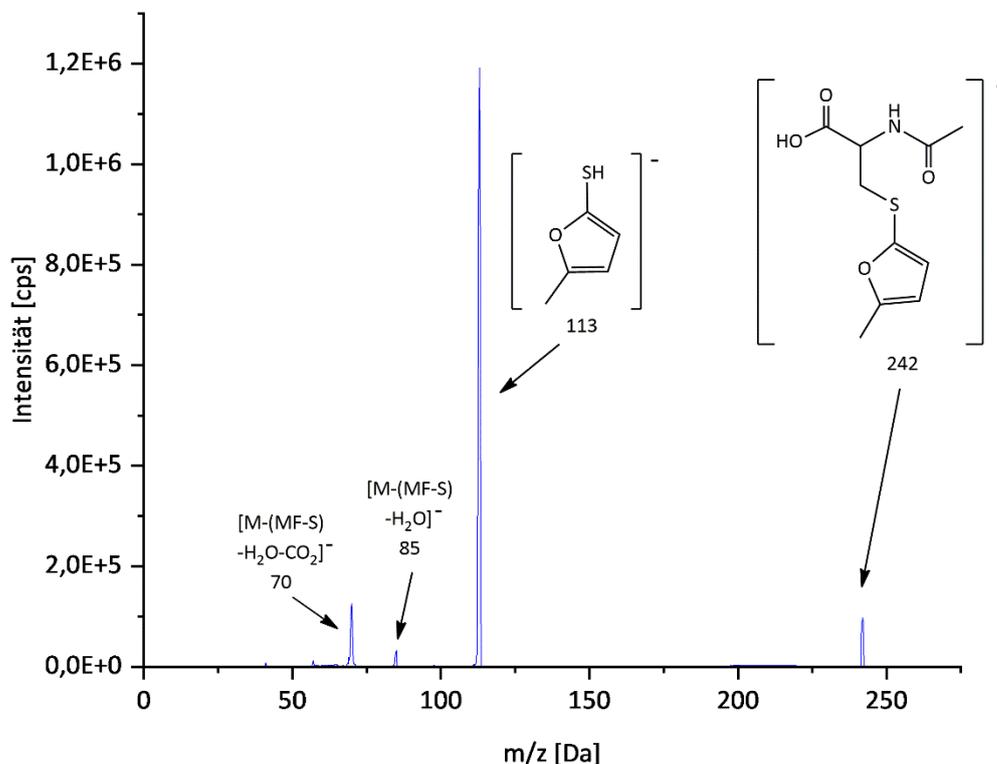


Abb. 20: HPLC-ESI⁺-MS²-Spektrum von AcCys-AcA mit postulierten Fragmentstrukturen. Dargestellt ist (5-methylfuran-2-yl)thio-AcCys, basierend auf den MS²-Messungen ist (5-Methylfuran-3-yl)thio-AcCys als Produkt nicht auszuschließen. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: *N*-Acetyl-L-Cystein, M: Prekursorion, MF: 2-Methylfuran, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Im ^1H - und ^{13}C -NMR (Abb. 21, Kap. 6.4.4) wurde AcCys-AcA als thiol-gebundenes, rezykliertes Addukt von AcA identifiziert, dessen Signale in Tab. 14 zusammenfasst und in Abb. 22 zugeordnet sind. Im ^1H -NMR-Spektrum ist das Grundgerüst von AcCys in den Signalen A, D, E, F und H zugeordnet (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): Das Proton des tertiären Kohlenstoffs, nächstgelegen zu Signal A, wurde mit einer chemischen Verschiebung von $\delta_D = 6,53$ ppm als Dublett-von-Triplett erfasst. Währenddessen wurden die zwei Protonen der CH_2 -Gruppe aufgespalten in Signal E und F bei $\delta = 3,08$ ppm und $2,89$ ppm als jeweils Dublett-von-Dublett bestimmt. Die stärkste Hochfeldverschiebung erfuhren die je drei äquivalenten Protonen der Methylgruppen, welche isoliert als Singulets bei $\delta_H = 1,85$ ppm sowie $\delta_G = 2,27$ ppm lagen. Letzteres wurde der CH_3 -Gruppe des rezyklierten AcA am so entstandenen Thioether zugeordnet. In $\text{DMSO-}d_6$ zeigte die höchste chemische Verschiebung bei $\delta_A = 8,26$ ppm das Proton des sekundären Amins (A). Als austauschbares Proton war es in D_2O nicht mehr zu messen. Die übrigen Signale B und C lagen mit $\delta = 6,53$ ppm (in $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 6,54$ ppm in D_2O) sowie $6,13$ ppm (in $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 6,09$ ppm in D_2O) im Bereich vinylicher Protonen.

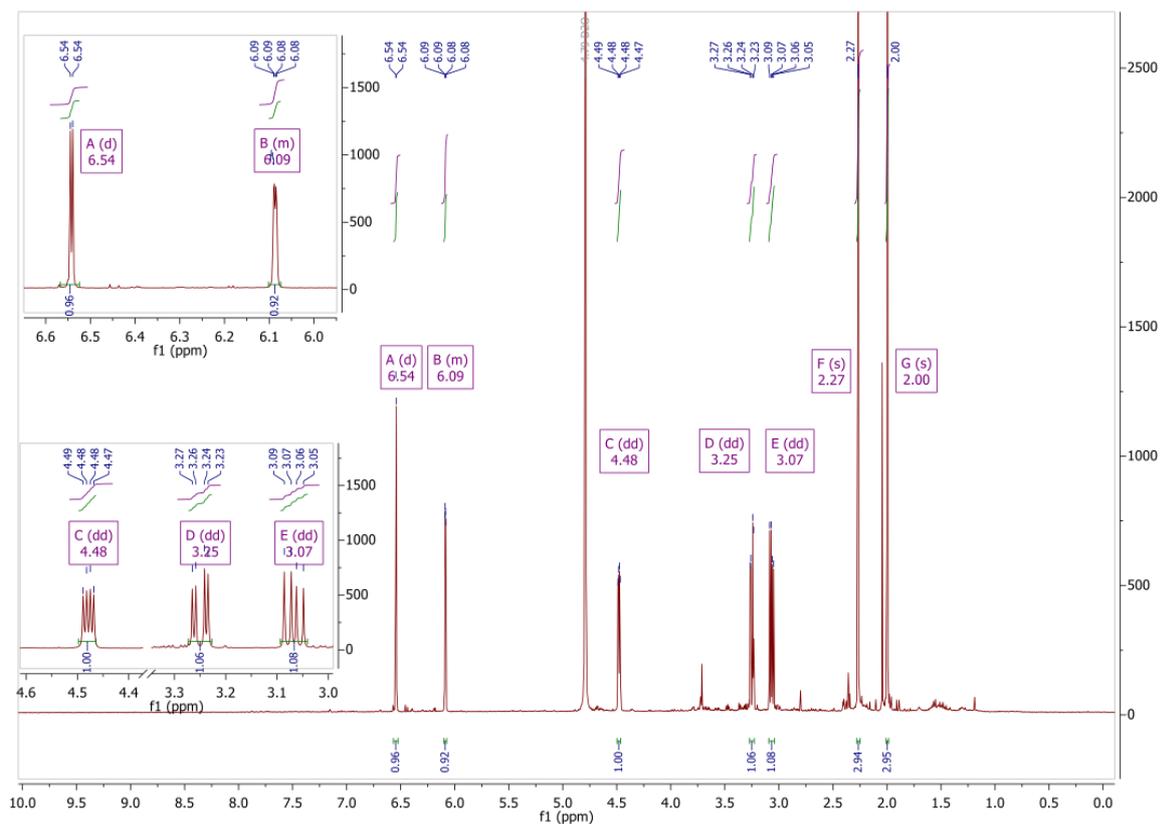


Abb. 21: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz) von AcCys-AcA in D_2O . Die Zuordnung der Signale ist in Tab. 14 gezeigt. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: *N*-Acetyl-L-Cystein.

Tab. 14: ^1H - und ^{13}C -NMR-Singale von AcCys-AcA mit struktureller Zuordnung. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: *N*-Acetyl-L-Cystein.

Signal	f	$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)			$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O)			$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, D_2O)	
		δ [ppm]	<i>m</i>	<i>J</i> [Hz]	δ [ppm]	<i>m</i>	<i>J</i> [Hz]	Signal	Δ [ppm]
A	1 H	8,26	d	7,9				a	173,99
B	1 H	6,53	d	2,8	6,54	d	3,12	b	173,86
C	1 H	6,13	m (d)	(1,99)	6,09	dd	3,12; 0,96	c	156,81
D	1 H	4,30	td	8,4; 4,7	4,48	dd	8,2; 4,1	d	140,46
E	1 H	3,08	dd	13,6; 4,6	3,25	dd	14,3; 4,1	e	120,10
F	1 H	2,89	dd	13,6; 8,8	3,07	dd	14,3; 8,3	f	107,91
G	3 H	2,27	s		2,27	s		g	53,07
H	3 H	1,85	s		2,00	s		h	36,17
								i	21,60
								j	12,92

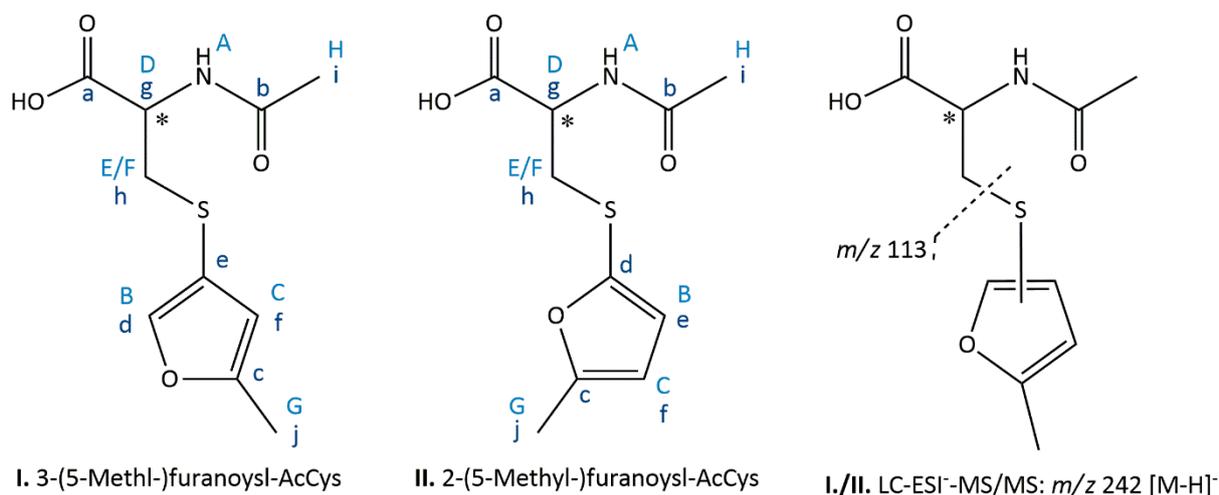


Abb. 22: Identifizierung von AcCys-AcA. I.) Signalzuordnung des ^1H - und ^{13}C -NMR gemäß den Signalen in Tab. 14. II.) Charakteristischem Fragment im LC-ESI-MS/MS-System. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: *N*-Acetyl-L-Cystein, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Es standen zwei Bindungsmechanismen initiiert über den nukleophilen Angriff des Thiols zur Auswahl. Sie sind in Abb. 23 dargestellt und führen zur Entstehung von zwei möglichen Strukturen, die als Option I und II hinsichtlich der NMR-Signale der eigenen Messungen mit Referenzdaten im Folgenden verglichen wurden.

In Option I resultiert die 1,4-Addition (Michael-Addition) an die Doppelbindung von AcA im 3-(5-Methyl)furanoyl-Addukt. Für den selektiven nukleophilen Angriff auf Position 3 sprach zunächst die Kopplungskonstante von $J = 2,8$ Hz des Dubletts von Signal B in $\text{DMSO-}d_6$. Signal C des anderen vinylen, potentiell koppelnden Protons zeigte nur eine minimale Aufspaltung, aus der mit größerer Ungenauigkeit eine Kopplungskonstante $J \approx 1,99$ Hz bestimmt wurde. Das wies auf eine Kopplung über mehr als drei Bindungen hinweg und somit den Ausschluss an Position 4 zu substituieren hin. Wurde das $^1\text{H-NMR}$ in D_2O aufgenommen, blieb die chemische Verschiebung der Signale B und C weitgehend unbeeinflusst, jedoch spalteten sich die Signale

in ein Dublett (H_B), bzw. ein Dublett-von-Dublett (H_C) auf mit der Kopplungskonstante von $J_{B,C} = 3,12$ Hz. Diese wies bereits auf den Bildungsmechanismus der Option II hin.

Option II basiert auf der in der Literatur vergleichbaren chemischen Verschiebung und Aufspaltung der furanosylen Protonen des AcLys-BDA-Addukt (Chen *et al.*, 1997). Die Autoren ordneten den Signalen bei $\delta = 6,53$ ppm (dd, 1 H) und $6,37$ ppm (dd, 1 H) mit der Kopplung von ${}^3J_{3,4} = 3,28$ Hz die vicinalen Protonen an Position 3 und 4 im Furanoylring zu. Das zusätzliche Dublett-von-Dublett bei $\delta = 7,48$ ppm mit der Kopplung ${}^3J_{4,5} = 2,0$ Hz und ${}^4J_{3,5} = 0,9$ Hz wurde dem Proton an Position 5 des Furanoylrings zugeschrieben, dessen Tieffeldverschiebung mit der Nähe zum Sauerstoff begründet wurde. Aus dem Auftreten von nur einem Signal bei $\delta = 7,48$ ppm, das tieffeldverschoben zu den zwei anderen Furanosylprotonen war, schlossen die Autoren auf eine Substitution von AcCys an Position 2. Im Vergleich zu dem tieffeldverschobenen Signal weißt hier AcLys-AcA bei $\delta_G = 2,27$ ppm (s, 3 H) eine isolierte Methylgruppe auf. Das Auftreten der Signale B und C bei gleicher chemischer Verschiebung und identischen Kopplungskonstanten wie AcCys-BDA sprachen für ebenfalls eine Bindung von AcCys an Position 2 von AcA. Als Option II umfasst dieser Bindungsmechanismus die 1,2-Addition des Thiols an die Aldehydgruppe zur Entstehung des 2-(5-Methyl-)furanosyl-Addukts. Die Signale des AcCys-Grundgerüsts wichen lediglich gering durch die Verwendung verschiedener Lösungsmittel voneinander ab (AcCys-BDA δ [ppm]: 4,79 (dt, $J = 7,5; 4,9$ Hz, 1 H, Cys α -CH), 3,28 (dd, $J = 14,3; 5,3$ Hz, 1 H, Cys β -CH_a), 3,22 (dd, $J = 14,3; 4,3$ Hz, 1 H, Cys β -CH_b), 1,99 (s, 3 H, Cys COCH₃); (Chen *et al.*, 1997)).

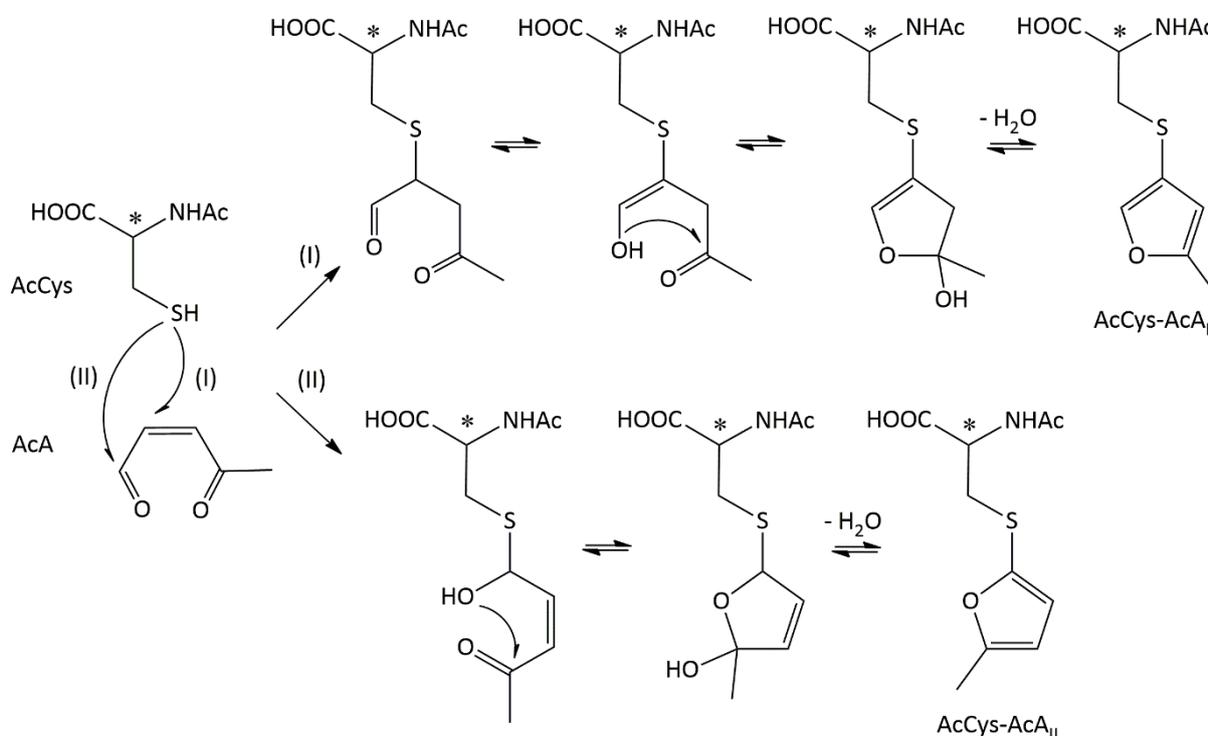


Abb. 23: Hypothesen zu der Bildung von (I) 3-(5-Methyl-)furanosyl-AcCys (AcCys-AcA_I) oder (II) 2-(5-Methyl-)furanosyl-AcCys (AcCys-AcA_{II}). AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: *N*_G-Acetyl-L-Cystein.

Die zwei postulierten **Bindungsmechanismen** lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Bei Option I in Abb. 23 wird die Reaktion mit dem nukleophilen Angriff der Thiolgruppe des AcCys via Michael-Addition (1,4-Addition) an die Doppelbindung von AcA initiiert. Das korrespondierende Enol des gebundenen AcAs zyklisiert im nächsten Schritt zum Halbketal. Durch Kondensation im letzten Schritt entsteht das aromatisches 3-(5-Methyl)-furanosyl-Addukt von AcCys.

Bei Option II (Abb. 23) greift im Gegensatz dazu die nukleophile Thiolgruppe den partiell positiv geladenen Kohlenstoff der Aldehydgruppe an. Nach Ringschluss zum Halbketal entsteht durch Dehydratation das in 2-Position substituierte 2-(5-Methyl)-furanosyl-Addukt von AcCys.

In der **Literatur** stellen Ravindranath und Boyd (1985) die Hypothese der Bindung einer Thiolgruppe (von GSH oder Cystein) an die Doppelbindung von AcA via Michael-Addition auf. Dahingegen sind für die Reaktion von BDA Addukte mit GSH und AcCys bereits nachgewiesen, die an Position 1 oder 2 von BDA anknüpfen wie Abb. 24 zeigt (Chen *et al.*, 1997; Peterson *et al.*, 2006). Stand nur eine Thiolgruppe, z. B. von GSH oder AcCys, BDA als Reaktionspartner zur Verfügung, wurde vornehmlich mit der Aldehydgruppe reagiert. Durch Zyklisierung und Dehydratisierung entstand ein 2-Furanosyl-Addukt. War hingegen zusätzlich ein primäres Amin in Form von AcLys oder GSH bspw. vorhanden, kondensierte dieses mit der Carbonylgruppe, während die Thioleinheit (von GSH, AcCys o. ä.) an die Doppelbindung addierte. So wurden aus dem Ringschluss von BDA zum Pyrrol die Substitution an 2- oder 3-Position zum Thioether nachgewiesen (Chen *et al.*, 1997; Peterson *et al.*, 2006). Im Reaktionsgemisch von AcCys mit *cis*-BDA in Aceton wurde nach 22 h *trans*-BDA und AcCys-BDA im Verhältnis 5:1 via ¹H-NMR ermittelt. Die Entstehung von *trans*-BDA erklären die Autoren durch die reversible Bindung von *cis*-BDA an AcCys, die in *trans*-BDA und AcCys gespalten werden könnte. Möglich wäre ebenso die Umlagerung in organischem Lösungsmittel, wie im Falle von AcA eine *cis*- zu *trans*-Isomerisierung beobachtet wurde (Kap. 4.2.1). Massenspektrometrisch (ESI⁺-MS/MS) wurde ebenfalls die Fragmentierung in entsprechend Thiofuran bzw. Furan beobachtet und ein UV-Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\max} = 246$ nm für AcCys-BDA ermittelt (Chen *et al.*, 1997). Es ist vergleichbar mit dem primären Absorptionsmaximum von AcLys-AcA ($\lambda_{\max} = 250$ nm). In einer Studie zu α,β -ungesättigten Aldehyden, welche aus Lipidperoxidation gebildet wurden, wurde der Ringschluss von (*Z*)-4-Hydroxy-2-alkenalen zum korrespondierenden 2-Alkylfuran beschrieben. Hier wurde zudem der katalytische Effekt von Aminosäuren durch deren de-/protonierende Eigenschaften diskutiert (Adams *et al.*, 2011). Von einem säure- oder basekatalytischen Effekt ist auch hier bei der AcCys-AcA-Bildung auszugehen. Durch Protonierung des nukleophilen Sauerstoffs der Carbonylgruppe kann sich ein mesomeriestabilisiertes Zwischenprodukt, parallel vorliegend als Oxoniumion und

Carbeniumion, ausbilden. Letzteres begünstigt durch Deprotonierung des entstandenen Oxoniumions die Anlagerung einer Hydroxylgruppe zum Halbketal.

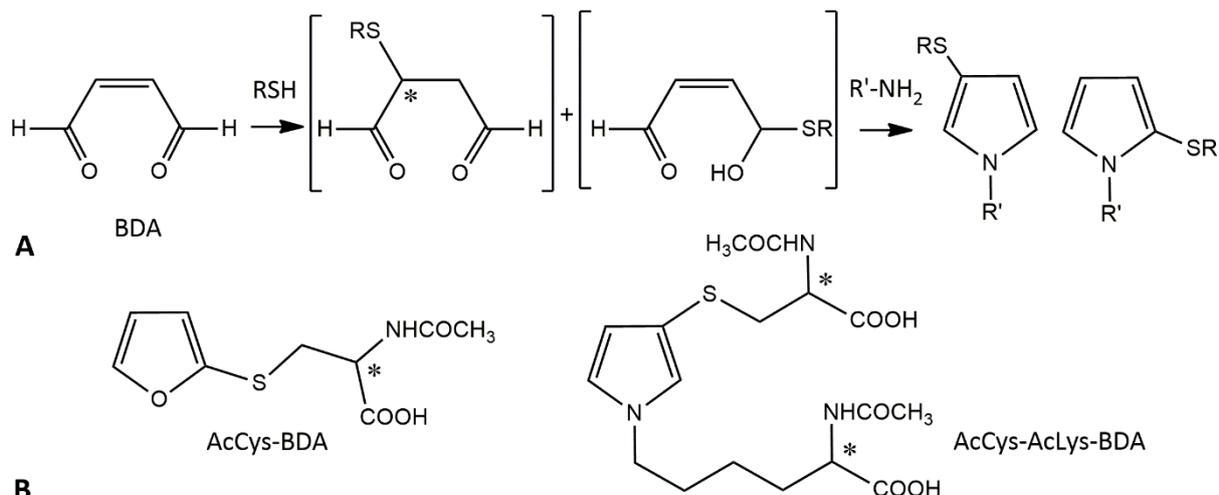


Abb. 24: Adduktbildung von BDA nach Chen *et al.* (1997). (A) Postulierter Reaktionsmechanismus von BDA mit Thiolen (RSH) und Aminen (R'-NH₂). (B) Nachgewiesene Addukte von BDA nach Inkubation mit AcCys (AcCys-BDA) sowie gemeinsamer Inkubation mit AcCys und AcLys (AcCys-AcLys-BDA). AcCys: N_α-Acetyl-L-Cystein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial.

Industriell wird das Prinzip einer solchen vorangehenden Michael-Addition im ersten Schritt der Methionin-Synthese genutzt, bei der Methanthiol mit Acrolein zum Zwischenprodukt Methylmercaptopropionaldehyd reagiert. Hier bevorzugt die Thiolgruppe, gebunden an Methanyl, bei Vorlage einer Doppelbindung und einer Aldehydgruppe (Acrolein) den Angriff der Ethyleneinheit (Jakubke und Jeschkeit, 1982). Wobei von einer reduzierten Reaktivität der Doppelbindung von AcA durch die angrenzende Acetylgruppe auszugehen ist.

Aufgrund der Datenlage, insbesondere unter Einbezug der Literaturerkenntnisse, wird von der Bildung des 2-(5-Methyl)furanoyl-Addukts von AcCys (sprich Option II in Abb. 23), ausgegangen.

4.2.2.1.2 Quantifizierung von AcCys-AcA

Die HPLC-MS/MS-Methode zur Detektion von AcCys-AcA wurde entwickelt, um die Reaktivität von AcA gegenüber AcCys quantitativ bestimmen zu können. In Vorversuchen wurde zum einen die Nutzung von AcCys *versus* AcLys als Abfangreagenz in Mikrosomeninkubationen (Kap. 4.3) getestet. Zum anderen wurde sie genutzt, um Zellüberstände mit MF oder AcA inkubierter pRH im Rahmen der *in vitro*-Untersuchungen nach dem Addukt zu screenen. Es stellte sich heraus, dass auf die zusätzliche Synthese des isotopenmarkierten IS von AcCys-AcA verzichtet werden konnte. AcCys-AcA wurde weder als Abfangreagenz eingesetzt (Vorversuche in Kap. 4.2.2.3) noch konnten Spuren des Addukts *in vitro* nachgewiesen werden (siehe Kap. 4.4.2).

Die etablierten Parameter der HPLC-ESI-MS/MS-Methode mit Validierung und Kalibriergerade sind in Kap. 6.5.2.2 zusammengefasst.

4.2.2.2 Das Addukt AcLys-AcA

Das Addukt von AcA mit AcLys sollte in dieser Arbeit eine größere Rolle spielen und gleichzeitig eine umfangreichere Charakterisierung notwendig machen. Es wurde AcLys-BDA für den strukturellen Vergleich synthetisiert und später als interner Standard von AcLys-AcA in Mikrosomen- sowie Zellinkubationen verwendet. Für eine übersichtlichere Gegenüberstellung soll zuerst die Synthese und Charakterisierung von AcLys-BDA diskutiert werden. Im Anschluss wurden zwei (U)HPLC-ESI⁺-MS/MS-Methoden zur Bestimmung von AcLys-AcA mit AcLys-BDA als internem Standard entwickelt. Methode I für die Untersuchung der metabolischen Aktivierung von MF mittels Mikrosomeninkubationen unter Nutzung von AcLys als Abfangreagenz. Ebenso wurde hiermit in Vorversuchen die Bildung des Addukts *in vitro* getestet. Um diese jedoch ausreichend quantifizieren zu können, wurde Methode II am sensitiveren Massenspektrometer (API 5500, siehe Kap. 6.5.2.3) etabliert.

4.2.2.2.1 Synthese und Charakterisierung von AcLys-BDA

Für die **Synthese** und Charakterisierung von AcLys-BDA wurde auf Vorkenntnisse von J. I. Kremer (in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Richling, TU Kaiserslautern) zurückgegriffen. Analog zur sauren Hydrolyse von DHDMMF zu AcA wurde zur Generierung von BDA 2,5-Dimethoxy-2,5-dihydrofuran (DHDMFu) genutzt. Nach Reaktion in saurer, wässriger Lösung mit AcLys wurde die Bildung von zwei Signalen via LC-UV/Vis beobachtet, von denen eine bei der untersuchten Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm praktisch nicht absorbierte. Die massenspektrometrische Untersuchung (Kap. 6.5.2.3) zeigte zwei massegleichen Produkte mit gleichen Fragmentierungsmustern. Sie eluierten basisliniengetrennt bei $R_t = 9,3$ min und 12,2 min im Verhältnis 10:1. In der Literatur wurde bereits vom isomeren Auftreten von AcLys-BDA im Verhältnis 10:1 (Isomer I zu II aus Abb. 25) berichtet (Chen *et al.*, 1997). Die Isomere konnten hier semipräparativ getrennt werden, sodass das früher eluierende Isomer mit der höheren Umsetzung isoliert und lyophilisiert werden konnte. Es zeigte sich keine erneute Gleichgewichtseinstellung, bzw. Umlagerung zwischen den beiden Isomeren, was massenspektrometrisch und via ¹H-NMR verfolgt wurde (wiederholte Messung der Standards, siehe elektronischer Anhang II). Dies war essentiell für die Nutzung als interner Standard, der den Anspruch eines präzisen, stabilen Signals in einer MS/MS-Methode erfüllen muss.

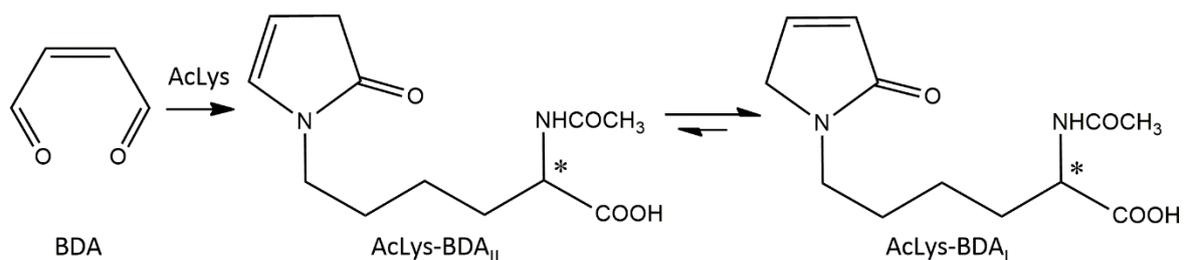


Abb. 25: Bildung der isomeren Formen von AcLys-BDA (I, II) nach (Chen *et al.*, 1997). Adduktbildung nach Inkubation von BDA mit AcLys *in chemico*. AcLys: N α -Acetyly-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial.

UV/Vis-Spektroskopisch zeigte das semipräparativ aufgereinigten Produkt im Wellenlängenbereich von $\lambda = 220\text{--}750\text{ nm}$ ein Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\text{max}} = 254\text{ nm}$ (NanoDrop™).

Chen *et al.* (1997) beschrieben zwei Produkte, die in Tab. 16 Isomer I und II genannt wurden. Bei ihnen eluierte Ersteres bei $R_t = 14,5\text{ min}$ und wies im UV/Vis-Spektrum zwei Maxima bei $\lambda_{\text{max}} = 213,5$ sowie 236 nm auf. Isomer II eluierende nach $R_t = 16,5\text{ min}$ und absorbierte maximal bei $\lambda_{\text{max}} = 206$ und 253 nm .

Massenspektrometrisch wurde als Molekülion von AcLys-BDA ein m/z von 255 via ESI⁺-MS/MS detektiert. Dies entspricht der Masse von AcLys plus BDA minus einem Wassermolekül. Der Produktionenscan (MS²) in Abb. 26 zeigt die Fragmentierung, der die abgebildeten Struktureinheiten zuordenbar waren. Nach semipräparativer Isolierung des im höheren Anteil vorliegenden Isomers zeigte sich die erfolgreiche Auftrennung der Isomere durch ein Signal im Chromatogramm via HPLC-ESI⁺-MS/MS. Das Produkt wurde in Wasser gelöst, aliquotiert bei -20 °C gelagert und über einen Zeitraum von 6 Monaten wurde keine erneute Isomerisierung hin zur Entstehung eines zweiten Signals beobachtet.

Auch Chen *et al.* (1997) ermittelten für das Isomeren-Gemisch (Isomer I:II, Verhältnis 10:1, siehe Abb. 25) die geladene Molekülmasse von m/z 255 [M+H]⁺ via ESI⁺-MS/MS. Diese fragmentierte analog zu den eigenen Messungen in die Produktionen mit m/z 237 [M-OH]⁺, 209 (M-COOH) und 167 (M-COOH, COCH₃).

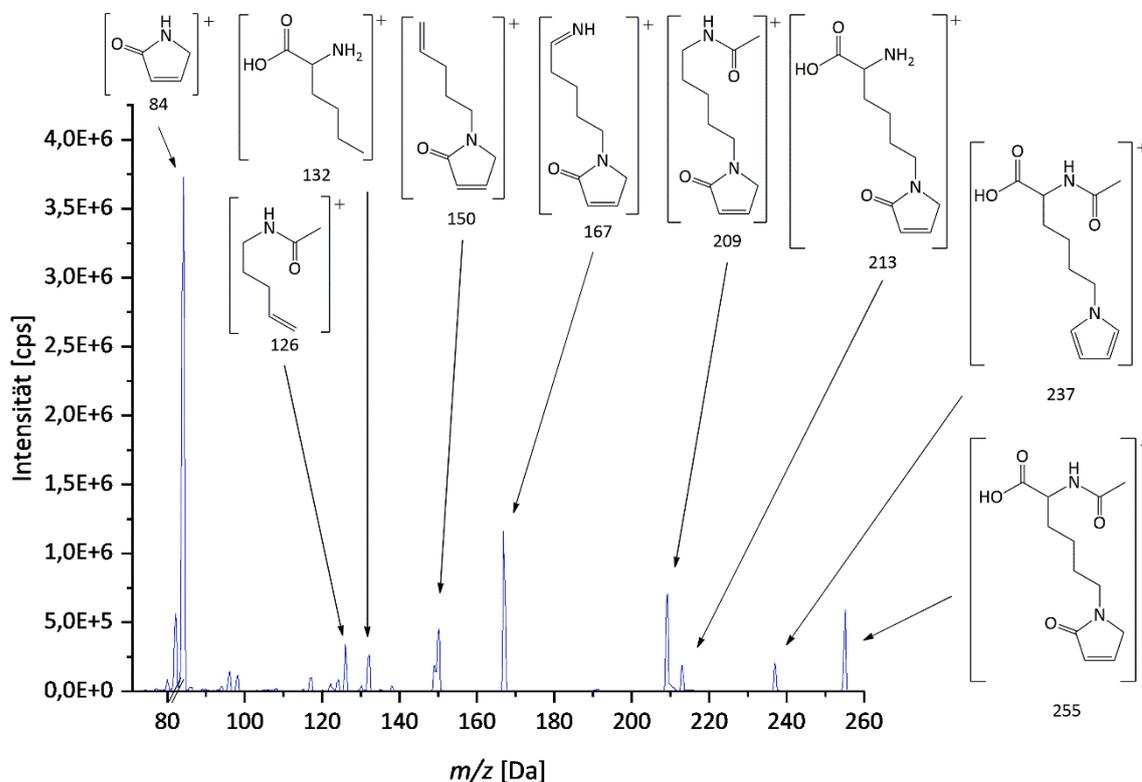


Abb. 26: HPLC-ESI⁺-MS²-Spektrum von AcLys-BDA mit postulierten Fragmentstrukturen. AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Die Signale im ^1H - und ^{13}C -NMR (Abb. 27, Kap. 6.4.5) des isolierten Isomers von AcLys-BDA sind in Tab. 15 zusammengefasst und strukturell zugeordnet. Dem wurde in Tab. 16 die Daten zu den beiden Isomere von AcLys-BDA aus der Literatur gegenübergestellt.

Für das Edukt AcLys wurde unter Einsatz der oben verwendeten Zuordnung folgende Signale im ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) erfasst: δ [ppm] 4,13 (dd, $J = 8,3; 5,0$ Hz, 1H_D), 2,98 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H_F), 2,01 (s, 3H_G), 1,85–1,60 (m, $4\text{H}_{\text{H-J}}$), 1,39 (p, $J = 7,5$ Hz, 2H_K).

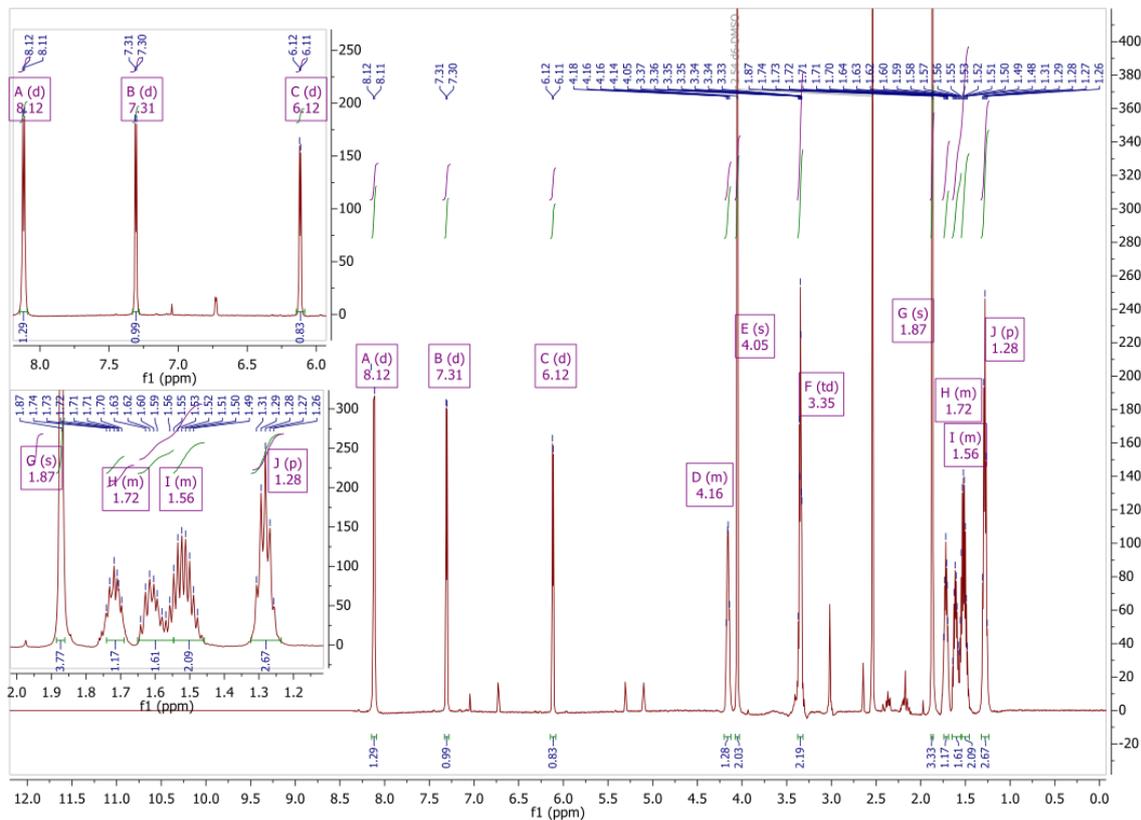


Abb. 27: ^1H -NMR-Spektrum von AcLys-BDA in $\text{DMSO-}d_6$ (600 MHz). AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial.

Im ^1H -NMR in $\text{DMSO-}d_6$ (Abb. 27) war dem sekundären Amin des Grundgerüsts von AcLys Signal A mit der höchsten chemischen Verschiebung von $\delta = 8,12$ ppm zuzuordnen. Dem nächstgelegenen Proton des tertiären Kohlenstoffs entsprach das als Dublett-von-Quartett aufgespaltene Signal D ($\delta = 4,16$ ppm). Während die drei äquivalenten Protonen der Acetylgruppe singulär bei $\delta = 1,87$ ppm auftraten, waren die β -, δ -, und γ - CH_2 -Gruppen der AcLys-Struktur als Multipletts zwischen $\delta = 1,72 - 1,28$ ppm (Signal H-J) vertreten. Die ϵ - CH_2 -Gruppe von AcLys (Signal F) war im Vergleich zum Edukt tieffeldverschoben von $\delta = 2,98$ ppm (t, $J = 7,5$ Hz, $2\text{H}_{\text{F-AcLys}}$) zu $\delta = 3,35$ ppm (dt, $J = 7,1; 2,9$ Hz, $2\text{H}_{\text{F-AcLys-BDA}}$). Dieser erste Hinweis auf die Einschluss des anschließenden Stickstoffs in eine Pyrrolstruktur, wurde bereits beobachtet (Chen *et al.*, 1995).

Tab. 15: ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale von AcLys-BDA in $\text{DMSO-}d_6$ (bei 600 MHz, bzw. 151 MHz). br s: breites Singulett. AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial.

^1H -NMR					^{13}C NMR		Signalzuordnung
Signal	f	δ [ppm]	m	J [Hz]	Signal	Δ [ppm]	
A	1 H	8,12	d	7,7	a	173,85	
B	1 H	7,31	d	5,9	b	170,50	
C	1 H	6,12	d	5,9	c	169,36	
D	1 H	4,16	dq	8,3; 5,3	d	144,58	
E	2 H	4,05	br s		e	126,87	
F	2 H	3,35	td	7,1; 2,9	f	52,34	
G	3 H	1,87	s		g	51,71	
H	1 H	1,72	m		h	40,84	
I	1 H	1,61	m		i	30,63	
J	2 H	1,52	m		j	27,66	
K	2 H	1,28	m		k	22,67	
					l	22,35	

Im ^{13}C -NMR stimmten die Signale a, b und g-f ebenfalls mit AcLys überein. Neben a und b mit chemischen Verschiebungen von $\delta = 174$, bzw. 171 ppm lag ein weiteres Signal ($\delta = 169$ ppm) im Bereich carbonyler C-Atome. Dieses Signal c, die Signale vinyler C=C-Bindung d ($\delta = 145$ ppm) und e ($\delta = 127$ ppm) wurden Substituenten an AcLys zugesprochen. Ebenso kam Signal f mit $\delta = 52$ ppm im Bereich einer tieffeldverschobenen Alkylgruppe zu den Signalen des Edukts AcLys hinzu.

Dass es sich bei dem entstandenen Produkt um ein *N*-gebundenes Laktam in Keto-Form mit einer vinylen Bindung im Ring handelt, wurde mit ^1H -NMR bestätigt. Die einem Proton entsprechenden Signale B und C wiesen als Dubletts eine chemische Verschiebung von $\delta = 7,31$ ppm und 6,12 ppm auf und koppelten vicinal mit $^3J_{B,C} = 5,9$ Hz. Das übrige Signal E ($\delta = 4,05$ ppm) wurde mit zwei Protonen integriert und als breites Singulett detektiert.

Tab. 16: ^1H -NMR-Signale der relevanten Ringprotonen sowie HPLC-UV/Vis-Charakteristika der Isomere von AcLys-BDA aus (Chen *et al.*, 1997). AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial, br: breites.

Isomere	Signal	^1H -NMR			
		B	C	E	F
I <i>N</i> -(Δ^3 -Pyrrolin-2-on)-AcLys		7,25 dt $^3J_{B,C} = 5,94$	6,06 dt $^3J_{B,C} = 5,94$	4,01 br s	3,27 t
II <i>N</i> -(Δ^4 -Pyrrolin-2-on)-AcLys		5,25 dt $^3J_{B,E} = 4,85$	2,97 t	6,68 dt $^3J_{B,E} = 4,87$	3,40 t

In der **Literatur** wurde dieses Muster an pyrrolischen Signalen auch bei der Unterscheidung zwischen den Δ^3 - und Δ^4 -Isomere (siehe Tab. 16) diskutiert (Chen *et al.*, 1997). Sie unterscheiden sich durch die Position der Doppelbindung an Position 3 oder 4 im Laktam. Basierend auf der übereinstimmenden chemischen Verschiebung, Multiplizität und Kopplungskonstante $J_{B,C}$ der Signale B, C und E wurde das in dieser Arbeit synthetisierte Produkt als *N*-(Δ^3 -Pyrrolin-2-on)-Addukt von AcLys, Isomer I der Tab. 16 identifiziert. Chen *et al.* (1995) bestimmten das Δ^3 -Isomer als Hauptprodukt nach Einstellung eines Gleichgewichts (über Nacht bei Raumtemperatur), nachdem initial das Δ^4 -Isomer (1-3 h) dominierte. Während die Autoren eine Interkonvertierung der Isomere beschrieben, konnte in dieser Arbeit keine Umverteilung des isolierten Isomers I weder massenspektrometrisch (in Form von zwei Peaks wie vor der semipräparativen Auftrennung) noch mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie beobachtet werden.

Baker und Sifniades (1979) untersuchten unsubstituiertes *versus* *N*-methyliertes Δ^3 - und Δ^4 -Pyrrolin-2-on. Auch sie waren in der Lage Δ^3 -Pyrrolin-2-on aus dem Isomerengemisch von 9:1 (Δ^3 - zu Δ^4 -Isomer) durch Flüssigchromatographie und Niedrigtemperaturkristallisation zu trennen. Nur in Spuren konnten sie eine Interkonversion der beiden Isomere beobachten. So synthetisierten sie Δ^3 -Pyrrolin-2-on in einer Reinheit von 99,5 %, während für Δ^4 -Pyrrolin-2-on maximalen 84 % erreicht wurden aufgrund der schnellen Isomerisierung zu Δ^3 -Pyrrolin-2-on. Die Isomerisierung erfolgte durch Tautomerisierung zum Enol, was in CH_3OD -Lösung in Gegenwart eines basischen Katalysators durch die beschleunigte Isomerisierung und gleichzeitigem Deuterium-Wasserstoff-Austausch in Position 3 und 5 bestätigt wurde. Mit Austausch des amid-gebundenen Wasserstoffs gegen eine elektronenschiebende Methylgruppe wurde die Azidität der Methylenprotonen gesenkt. Dies führte zur langsameren Enolisierung und weiteren Isomerisierung, wodurch sich das Verhältnis von 98:2 des Δ^3 - zu Δ^4 -*N*-Methylpyrrolin-2-on nach einer Woche bei 4 °C nur geringfügig veränderte (Baker und Sifniades, 1979).

In dieser Arbeit wurde die **Stabilität** von AcLys-BDA bei 4 °C nach 6 Monaten mittels $^1\text{H-NMR}$ geprüft. Neben einer deutlichen Zunahme des charakteristischen Wasser-Signals ($\delta = 3,49$ ppm; 70 % f_{Σ}) waren die Signale von Δ^3 -AcLys-BDA weitgehend unbeeinflusst. Für Versuche wurden stets bei -20 °C gelagerte, aliquotierte Ansätze von AcLys-BDA verwendet.

Der in Abb. 28 postulierten **Bildungsmechanismus** von AcLys-BDA basiert auf der Hypothese von Chen *et al.* (1997). Die Adduktbildung wird durch nukleophilen Angriff der primären Aminogruppe von AcLys an eine Aldehydgruppe von BDA initiiert. Das entstandene Halbaminale kann durch Ringschluss des Stickstoffs zum anderen partiell positiv geladenen Carbonyl-Kohlstoff und anschließender Dehydratation eine Pyrrol-Struktur ausbilden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass das Halbaminale zunächst zum Imin kondensiert, um im Anschluss zum aromatischen Pyrrol zu zyklisieren. Dies ist vor allem in Gegenwart von

verdünnter Säure durch deren katalytische Wirkung zu erwarten. In beiden Fällen entsteht das *N*-(1*H*-Pyrrol-2-ol)-Addukt von AcLys, welches als Enol der Keto-Enol-Tautomerie unterliegend zum Laktam isomerisieren kann. Wie gezeigt wurde, lag das Gleichgewicht in wässriger Lösung auf Seiten des Laktams, insbesondere des Δ^3 -Isomers (I), das in dieser Arbeit erfolgreich isoliert werden konnte.

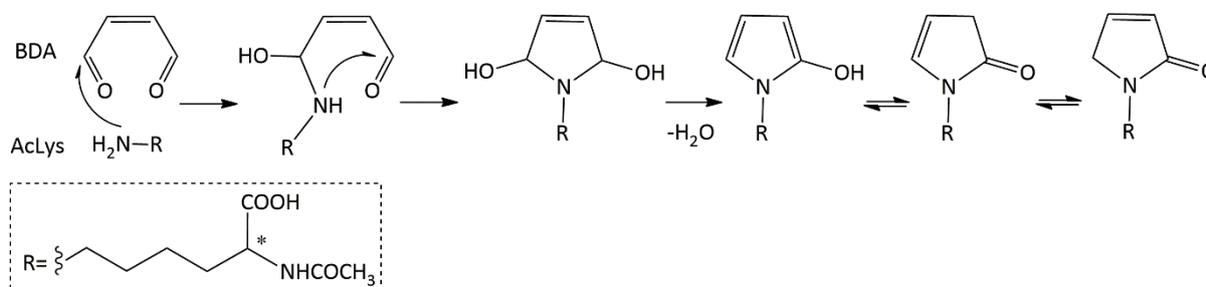


Abb. 28: Postulierter Mechanismus der AcLys-BDA Bildung basierend auf der Hypothese von Chen *et al.* (1997). AcLys: N_{α} -Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial.

4.2.2.2 Synthese und Charakterisierung von AcLys-AcA

Die **Synthese** von AcLys-AcA wurde aus der sauren Hydrolyse von DHDMMF unter Zugabe von AcLys (analog zur Synthese von AcLys-BDA aus DHDMFu) durchgeführt (siehe Experimentaltail Kap. 6.4.4). Bei der semipräparativen Auftrennung, bzw. der massenspektrometrischen Kontrolle (LC-ESI⁺-MS/MS) der Fraktionen zeigte sich bereits, dass hier ebenfalls zwei hintereinander eluierende Produkte auftraten. Sie wiesen das gleiche *m/z* und Fragmentierungsmuster auf, während wieder eines der beiden bei $\lambda = 254$ nm nicht UV/Vis-aktiv war. Dies führte zur Hypothese der Entstehung von ebenfalls isomeren Formen von AcLys-AcA. AcLys-AcA I und II eluierten bei $R_t = 8,6$ und $9,2$ min knapp basisliniengetrennt, jedoch in einem geringeren Abstand als die Isomere von AcLys-BDA. Wurde die Synthese semipräparativ aufgetrennt, zeigten die Fraktionen unabhängig ihrer Aufteilung, das heißt anfänglichen Anteilen beider Produkte, stets das gleiche Verhältnis von 10:1 an I zu II. Dies ließ das Vorliegen der zwei Formen in einem Gleichgewicht vermuten. Die Gleichgewichtshypothese wird unterstützt von der Beobachtung, dass das gleiche Verhältnis an AcLys-AcA I und II bei der Reaktion von AcLys mit isoliertem AcA (aus der MF-Oxidation mit DMDO), enzymatisch generiertem AcA (im Zuge der Mikrosomeninkubationen bei metabolischer Aktivierung von MF) und *in vitro* durch pRH gebildetem AcA vorlag. Neben der rein praktisch nicht realisierbaren Trennung von AcLys-AcA I und II, sprach auch das Auftreten der beiden Produkte in den realen Proben (Mikrosomeninkubationen Kap. 4.3, *in vitro* Untersuchungen Kap. 4.4.2.) für eine gemeinsame Isolation von AcLys-AcA I und II.

Die **massenspektrometrische** Untersuchung von AcLys-AcA I und II via HPLC-ESI⁺-MS/MS zeigte gleiche *m/z* der Prekursorionen und Produktionen. Das Prekursorion $[M+H]^+$ mit *m/z* = 269 stimmt mit dem addierten Molekulargewicht von AcLys und AcA unter Abzug der Masse eines Wassermoleküls (18 Da) übereinstimmte. Es entsprach gleichzeitig dem *m/z* von AcLys-BDA plus 15 Da, der Masse einer Methylgruppe, die den strukturellen Unterschied

zwischen BDA zu AcA darstellt. Weitere Parallelen wurden im Produktionenscan (MS²) beobachtet als alle Massen von AcLys-BDA analog als Fragmente von AcLys-AcA plus 15 Da (CH₃-Gruppe) in vergleichbaren Intensitäten auftraten. Ausgenommen waren Fragmente des AcLys-Gerüsts, die das gleiche *m/z* aufwiesen (*m/z* 124, 126, 132). Abb. 29 veranschaulicht das Fragmentierungsmuster mit entsprechenden Struktureinheiten von AcLys-AcA.

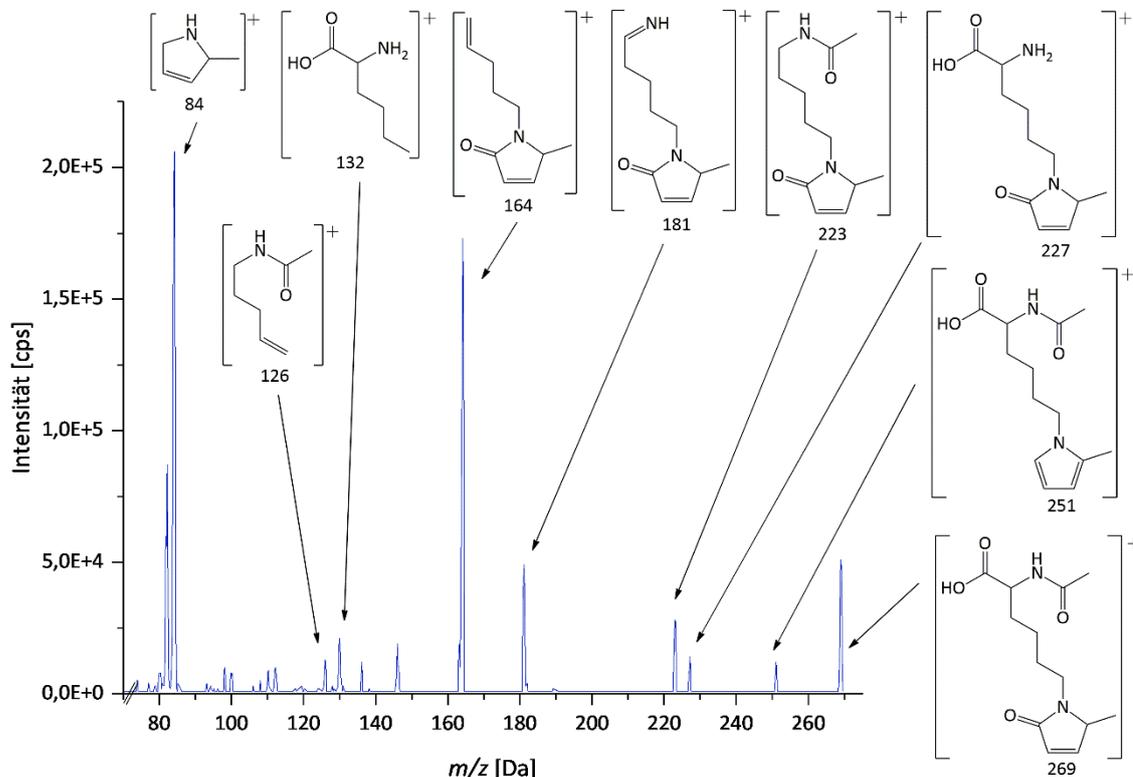


Abb. 29: HPLC-ESI⁺-MS²-Spektrum von AcLys-AcA mit postulierten Fragmentstrukturen. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, *m/z*: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Im MRM-Modus (siehe Kap. 6.5.2.3) lagen die integrierten Flächen unter der Kurve (AUC, engl.: *area under the curve*) der Fragmente von AcLys-AcA I und II im gleichen relativen Verhältnis zueinander. Insbesondere unter Einbezug der Parallelen zu AcLys-BDA war dies ein weiterer Hinweis auf das Vorliegen zweier sehr ähnlicher Verbindungen, analog zu den Isomeren von AcLys-BDA. Im Zuge folgender Versuche wurde geprüft, ob sich das Verhältnis und die Fragmentierung der beiden Produkte von AcLys-AcA in Proben mit unterschiedlichen Quellen an AcA, aber auch unterschiedlicher Matrices veränderte. Darunter fielen:

- Synthese von AcLys-AcA via saurer Hydrolyse von DHDMMF plus AcLys (Standards)
- Synthese von AcLys-AcA aus „freiem“ AcA (aus Oxidation von MF mit DMDO) plus AcLys
- Fraktionen des AcLys-AcA-Gemischs (semipräparativ teil-/getrennte Produkte I und II)
- Reaktionsstudie von AcA mit AcLys in Puffer (Vorversuche für Mikrosomeninkubationen)
- Enzymatische Generierung von AcA (MF-Inkubation von Mikrosomen und SupersomesTM)
- *In vitro* Generierung von AcA durch pRH (AcLys-AcA in Zellüberständen)

In allen Fällen wurden die charakteristischen zwei Signale im Verhältnis $\sim 1:10$ bei $R_t = 8,6$ und $9,2$ min ermittelt (marginale Abweichungen durch unterschiedliche Matrices wurden an entsprechender Stelle erläutert).

Abb. 30 zeigt ein repräsentatives Chromatogramm von AcLys-AcA der Standardreihe (synthetisiert mittels saurer Hydrolyse von DHDMMF plus AcLys) im MRM-Modus. Die Proben wurden mit zwei unterschiedlichen Methoden (Kap. 6.5.2.3) vermessen, die sich durch die verwendeten Massenspektrometer unterschieden. Methode I (MS/MS-System 3200) wurde zuerst etabliert und für die oberen ersten 5 Probenarten genutzt. Sie bildete Grundlage für Methode II am sensitiveren MS-Gerät (MS/MS-System 5500), die zur Quantifizierung geringer Konzentrationen an AcLys-AcA in Zellüberständen pRH notwendig war. Somit kann ein etwaiger geräte-technischer Hintergrund der Produktaufspaltung ausgeschlossen werden. Während der Methodenetablierung verhielten sich AcLys-AcA und AcLys-BDA nicht nur hinsichtlich ihrer Fragmentierung als strukturell sehr ähnlich, sondern auch in Bezug auf ihre chromatographischen Eigenschaften. In unterschiedlichen Systemen bei verschiedenen Bedingungen eluierten sie in Abständen von $0-0,04$ min R_t ein weiterer Hinweis auf ihre strukturelle Ähnlichkeit.

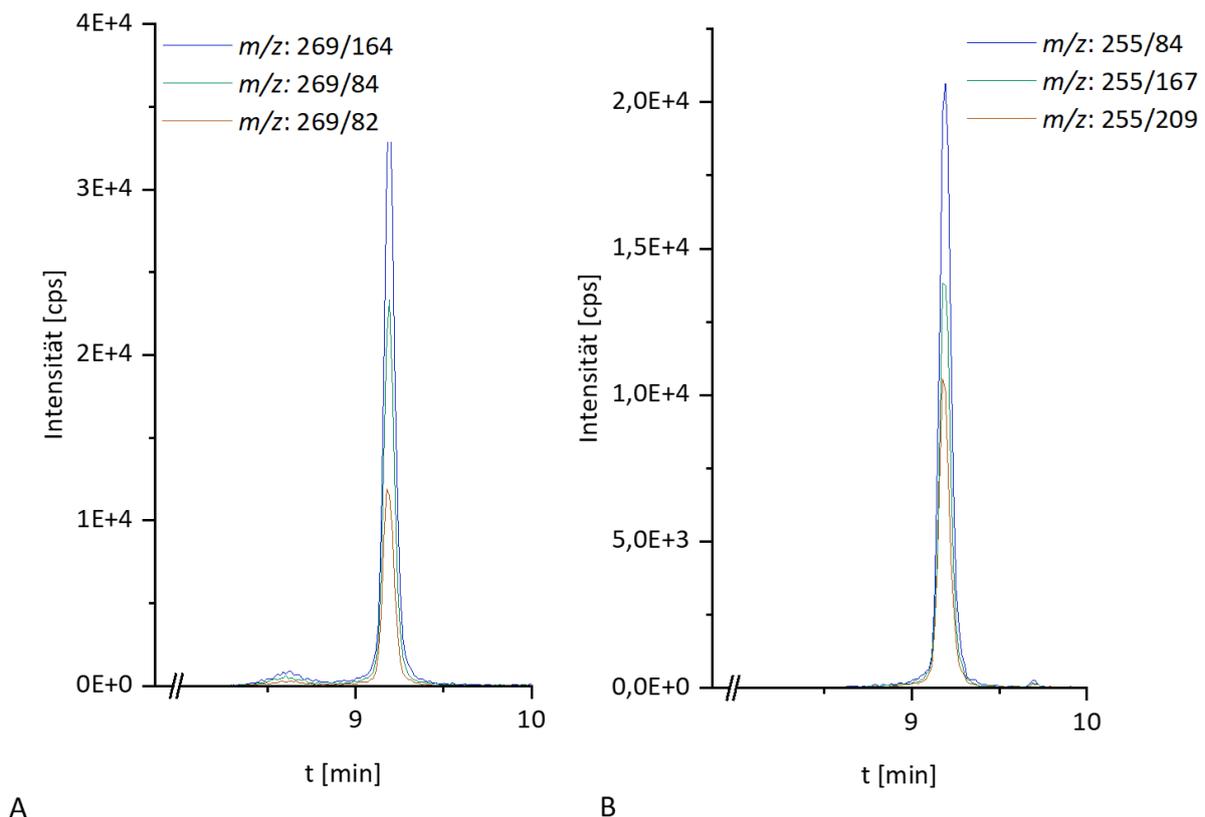


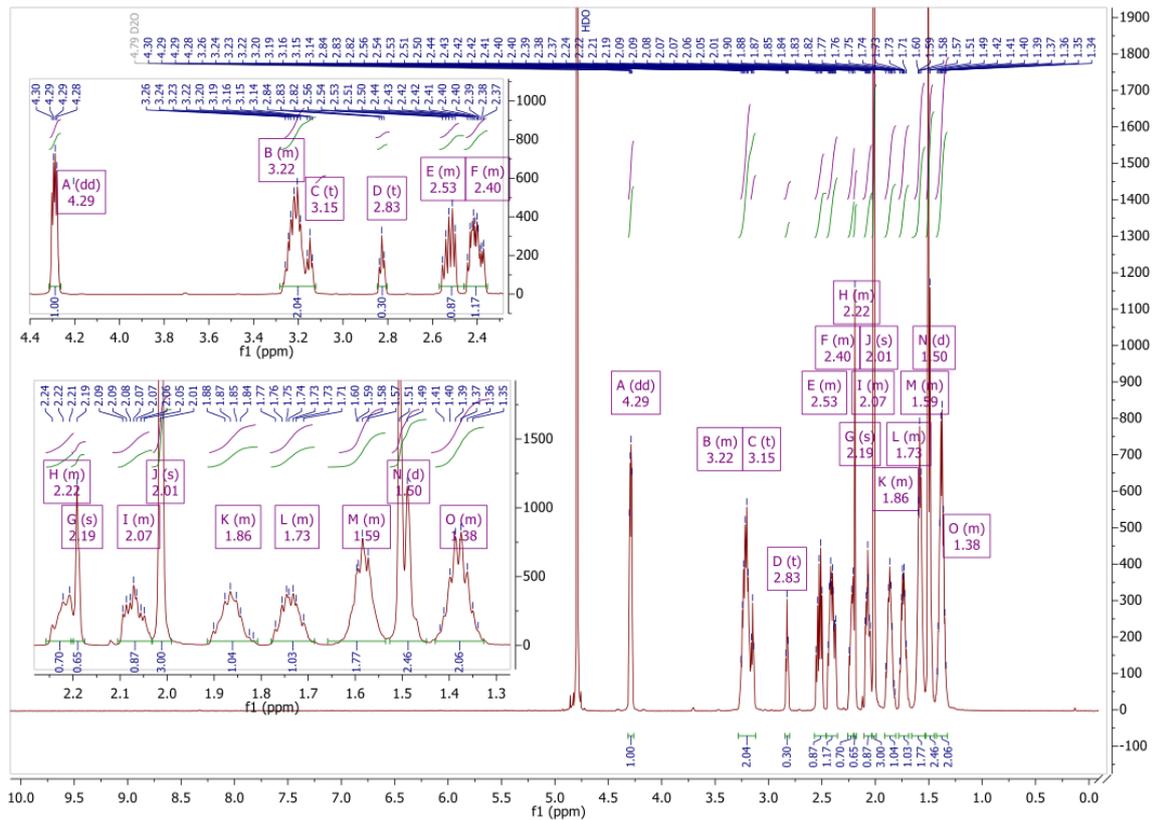
Abb. 30: HPLC-ESI⁺-MS²-Chromatogramm der Massenübergänge von (A) AcLys-AcA und (B) AcLys-BDA im MRM-Modus (synthetisierte Standards, je 1 μ M, Methode I, Kap. 6.5.2.3). AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_{α} -Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_{α} -Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Das **UV/Vis**-Spektrum des semipräparativ aufgereinigten Produkts wies ein Absorptionsmaxima bei $\lambda_{\max} = 229$ nm (Messbereich $\lambda = 220-750$ nm, NanoDropTM) auf.

Mittels **NMR**-Spektroskopie galt es die Strukturen, insbesondere die Hypothese der Isomerenbildung, zu bestätigen. Dies gestaltete sich aufgrund variierender Signalverhaltens in unterschiedlichen Lösungsmitteln als komplexer als erwartet. Es wurde AcLys-AcA in D₂O, DMSO-*d*₆, MeCN-*d*₃ oder CDCl₃ via ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie vermessen, sowie in Kombination als H,H-COSY (engl.: *H,H-correlated spectroscopy*), HMQC (engl.: *heteronuclear multiple quantum coherence*) und HMBC (engl.: *heteronuclear multiple bond coherence*) ausgewertet. Ergänzend wurden mittels DOSY (engl.: *diffusion ordered spectroscopy*) das Vorliegen von gegebenenfalls mehrerer Verbindungen über ihre Diffusionskoeffizienten verglichen. Da nicht eine NMR-Messung zur völligen Aufklärung ausreichte, sind im Folgenden die Erkenntnisse aus verschiedenen Untersuchungen kombiniert und diskutiert. Es wurden Computerprogramm gestützt NMR-Spektren vorhergesagt (MestReNova®), die im elektronischen Anhang (II) zu finden sind.

Das Grundgerüst AcLys in AcLys-AcA:

Im ¹H-NMR-Spektrum von AcLys-AcA in D₂O (Abb. 31) wurde das **Grundgerüst AcLys** über den Betrag der Integrale zugeordnet und in Tab. 17 mit den ¹H-NMR-Daten des Eduktes AcLys verglichen. Die Signale des AcLys-Grundgerüst von AcLys-AcA waren analog zu den Messdaten des AcLys-Grundgerüsts von AcLys-BDA in Tab. 15. Bis auf die ε-CH₂-Gruppe, nächstgelegen zum Stickstoff, stimmten die AcLys-Signale überein und boten die Grundlage einer Verhältnisberechnung der zusätzlichen Signale. Das Proton der sekundären N_αH-Gruppe war austauschbar mit einem Deuteron und somit nur in organischem Lösungsmittel detektierbar. Abhängig vom Lösungsmittel und der Auflösung war es bei δ = 8,07 ppm (DMSO-*d*₆) als Dublett, Dublett-von-Dublett oder Multiplett abgebildet. Das davon vicinal lokalisierte Proton der tertiären Methingruppe (α-CH) erschien konsequent als charakteristisches Dublett-von-Dublett oder Multiplett bei δ = 4,1–4,3 ppm. Die anknüpfenden CH₂-Gruppen (β, γ, δ) lagen als drei bis vier Multipletts im Bereich δ = 1,2–1,9 ppm, wobei für die beiden Protonen der γ-CH₂-Gruppe die geringste chemische Verschiebung zu erwarten war. Die drei äquivalenten Protonen der Acetylgruppe erschienen stets im scharfen Singulett als nächstgelegenes Signal tieffeldverschoben zu den CH₂-Gruppen bei δ = 1,8–2,1 ppm. Die ε-CH₂-Gruppe des ungebundenen Edukts AcLys in D₂O wurde als scharfes Triplet bei δ = 2,98 ppm detektiert. Analog zu AcLys-BDA wurde im Falle von AcLys-AcA eine Tieffeldverschiebung zu δ = 3,1–3,4 ppm und Abbildung als charakteristisches Multiplett beobachtet. Je nach Auflösung war eine mehr oder weniger deutliche Aufspaltung von zwei Multipletts erkennbar, die in Summe (verhältnismäßig) zwei Protonen des AcLys-Gerüsts entsprachen. Sie lagen im Verhältnis ~1:4 vor, welches in der Diskussion der zwei Produktformen wiederkehrte (siehe „Kopplungssysteme und die AcA-Komponente in AcLys-AcA“). Die Tieffeldverschiebung der ε-CH₂-Gruppe war ein zusätzlicher Hinweis, dass ebenso AcA N_ε von AcLys in eine Ringstruktur einschloss und somit eine pyrrolische Struktur ausbildete.

Abb. 31: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von AcLys-AcA in D_2O (600 MHz). AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin.Tab. 17: $^1\text{H-NMR}$ -Signale von AcLys-AcA und AcLys in D_2O mit teils struktureller Zuordnung. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin.

$^1\text{H-NMR}$ (AcLys-AcA) (600 MHz, D_2O)						$^1\text{H NMR}$ (AcLys) (400 MHz, D_2O)				Signalzuordnung
Signal	f [H]	δ [ppm]	m	J [Hz]		f [H]	δ [ppm]	m	J [Hz]	
A	1	4,29	dd	8,7; 4,8	AcLys	1	4,13	dd	8,3; 5,0	
B	1,65	3,22	m		AcLys 2H _I	2	2,98	t	7,5	
C	0,35	3,15	t	6,7	AcLys 2H _{II}					
D	0,30	2,83	t	6,6						
E	0,86	2,53	m							
F	1,16	2,40	m							
G	0,60	2,22	s		~3H _{II}					
H	0,65	2,19	m							
I	0,87	2,07	m							
J	3	2,01	s		AcLys	3	2,01	s		
K	1	1,86	m		AcLys					
L	1	1,73	m		AcLys	4	1,76	m		
M	2	1,59	m		AcLys					
N	2,46	1,50	d		~3H _I					
O	2	1,38	m		AcLys	2	1,39	m		

Im ^{13}C -NMR-Spektrum (Kap. 6.4.4) wurden dem **AcLys-Gerüst** zwei Signale im Bereich von $\delta = 174,21\text{--}177,53$ ppm den beiden Carbonyleinheiten (der Acetylgruppe und Carboxygruppe) zugeordnet. Des Weiteren wurde das Signal bei $\delta = 52,73$ ppm α -CH und drei Signale im Bereich $\delta = 21\text{--}30$ ppm der β -, λ - und δ -CH₂-Gruppen zugeordnet, wohingegen die ϵ -CH₂-Gruppe durch die Nähe zum Stickstoff tieffeldverschoben bei $\delta = 38,69\text{--}38,85$ ppm lag. Bis dahin verhielten sich die Signale analog zu denen des AcLys-BDA-Produkts. Während das BDA-Addukt jedoch als einzelnes Isomer isoliert und charakterisiert werden konnte, lag AcLys-AcA in einem Gleichgewicht mehrerer Formen vor. Die folgende Diskussion fokussiert sich auf das Substitutionsmuster am N_ϵ des AcLys. Wichtig war, dass die Summe der zusätzlichen Signale in Bezug auf die Anzahl der Protonen des Grundgerüsts in ein realistisches Verhältnis gesetzt werden konnten.

Kopplungssysteme und die AcA-Komponente in AcLys-AcA:

Entgegen den Erwartungen wurden im ^1H -NMR-Spektrum keine vinylen Protonen im Bereich $\delta \sim 5\text{--}7$ ppm beobachtet, die der massenspektrometrisch postulierten Struktur entsprechen. Ebenso konnten im ^{13}C -NMR keine Signale im Bereich von $\delta = 100\text{--}160$ ppm gemessen werden, wie es für vinylische C-Atome der Fall wäre.

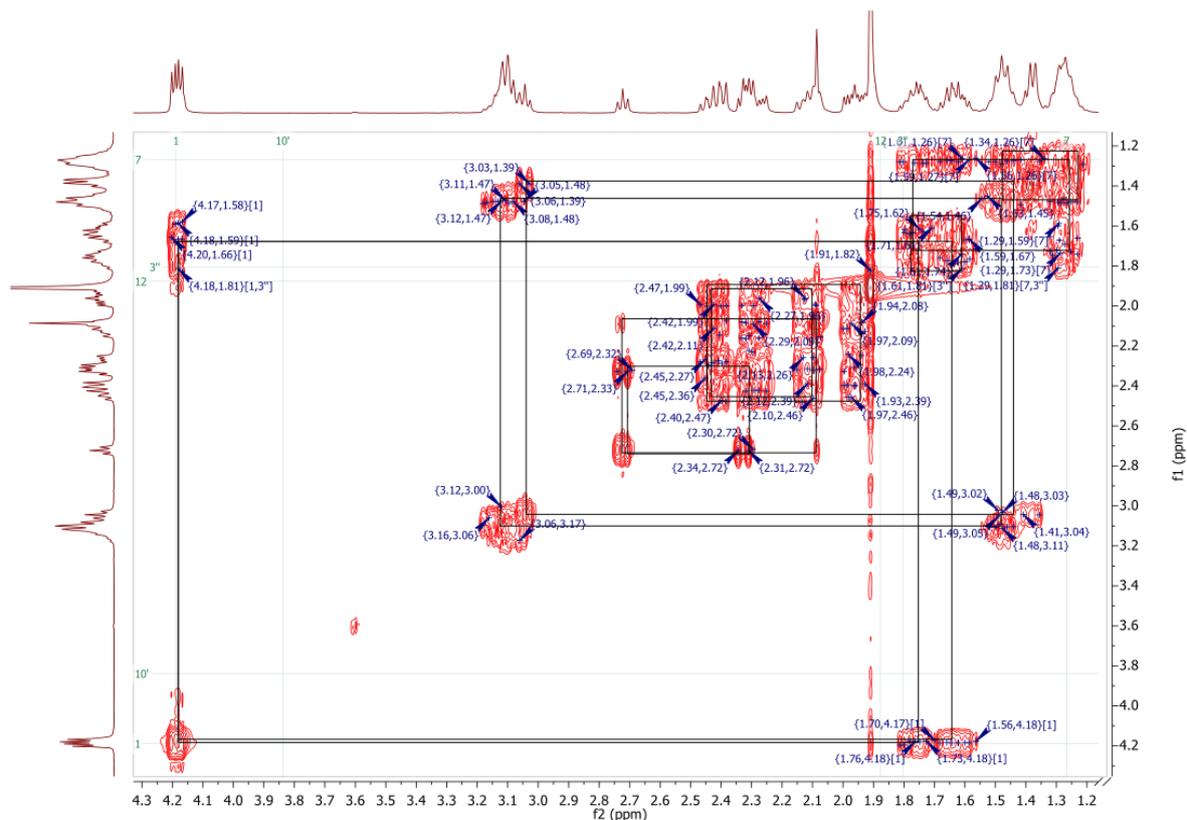


Abb. 32: H,H-COSY-Spektrum von AcLys-AcA in D₂O (400 MHz). AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_ϵ -Acetyl-L-Lysin.

Im ^1H -NMR-Spektrum von **AcLys-AcA in D₂O** ließen sich die Signale des AcLys-Gerüsts wie oben ausgeführt und im Einklang mit den Messungen von AcLys-BDA einordnen. Via H,H-COSY (Abb. 32) wurde ein isoliertes Kopplungssystem zwischen α -CH–[β -CH₂– γ -CH₂– δ -CH₂]– ϵ -CH₂

beobachtet. Die versetzten Multipletts von ϵ -CH₂ der unterschiedlichen Verbindungen (Addukt I und II im Verhältnis 1:4) koppelten parallel mit dem Multiplett bei $\delta = 1,59$ ppm, was dementsprechend den Protonen von δ -CH₂ zuzuschreiben war. Das HMBC bestätigte die Kopplungen der carbonylen C zu α -CH (J^2 von AcLys-COOH), bzw. Acetyl-CH₃ (J^2 von CO-CH₃). Abb. 31 zeigt das ¹H-NMR-Spektrum von AcLys-AcA in D₂O mit Zuordnung des AcLys-Gerüst und Kopplungssystemen (via *H,H*-COSY, 3J) zwischen Protonen der addierten AcA-Komponente. Hierbei wurden die Protonen des AcLys-Gerüsts auf 1 normiert. Die übrigen Protonen, aus AcA stammend, konnten im *H,H*-COSY zwei Kopplungssystemen zugeordnet werden. Die teils stark überlappenden Signale der beiden Gruppen standen im Verhältnis von etwa 1:4. Dieses spiegelte sich an den beiden Multipletts der ϵ -CH₂-Gruppe des AcLys, zwei getrennten Signalen bei $\delta_B = 3,22$ (m, 2 H_I) und $\delta_C = 3,15$ ppm (t, 2 H_{II}) sowie dem Dublett bei $\delta_N = 1,50$ ppm (3 H_I) relativ zum Signal bei $\delta_G = 2,19$ ppm (d, ~3 H_{II}) wider (letzteres ragte aus einem Multiplett, weshalb die Integration einer Abschätzung gleicht). Die Addition der Integrale der beiden 3 H-Signale ergab rechnerisch 3 Protonen der Methylgruppe aus dem AcLys-Gerüst. Das bot zunächst den größten Hinweis, dass es sich um zwei Verbindungen handelte, denen das gleiche AcLys-Gerüst zugrunde lag, sodass die Signale der AcLys-Grundgerüste zusammenfielen. Ausnahme waren wie angesprochen die Protonen der ϵ -CH₂-Gruppe, die bereits leicht verschoben waren und auf die Substitution am N_α-Stickstoff hindeuteten. Entscheidend bei der Zuordnung der zwei drei-protonigen Signale der unterschiedlichen Produkte war deren Multiplizität. Während das Signale der Gruppe II bei $\delta = 2,19$ ppm ein Singulett und somit eine isolierte Methylgruppe vermuten ließ, handelte es sich bei dem 3 H-Signale der Gruppe I ($\delta = 1,50$ ppm) um ein Dublett. Letzteres entspräche in der Hypothese der Isomeren (analog zu AcLys-BDA) einer Methylgruppe mit angrenzendem tertiären C-Atom, das heißt einem benachbarten Proton. Die übrigen, untereinander koppelnden Protonen lagen im Bereich $\delta = 2,1$ – $2,8$ ppm, weshalb sie nicht als vinylprotonen bestätigt werden konnten. Die summierten Integrale der 3 H-Signale entsprachen dem integralen Wert der Acetylgruppe des Grundgerüsts.

Im ¹³C-NMR-Spektrum von AcLys-AcA in D₂O waren 13 Signale zu erkennen sowie zwei weitere mit deutlich reduzierter Intensität (0,5–0,05) bei $\delta = 174,97$ ppm und 29,28 ppm. Die Zuordnung der Signale des AcLys-Gerüst war wie oben beschrieben analog zu AcLys-BDA (Tab. 15).

Die fünf Signale zusätzlich zu denen acht des AcLys-Gerüsts wurden der addierten AcA-Komponente zugeschrieben. So ließ das Signal bei $\delta = 176,07$ ppm auf einen weiteren carbonylen Kohlenstoff schließen, der im HMQC keine direkte (1J) Kopplung zu einem Proton zeigte. Via HMBC koppelte der carbonyle Kohlenstoff jedoch mit ϵ -CH₂ der AcLys-Einheit und einem Proton des Signals der AcA-Komponente. Das schwache zusätzliche Signal bei $\delta = 174,97$ ppm im ¹³C-NMR-Spektrum könnte der zweiten Form des AcA-Addukts zugehörig sein. Mit Hilfe des HMQCs wurden die 3 H-Signale der AcA-Einheiten bei $\delta = 2,22$ ppm und 1,50 ppm des ¹H-NMR-Spektrums im ¹³C-NMR-Spektrum den Signalen bei $\delta = 29,28$ ppm, bzw.

28,59 ppm zugeordnet. Das geringere Vorkommen in ^1H -NMR spiegelte sich in der reduzierten (0,5-0,05) Intensität im ^{13}C -NMR-Spektrum wider. Die chemische Verschiebung von 22,23 ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum ließ auf das abgeschirmte C-Atom einer Methylgruppe schließen. Das ^{13}C -Signal bei $\delta = 30,03$ ppm im Bereich alkyliischer C-Atome ließ sich den Multipletts der AcA-Einheit zuordnen. Das auf $\delta = 38,85$ ppm tieffeldverschobene C-Atom war knapp basisliniengetrennt zum Signal der ϵ - CH_2 -Gruppe, welches auf ebenfalls eine direkte Nachbarschaft zum pyrrolischen Stickstoff hindeutet. Das HMQC zeigte dabei die deutliche Zuordnung zum Triplet der AcA-Komponente bei $\delta = 2,83$ ppm im ^1H -NMR. Ohne Zuordnung war somit ein prägnantes ^{13}C -Signal mit einer chemischen Verschiebung von 91,18 ppm, dessen Tieffeldverschiebung auf einen stärker entschirmten Kern durch einen elektronenziehenden Substituenten (stärker als den pyrrolischen Stickstoff) hinwies. Während im HMQC hier keine direkte Kopplung (1J) zu einem Proton beobachtet wurde, zeigte das HMBC $^{2/3}J$ -Kopplungen zu Protonen der Multipletts von AcA bei $\delta = 2,2$ – $2,4$ ppm.

Es stellte sich die Frage, wie mit einer begrenzten Anzahl an Protonen der von AcA abstammenden Struktureinheit in AcLys-AcA ohne ersichtliche Doppelbindung im pyrrolischen Ring die Struktur zu erklären ist. Die Tatsache, dass D_2O als Lösungsmittel eingesetzt wurde, ließ den Austausch von Protonen gegen Deuteronen vermuten. Tee und Swedlund (1983) beschrieben bereits den Austausch der vinylisch gebundenen Protonen durch Deuterium bei der Isomerisierung von $^3\Delta$ - und $^4\Delta$ -Pyrrolin-2-on, da dieser über tautomere Umlagerung des Enols stattfand. Während AcLys-BDA als einzelnes Isomer separiert werden konnte (sprich keine signifikante Umwandlung stattfand), lag AcLys-AcA I und II in einem Gleichgewicht vor. Die stete Isomerisierung ermöglichte den hypothetischen H/D-Austausch. Dies wäre zwar nicht im ^1H -NMR-Spektrum erkennbar, jedoch müssten in diesem Fall die vinylen C-Atome trotzdem tieffeldverschoben im Bereich zwischen $\delta = 100$ – 160 ppm im ^{13}C -NMR-Spektrum auftreten. Das war nicht der Fall. Eine andere Möglichkeit in D_2O Signale zu verschleiern, wäre die Hydratisierung mit D_2O . So käme es zum Bruch der Doppelbindung hin zur Einfachbindung unter Ausbildung einer Hydroxyl- und Methylengruppe. Die elektronenziehende Hydroxylgruppe hätte einen tieffeldverschiebenden Effekt auf angrenzende Protonen im ^1H -NMR sowie auf das direkt gebundene C-Atom im ^{13}C -NMR-Spektrum.

Die naheliegende NMR-Untersuchung von **AcLys-AcA in organischem Lösungsmittel**, zeigte jedoch deutlich mehr Signalen im ^1H - als auch ^{13}C -NMR-Spektrum, die sich nicht mehr in zwei Gruppen mit bestimmbarem Verhältnis zueinander gliedern ließen (Abb. 33). Daher stellte sich die Frage, wie strukturell ähnlich die Substanzen des Produktgemischs sind.

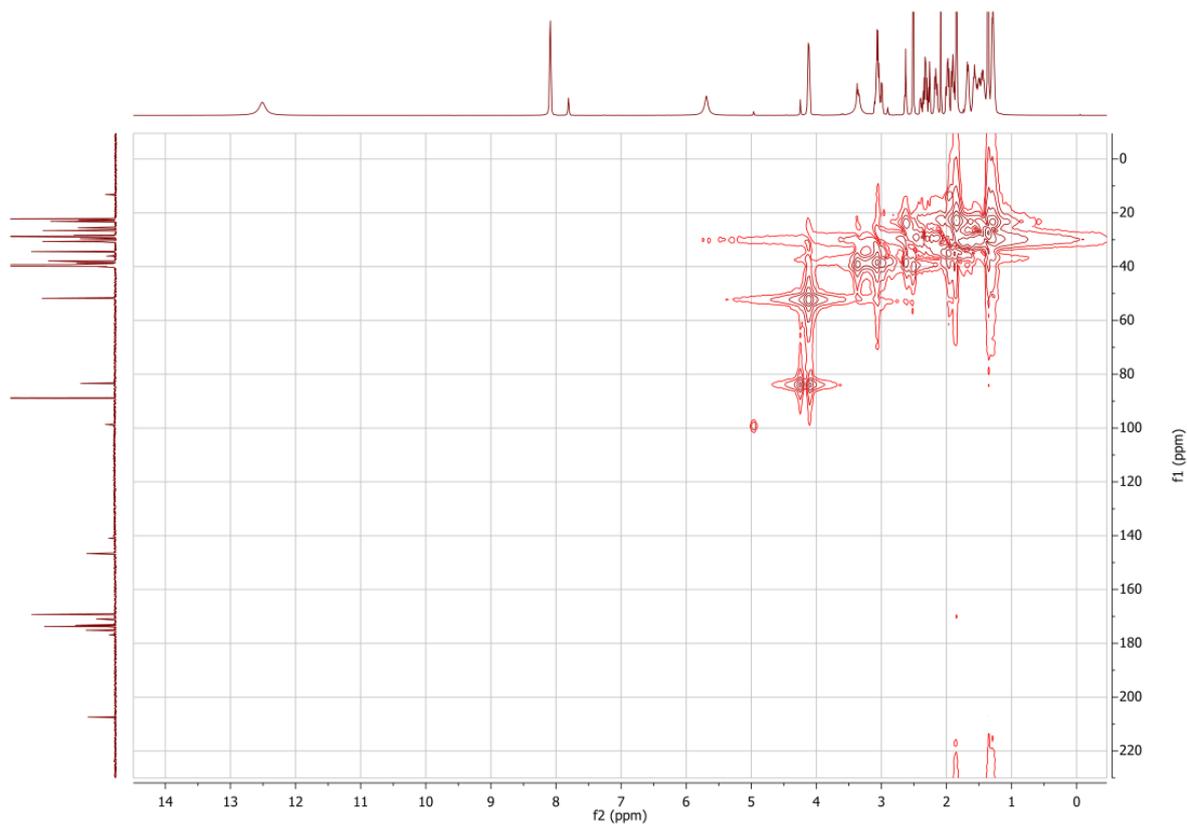
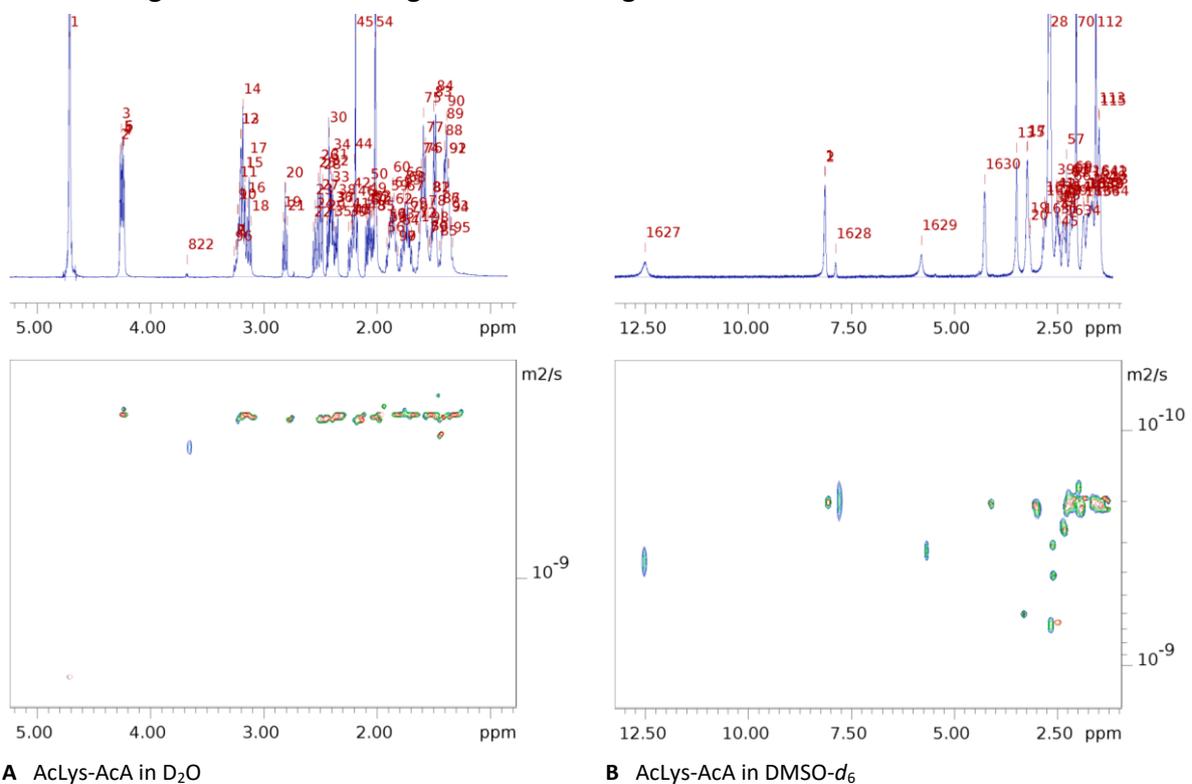


Abb. 33: HMBC-Korrelation von AcLys-AcA in DMSO- d_6 . AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin.

Via **DOSY** sollte untersucht werden, inwiefern die hypothetischen Verbindungen sich in ihrem Diffusionskoeffizienten unterscheiden. Diese 2D-Methode unterzieht die NMR-Signale einer Diffusionskodierung mittels magnetischer Feldgradienten. Schnell diffundierende Spezies weisen einen hohen Selbstdiffusionskoeffizienten auf und langsam diffundierende Spezies einen niedrigen. So kann das NMR-Spektrum entlang der zusätzlichen Dimension, der Selbstdiffusionskoeffizienten-Skala, aufgeschlüsselt werden. Signale der gleichen Substanzen besitzen den gleichen Diffusionskoeffizienten, weshalb sie auf einer horizontalen Geraden liegen. Während hier Diastereomere nicht zu unterscheiden sind, ist von unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten von z. B. einer offenkettigen Struktur im Vergleich zu einer geschlossenen Ringstruktur auszugehen. Die Vermessung von AcLys-AcA, vorgenommen von Herrn D. Bellaire (vom Lehrstuhl für Thermodynamik der TUK), ist in Abb. 34 aufgezeigt. Bei der Vermessung von AcLys-AcA in D_2O (Abb. 34, A) war durch die auf einer Gerade liegenden Signale im 2D-Spektrum zu erkennen, dass die Verbindungen sich kinetisch nicht unterscheiden. Das versetzte Signal bei $\delta = 3,8$ ppm entspricht HDO. In Teil B der Abbildung ist das DOSY-Spektrum von AcLys-AcA in DMSO- d_6 abgebildet. Bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 2,50$ ppm war das Lösungsmittel als Signal bei deutlich höherem Diffusionskoeffizienten zu erkennen. Bei der Verschiebung der nächstgelegenen Signale in den Bereich höherer Diffusionskoeffizienten, konnte ein ungenaues Fitting durch die hohe Peakdichte als Ursache nicht ausgeschlossen werden. Bei den Signalen im Bereich $\delta \approx 6$ ppm

und bei 12 ppm konnte hingegen von einer vertikalen Verschiebung aufgrund unterschiedlicher Diffusionskoeffizienten ausgegangen werden. Sie wiesen folglich auf nicht identische, bzw. strukturell variierende Moleküle hin. Da dies im Gegensatz zu den Beobachtungen in Wasser stand, stellt sich die Frage der Stabilität oder hier möglichen Umwandlung des Produkts in organischen Lösungsmitteln.



A AcLys-AcA in D_2O

B AcLys-AcA in $DMSO-d_6$

Abb. 34: DOSY-Messung von AcLys-AcA in (A) D_2O und (B) $DMSO-d_6$. Oben dargestellten Chromatogramme zeigen die Signale der 1H -NMR-Messungen von AcLys-AcA im entsprechenden Lösungsmittel (siehe Abb. 31, Abb. 33). Auftragung der chemischen Verschiebung δ [ppm] gegen die Diffusionskonstanten [m^2/s]. Die vertikalen Achsen wurde in einer Range von (a) $2,95e^{-10}$ – $2,10e^{-9}$ m^2/s dargestellt, während die horizontale Achsen (A) $0,00019$ – $7,00$ ppm, bzw. (B) $-0,504$ – $14,5$ ppm umfassen. Gefittete Funktionen sind dem elektronischen Anhang (II) zu entnehmen. Die Messung wurde von D. Bellaire am Lehrstuhl für Thermodynamik der TUK vorgenommen. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin.

Zusätzlich wurden die Signale des Hauptprodukts in organischem Lösungsmittel für strukturelle Hinweise herangezogen. Zunächst konnten im 1H -NMR-Spektrum von **AcLys-AcA in $DMSO-d_6$** die Protonen des AcLys-Gerüsts zugeordnet werden. Im Gegensatz zur Messung in D_2O waren hier austauschbare Protonen sichtbar, wozu das Proton der sekundären N_α -Gruppe (m, $\delta = 8,04$ ppm) sowie der Carboxygruppe (s, $\delta = 12,32$ ppm) zählten. Hinzu kam ein ebenfalls charakteristisch breit auslaufendes Signal bei $\delta = 5,60$ ppm (s). Die Integrale zweier, teils breiter Singulettts bei $\delta = 2,08$ ppm (0,43 H) und $\delta = 1,36$ ppm (2,56 H) entsprachen addiert einem Singulett mit drei äquivalenten Protonen bei $\delta = 1,85$ ppm. Unter der Annahme, dass die zwei kleineren Signale für zwei Formen der AcA-Strukturkomponente standen, können die drei Protonen der Acetylgruppe in AcLys als gemeinsames Signal der Formen im großen Singulett bei $\delta = 1,85$ ppm zusammenfallen. Daraufhin ließen sich die drei Multipletts bei $\delta = 1,67$, $1,53$ sowie $1,36$ ppm mit insgesamt sechs Protonen und gleichem Aufspaltungsmuster wie bisher den Protonen der β -, γ - und δ - CH_2 -Gruppen des gemeinsamen AcLys-Grundgerüsts zuordnen. Dazu gehörten auch das Quartett bei $\delta = 4,14$ ppm als das

Proton der α -CH-Gruppe sowie die zwei Protonen der ε -CH₂-Gruppe, die wieder ein leicht verschobenes Multiplett erzeugten. Nach Addition alle übrigen Multipletts im Bereich $\delta = 1,9$ – $2,6$ ppm blieben 3–4 Protonen pro AcLys-AcA-Form neben den drei äquivalenten Singulett-Protonen zur Verfügung. Auch hier war die genaue Integration aufgrund starker Überlappung und durch Nebenprodukten schwierig. Ebenso konnte im H,H-COSY ein Kopplungssystem innerhalb des AcLys-Gerüsts und innerhalb der Multipletts zwischen $\delta = 1,95$ – $2,68$ ppm beobachtet werden.

Temperaturabhängige ¹H-NMR-Messungen zeigten ein teilweise unterschiedliches Verhalten hinsichtlich Ab- oder Zunahme an Signalintensität. Dies wurde umfangreicher in MeCN-*d*₃ bei Temperatur zwischen -35 bis $+65$ °C getestet und in Abb. 35 abgebildet. Auch hier war das AcLys-Gerüst zu erkennen, wobei die drei Protonen der Acetylgruppe durch Überlappung mit dem Lösungsmittelsignal hinsichtlich ihrer Multiplizität nicht eindeutig zu bestimmen waren. Die zwei anderen intensiven Signale bei $\delta = 2,03$ ppm, ein Singulett, und $\delta = 1,35$ ppm, erneut ein Dublett, entsprachen als addierte Integrale wieder dem normierten Integralwert des stärksten Signals bei $\delta = 1,85$ ppm. Basierend auf bereits diskutierten Erkenntnissen wurde dem Multiplett bei $\delta = 4,13$ ppm mit einem Proton die α -CH-Gruppe, den Multipletts mit sechs Protonen im Bereich $\delta = 1,22$ – $1,76$ ppm die der β -, γ - und δ -CH₂-Gruppe sowie der ε -CH₂-Gruppe die Multipletts bei $\delta = 3,11$ und $3,35$ ppm (2 H) zugewiesen. Übrigen Signale waren in den Bereich vinylicher Protonen ($\delta = 6$ – $7,5$ ppm), C-O ($\delta = 4$ – $4,5$ ppm) und tieffeldverschobener CH₂-Protonen verschoben. Erstere lassen die Überlegung der Entstehung der Δ^3 - und Δ^4 -Pyrrolin-2-on-Addukte zu, wobei ihr addierter Integralwert dem Proton der α -CH-Gruppe des AcLys-Gerüsts (m, $\delta = 4,22$ ppm, 1H) entsprach und lediglich ein mögliches Produkt darstellt. Zwei ¹³C-Signale bei $\delta = 148,16$ ppm und $142,36$ ppm lassen eine solche Möglichkeit zu.

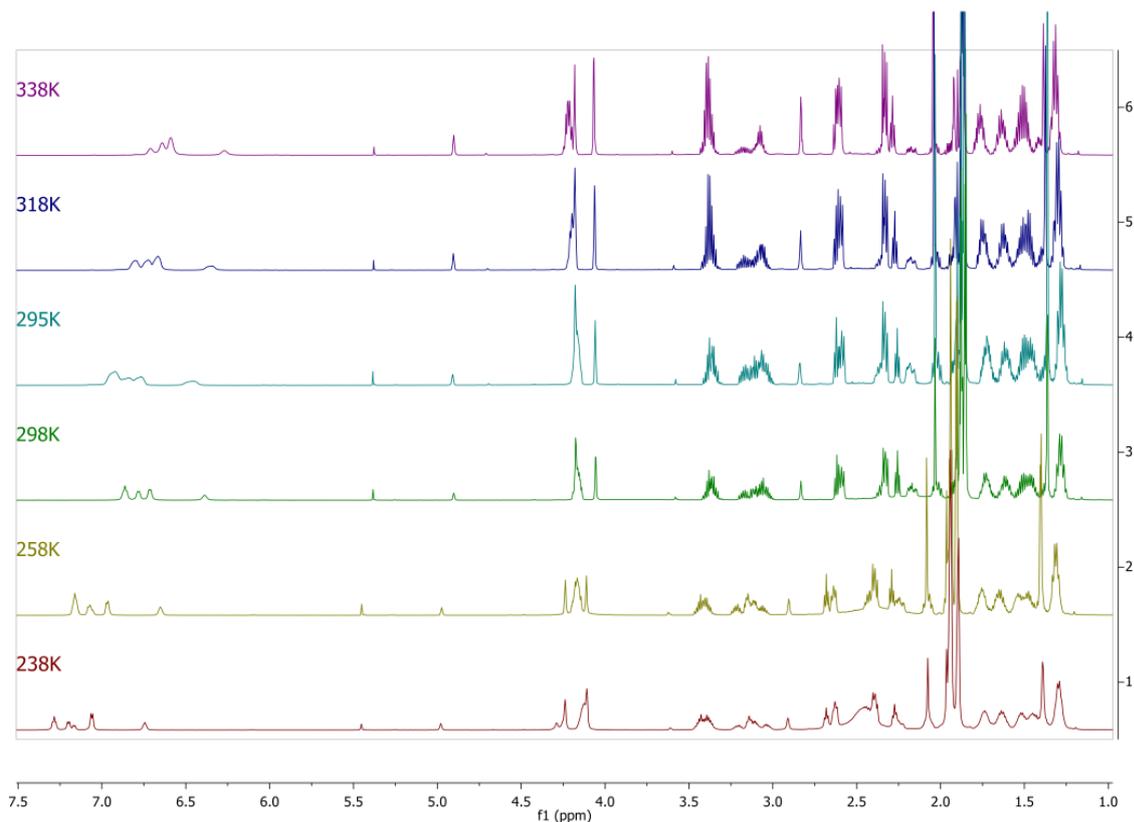


Abb. 35: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von AcLys-AcA in $\text{MeCN-}d_3$ bei -35 bis 65 °C. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin.

Für die Diskussion der **Hypothese einer Hydratisierung** von AcLys-AcA an Stelle der Doppelbindungen sind hier folgende Signale starker Intensität interessant. Besonders ausgeprägt in $\text{MeCN-}d_3$ zeigten sich im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zwei scharfe Dubletts bei 4,24 ppm und 4,12 ppm, die sich temperaturabhängig gegen das mittige Signal der α -CH-Gruppe des AcLys-Gerüsts (m , $\delta = 4,22$ ppm, 1H) verschoben (Abb. 35). Bei $T = 258$ K mit der deutlichsten Auftrennung lag das integrale Verhältnis der beiden Dubletts zum 1 H-Multipllett bei 1:1,1:4,2. Im H,H-COSY koppelten die Dubletts (3J) mit Protonen des Multiplletts der AcA-Einheit bei $\delta = 2,66$ ppm. Im HSQC wurde die direkte Bindung der Protonen der Dubletts an das C-Atom mit dem intensiven Signal der chemischen Verschiebung von 84 ppm erkannt, was die Vermutung einer (H-C-OH)-Einheit zulässt. Das breit auslaufende Singulett bei $\delta = 5,6$ ppm kann dabei das Proton einer Hydroxygruppe widerspiegeln. Das gleiche Muster an Kopplungen bzw. Verschiebungen wurde in $\text{DMSO-}d_6$ beobachtet. Jedoch kann für die verbleibenden in Summe integrierten 5–6 Protonen keine klare Aussage getroffen werden. Nach erneuter Lyophilisierung der Lösung von AcLys-AcA in $\text{MeCN-}d_3$ setzte sich ein weißer Feststoff von gelber Flüssigkeit ab. In CDCl_3 zersetzte sich die Substanz, was sich durch einen Niederschlag zeigte. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum war nicht identifizierbar. Somit konnte keine direkte Aussage getroffen werden, ob es sich bei AcLys-AcA in organischen Lösungsmitteln um eine Frage der Stabilität oder Umlagerungsprozesse handelt. Für alle folgenden Ansätze wurde AcLys-AcA in Wasser gelöst.

Die **Elementaranalyse** von AcLys-AcA sollte Aufschluss über die Summenformel und gegebenenfalls Hypothesen zu uneindeutigen NMR-Spektren ermöglichen. Nach Lyophilisierung der Probe wurde diese direkt vermessen und erwies sich als gewichtsstabil bei der Einwaage. Tab. 18 fasst die gemessenen Anteile der beteiligten Elemente zusammen und bezieht sich in der weiteren Berechnung der Soll- oder Erwartungswerte auf die Bruttoformel $C_{13}H_{20}N_2O_4$ mit dem Molekulargewicht von 268,14 g/mol. Dieses wurde aus den massenspektrometrischen Messungen von AcLys-AcA (Q1, *fullscans*, Kap. 6.5.2.3) abgeleitet. Die Probe einer separaten Synthese bestätigte das Ergebnis (dabei wurde nach Lyophilisierung auf den Ausschluss von Luft bis zur Durchführung der Elementaranalyse geachtet).

Tab. 18: Elementaranalyse und Berechnung der Summenformel von AcLys-AcA. Der Sollwert beruht auf der Annahme der Bruttosummenformel $C_{13}H_{20}N_2O_4$ mit einem Molekulargewicht von 268,14 g/mol. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin.

Element	N	C	H	O _{berechnet}
m-% theoretisch	10,44	58,19	7,51	23,86
m-% gemessen	9,66	53,85	7,82	28,67
M [amu]	14,007	12,011	1,008	15,999
n	0,69	4,48	7,76	1,79
n_normiert auf 1 N	1	6,50	11,25	2,60
n_normiert auf 2 N	2	13,00	22,50	5,20
n_Soll- (Erwartung-) Wert	2	13	20	4
n_Abweichung von Soll-Wert			2,50	1,20
n_normierter Soll-Wert			2,09	1

Die Elementarmassen von Stickstoff und Kohlenstoff entsprachen, normalisiert auf ein ganzzahliges Verhältnis, der angenommenen Bruttosummenformel. Jedoch war das nicht der Fall für Wasserstoff und dem aus der Differenz bestimmten Sauerstoffanteil. Die Abweichung der beiden Elemente ließ sich auf 2H:1O normalisieren, sodass auf ein AcLys-AcA ($C_{13}H_{20}N_2O_4$) 1,2 H₂O-Moleküle kamen. Die Tatsache, dass es sich nicht um ein Vielfaches von $C_{13}H_{20}N_2O_4$ handelt, lässt eher die Vermutung einer Wasseranlagerung zu als kovalent gebundenes nach einer Hydratation. Wobei aufgrund dieser Daten nicht festzulegen war, ob es sich um 1 AcLys-AcA + 1,2 H₂O oder AcLys-AcA-OH₂ (hydratisiert) + 0,2 H₂O handelt.

High Resolution Scans sollten daher zur Bestimmung der exakten Masse und dem Verteilungsmuster mit besonderem Bedacht auf hydratisierte Formen mit 10 bzw. 50 μ M Produkt durchgeführt werden. Im *enhanced mass spectrum* (EMS, erweitertes Massenspektrum, das einem *Fullscan* mit Ionenfalle im Q1 entspricht) wurde für AcLys-AcA das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis m/z 269,15 Da bestimmt, das mit dem Molekulargewicht von 268,1423 Da übereinstimmt. Unter Verwendung der chromatographischen Parameter der Methode II für AcLys-AcA (siehe Kap. 6.5.2.3) eluierte das Produkt nach 7,78 min als ein scharfer Peak. Für eine bessere Auflösung im Bereich um ± 15 Da wurde via *enhanced resolution* (ER)-Scan (Abb. 36, B) die exakte Masse bestätigt und die charakteristischen zwei Peaks im Verhältnis 1:10 bestimmt. Die Fragmentierungsmuster aus Abb. 29 wurden im

enhanced product ion (EPI)-Scan ausgehend von m/z 269 sowie weiterführend im MS³-Scan (m/z 269/164 sowie 269/181) bestätigt (Abb. 36, A). Im nächsten Schritt wurde gezielt nach hydratisierten Verbindungen mit einer Massenzunahme von + 18 Da ausgewertet. Es wurde jedoch kein Molekülion mit m/z 287, welches AcLys-AcA-OH₂ entspräche, unter Variation der *collision energy* (CE 10–50) detektiert. Allerdings wurde bei gleicher Retentionszeit ($R_t = 7,77$ min) bei variiertener Kollisionsenergie das Auftreten von m/z 291 beobachtet. Im EPI-Scan von m/z 291,1 (CE 10, CES 20) wurden als Hauptfragmente m/z 273,0 und m/z 203,1 detektiert. Die Subtraktion von 21,98 Da von den Fragmenten entspricht rechnerisch mit m/z 251, bzw. m/z 181 den zwei intensivsten m/z Fragmenten ausgehend von m/z 269, der erwarteten Molekülmasse von AcLys-AcA. Dies lässt vermuten, dass es sich bei dem Ion mit dem m/z von 291, um ein Natrium-Cluster von AcLys-AcA handelte.

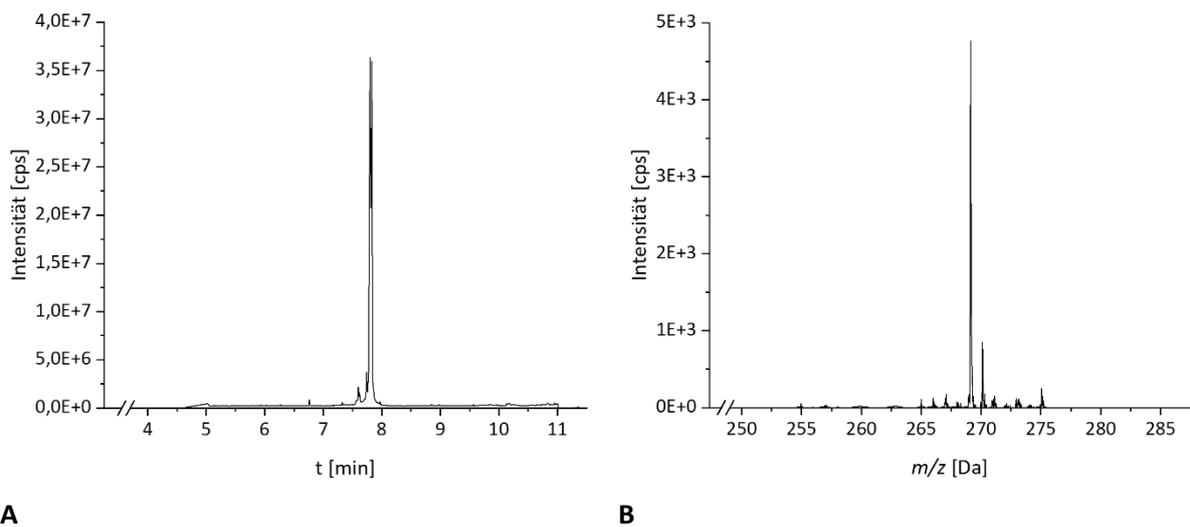


Abb. 36: *High resolution scans* von AcLys-AcA (10 μ M) via HPLC-ESI⁺-MS/MS. (A) EPI-Scan. (B) *Enhanced resolution scan*. Messungsmethodik siehe Kap. 6.5.2.3 (basierend auf Methode II). AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_{α} -Acetyl-L-Lysin, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis, EPI: *enhanced product ion*.

Zur weiteren Untersuchung der Stabilität wurde von **AcLys-AcA Stammlösungen in MeCN und H₂O** angesetzt, um anschließend auf jeweils 50 % MeCN verdünnt (Methode I, MRM-Modus, Kap. 6.5.2.3) deren Gehalte zu bestimmen. Über die getesteten Konzentrationen von 0,01 / 0,1 / 1 / 10 μ M zeigte sich in beiden Fällen ein linearer Zusammenhang (je $R^2 = 1$), jedoch wurde aus der Stammlösung in MeCN konstant nur 57 ± 2 % im Vergleich zum Ansatz in Wasser (100 %) detektiert (als AUC). Das untermauert die Hypothese, dass AcLys-AcA in reinem MeCN gelöst entweder instabil ist, umlagert oder sich Nebenprodukte bilden könnten.

Im Folgenden soll die komplexe Charakterisierung des Reaktionsprodukts von AcLys mit AcA in ihrer **Problematik zusammengefasst** und der Konsequenz hin bewertet werden.

Ravindranath und Boyd (1985) postulierten die Reaktion von AcA mit Lys via nukleophiler Addition einer primären Aminogruppe an die Aldehydgruppe. Von der ebenfalls α,β -ungesättigten Carbonylverbindung BDA war die Reaktion mit AcLys zu den Δ^3 -, bzw. Δ^4 -Isomeren Pyrrolin-2-on bekannt. Δ^3 -Pyrrolin-2-on wurde in dieser Arbeit synthetisiert und

charakterisiert. Als hypothetischer Mechanismus wurden die Schritte des nukleophilen Angriffs der primären α -NH₂-Gruppe von AcLys auf die Aldehydgruppe, Zyklisierung, Dehydratisierung und schließlich tautomere Umlagerung zum entsprechenden Laktam beschrieben (Abb. 28).

Die ersten massenspektrometrischen Untersuchungen des Syntheseprodukts von AcLys mit AcA ließen eine Reaktion der ϵ -Aminogruppe des AcLys mit einer Carbonylgruppe von AcA unter anschließendem Ringschluss und Wasserabspaltung vermuten. Dies war im Einklang mit Hypothesen aus Referenzliteratur, dass AcA in der vergleichbarer Weise wie BDA reagierte. Die Massendifferenz zwischen den Molekülen als auch Fragmenten von AcLys-AcA und AcLys-BDA betrug 15 Da, was der Masse einer Methylgruppe entspricht. Auch die Intensitäten der Fragmente, die sich im Verhältnis der Massenübergänge widerspiegelten, stimmten überein.

Im ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von AcLys-AcA in D₂O wurde unterstützt durch H,H-COSY-, HSQC- und HMBC-Messungen das AcLys-Gerüst bestätigt und die übrigen Signale als zwei unterschiedliche Strukturformeln bewertet. Naheliegender war auch hier die Ausbildung einer pyrrolinischen Struktur mit einer Keto-, bzw. Methylgruppe nächstliegend zum im Ring integrierten N ϵ von AcLys. Jedoch konnten weder im ¹H- noch ¹³C-NMR vinylische Signale erfasst werden, die charakteristisch für die Doppelbindung im pyrrolinischen Ring (wie bei AcLys-BDA) wären. Mit 3–4 Protonen, die tieffeldverschoben bei $\delta = 2,0$ – $2,8$ ppm lagen, konnte die postulierte Struktur nicht zugeordnet werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch Hydratisierung mit D₂O (oder vorheriger H₂O-Anlagerung und anschließendem H/D-Austausch) die austauschbaren Protonen in D₂O nicht sichtbar waren. Wurde das Produkt jedoch in organischen Lösungsmitteln, DMSO-*d*₆ oder MeCN-*d*₃, gelöst, wurde ein breites Produktspektrum via ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum beobachtet, welches nicht mehr in zwei bestimmte Hauptverbindungen aufgeteilt werden konnte. In CDCl₃ war das Produkt instabil, sodass keines der Signale zuordenbar war. In DMSO-*d*₆ wie auch MeCN-*d*₃ wurde das Grundgerüst von AcLys identifiziert und zu den in D₂O bekannten Multipletts der aus AcA stammenden Protonen vinyl sowie [HC-O(H)]-charakteristische ¹H- sowie ¹³C-Signale beschrieben.

Via DOSY wurde über die Diffusionskoeffizienten der ¹H-Signale zugrundeliegenden Protonen gezeigt, dass falls in D₂O mehrere Verbindungen vorliegen sollten, diese strukturell sehr ähnlich sind (wie z.B. es der Fall für Isomere ist). Dahingegen wurde für das Produkt in DMSO-*d*₆ unterschiedliche Diffusionskoeffizienten aufgezeigt, die die Entstehung von strukturell unterschiedlicheren Nebenprodukten untermauern. Dabei ist eine gewisse Instabilität in den verwendeten organischen Lösemitteln nicht auszuschließen. Im Gegensatz zu Wasser brachte die erneute Lyophilisierung des Produkts in MeCN die Bildung einer gelben, öligen Flüssigkeit mit sich. Auch bei massenspektrometrischen Untersuchungen zeigte sich bei Stammlösungen in reinem MeCN eine einheitliche Abnahme der Konzentration im Vergleich zu Ansätzen des Standard in Wasser.

Die anschließende Elementaranalyse ließ unter der Annahme der Bruttosummenformel und molaren Masse aus den massenspektrometrischen Messungen für AcLys-AcA und H₂O ein normiertes Verhältnis von 1:1,2 ableiten.

In *High Resolution Scans* wurde die exakte Masse von AcLys-AcA sowie dessen Fragmentierung geprüft und gezielt nach hydratisierten Formen ausgewertet. Eine einfache Hydratisierung mit einer zusätzlichen Masse von 18 Da wurde nicht erfasst. Das schließt die Hypothese nicht aus, dass Wasser an AcLys-AcA anlagerte. So wäre das Produkt massenspektrometrisch als freies AcLys-AcA detektierbar und gleichzeitig die NMR-Signale am pyrrolischen Ring des Addukts überlagert. Die in der Elementaranalyse nicht äquimolar vorliegende Menge an Wasser zu AcLys-AcA spricht daher eher für eine Anlagerung.

Für eine definitive Aussage sind **weitere Untersuchungen** notwendig. Um eine mögliche Hydroxylierung zu prüfen, könnte die saure Hydrolyse von DHDMMF mit Zugabe an AcLys in Methanol (statt Wasser) durchgeführt werden. An die Stelle der potentiellen Hydroxygruppen würden Methoxygruppen treten, die in D₂O als scharfe Singulets (bei $\delta \approx 3,3$ ppm) sichtbar wären. Jedoch sollte hier vorher die Stabilität in Methanol als weiteres organisches Lösungsmittel getestet werden. Für eine sichere Strukturaufklärung ist die Bestimmung der Kristallstruktur zu wählen. Auch hier muss jedoch die Stabilität, etwaige Umlagerung zu vielfältigen Nebenprodukten oder ein mögliches Gleichgewicht bedacht werden.

Als **Konsequenz** wurden alle Ansätze für weitere Versuche mit AcLys-AcA in Wasser durchgeführt, wo sich die Signale der NMR- und MS-Messungen als stabil erwiesen. So konnte trotz der problematischen Strukturaufklärung via NMR die massenspektrometrische Bestimmung des Reaktionsprodukts von AcLys und AcA erfolgen. Dazu wurden im folgenden Kapitel sensitive (U)HPLC-MS/MS-Methoden entwickelt, um die Reaktion von AcLys mit AcA im Anschluss weiter zu charakterisieren und das Produkt in unterschiedlichen Proben zu quantifizieren.

4.2.2.2.3 Quantifizierung von AcLys-AcA

Zur Quantifizierung von AcLys-AcA wurden (U)HPLC-MS/MS-Methoden etabliert.

Im Rahmen der Charakterisierung erwiesen sich AcLys-AcA und AcLys-BDA strukturell ähnlich im Bezug auf ihre massenspektrometrische Fragmentierung und ihre chromatographischen Eigenschaften. Bei der Testung verschiedener Fließmittel mit Zusätzen, LC-Säulen und Geräten eluierten sie in kurzem Abstand von ca. 0,04 min. Dabei kam es zur Überlappung der Peakflächen, jedoch wurde keine Ionensuppression im Zuge der massenspektrometrischen Bestimmung beobachtet. Dies ermöglichte die Verwendung von AcLys-BDA als interner Standard für AcLys-AcA in kontrollierten Modellsystemen. Damit sind im Rahmen der *in chemico* oder *in vitro* Versuche, hier Mikrosomen- und pRH-Inkubationen gemeint, bei denen alle Bedingungen und Zusätze geregelt waren. Im Gegensatz dazu wäre AcLys-BDA nicht als

interner Standard für Studien geeignet, in denen die Exposition von Furan, insbesondere eine unbestimmte Zufuhr, anzunehmen ist. Hier könnte BDA als bekannter Metabolit von Furan gebildet werden und mit AcLys (natürlich vorkommend oder als Abbauprodukt entstehend) die Konzentration des internen Standards beeinflussen. Das ist vor allem für Humanstudien der Fall, da hier in Abhängigkeit des Lebensstils von einer schwankenden Belastung mit Furan als Kontaminante in Lebensmitteln, Genussmitteln und der Umwelt auszugehen ist. Das Vorkommen von Furan-Vorläufern, andere BDA-Quellen oder weiteren Entstehungsmöglichkeiten von AcLys-BDA macht in solchen komplexen Systemen den isopenmarkierten Standard von AcLys-AcA essentiell. Das ist hier nicht der Fall und wurde stets mit Negativkontrollen sichergestellt.

Für die Detektion von AcLys-AcA wurden zwei Methoden entwickelt, welche unterschiedliche Fragestellungen beantworten sollten. Methode (I) wurde am LC-MS/MS-System 3200 entwickelt und diente zunächst der Charakterisierung der Reaktion von AcA mit AcLys (Kap. 4.2.2.3). Im Folgenden wurde die Bestimmung AcLys-AcA im Rahmen der Untersuchungen zur metabolischen Aktivierung von MF zu AcA eingesetzt (Kap. 4.3). Da AcA aufgrund seiner Reaktivität und molekularen Eigenschaften nicht direkt bestimmt werden konnte, wurde AcLys als Abfangreagenz genutzt. Methode (I) kam zunächst auch für die Detektion des Addukts AcLys-AcA in Zellüberständen *in vitro* (Kap. 4.4.2) zum Einsatz. Jedoch konnten die niedrigsten Konzentrationen der MF- und AcA-Inkubationen nicht mehr quantitativ bestimmt werden. Daher war eine sensitivere Methode für entscheidende Aussagen unerlässlich. So wurde Methode (II) an LC-MS/MS-System 5500 entwickelt und ermöglichte die quantitative Bestimmung von AcLys-AcA in allen *in-vitro*-Proben.

4.2.2.3 Reaktivität von AcA gegenüber AcLys und AcCys *in chemico*

Nach der qualitativen Beschreibung der Aminosäure-Addukte von AcA sollte die Reaktionsverlauf von AcA mit AcCys und AcLys mit den etablierten sensitiven MRM-Methoden charakterisiert werden. Dabei lag der Fokus auf den Bedingungen zweier Hauptfragestellungen dieser Arbeit:

- a) Es musste ein Abfangreagenz für AcA in enzymatischen Reaktionen gefunden werden, um die metabolische Aktivierung von MF zu AcA zu erfassen. Zum einen war eine direkte Detektion von AcA in relevanten Konzentrationen nicht möglich. Zum anderen sollte durch Angebot eines Abfangreagenzes AcA vom Enzym verdrängt werden. Als solches Suizidsubstrat beschrieben bereits Ravindranath und Boyd (1985) die verminderte Bindung von AcA an Mikrosomen durch Zugabe von Aminosäuren.
- b) Es sollte die Bildung von AcLys-AcA und AcCys-AcA in Zellüberständen von pRH untersucht werden. *In vitro* wurden die Zellen mit MF oder AcA inkubiert, jedoch ohne Zugabe eines Abfangreagenzes.

Die Untersuchung der Reaktivität von AcA mit den Reaktanten AcLys und AcCys basierte auf den Bedingungen der Mikrosomeninkubationen (siehe Experimenterteil Kap. 6.6). Es wurde nach Zugabe von isoliertem AcA zu einem Reaktanten in verschiedenen Matrices die Adduktbildung zu AcLy-AcA bzw. AcCys-AcA erfasst.

Für AcLys als auch AcCys wurde die konzentrations- aber nicht zeitabhängige Bildung der Addukte mit AcA beobachtet. Wie Abb. 37 (A) zeigt lag das Adduktlevel bereits nach weniger als einer Minute im Bereich, der über 24 h erfasst wurde, womit sich beide Aminosäure-Derivate als potentielle Abfangreagenzien eigneten. Die ersten Reaktionsversuche wurden in Wasser durchgeführt, wohingegen in Ethanol die Intensität nur noch 6 % der AUC in Wasser entsprach (Kap.6.5.2.2, *Fullscan* und MRM-Modus). In den polar-aprotischen Lösungsmitteln MeCN und DMSO konnten maximal Spuren (< LOQ, LOD) detektiert werden. Die Zugabe von Säure, bzw. Base zum Ansatz bei pH 5, 7,4 und 9 erbrachte keine relevanten Unterschiede (Abb. 37, B). Die geringe Konzentrationswahl der Säure, bzw. Base wurde zur Untersuchung geringer pH-Abweichungen in Folgeversuchen gewählt.

Im Gegensatz dazu zeigte sich ein entscheidender Einfluss der Pufferwahl. Gemäß der Durchführungsbestimmung der Mikrosomen- und Supersomes-Inkubationen wurde K_2HPO_4 (50 mM) als primärer Puffer getestet. Für die Inkubation zweier SupersomesTM war Tris-HCl-Puffer (50 mM) vorgesehen, da hier eine gewisse Inhibition durch Phosphat bekannt war (gemäß Protokoll des Herstellers). Unabhängig vom enzymatischen Einsatz wurde beobachtet, dass in K_2HPO_4 -Puffer im Gegensatz zum Reaktionsansatz mit AcLys und AcA keine Addukte von AcA mit AcCys detektierbar waren. Das Phänomen wurde bereits bei der Reaktion von BDA mit AcLys, bzw. AcCys in wässriger Kaliumphosphatlösung beschrieben (Chen *et al.*, 1997). In Tris-HCl war demgegenüber die Reaktion von AcCys mit AcA nachweisbar. Um den für die enzymatischen Reaktionen bevorzugten K_2HPO_4 -Puffer nutzen zu können, wurde AcLys als Abfangreagenz gewählt.

Abgefangen wurden im mikrosomalen System etwa 33 % des zugegebenen AcA durch AcLys (Abb. 37 C). Ein Anhaltspunkt für die unvollständige Umsetzung von AcA bot dessen Verhalten in Wasser. Wie in Kap. 4.2.1.2 und Abb. 18 verdeutlicht, kam es in reinem Wasser zur Zyklisierung von *cis*-AcA zu *cis*-AcA-OH₂ sowie einer zeitabhängigen Umlagerung zu *trans*-AcA, welches wiederum zu *trans*-AcA-OH₂ in wässrigem Milieu hydratisiert wurde. Die dennoch über die Zeit konstanten Adduktlevel ließen auf ein sich schnell einstellendes Gleichgewicht schließen und ermöglichen eine zeitabhängige Erfassung von AcA aus der enzymatischen Bildung. Auf die Wiederfindungen sowie Reaktionskontrollen wird im experimentellen Teil (Kap. 6.5.2, 6.6, 6.7, 6.8.5) eingegangen.

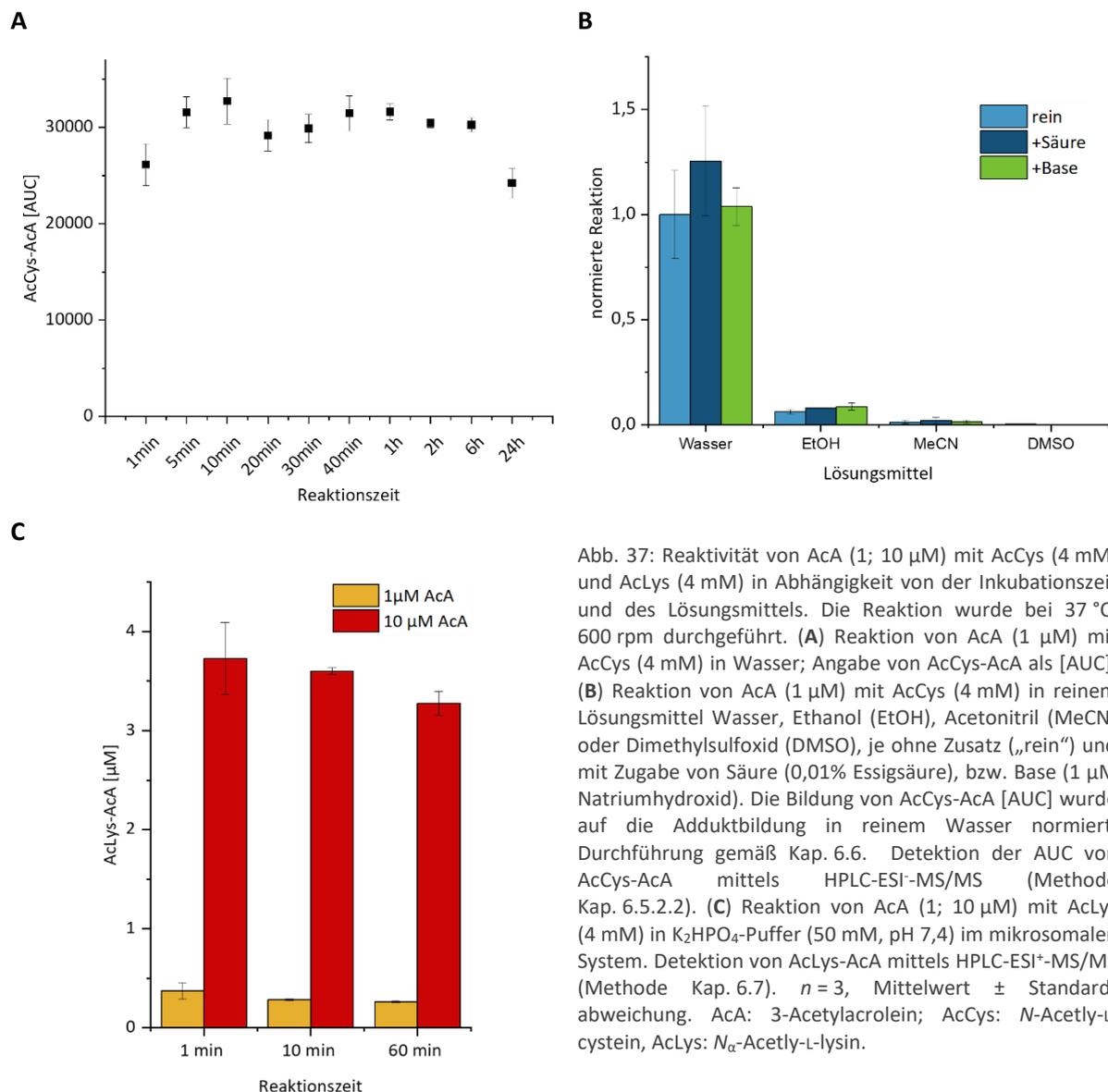


Abb. 37: Reaktivität von AcA (1; 10 μM) mit AcCys (4 mM) und AcLys (4 mM) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und des Lösungsmittels. Die Reaktion wurde bei 37 $^{\circ}\text{C}$, 600 rpm durchgeführt. (A) Reaktion von AcA (1 μM) mit AcCys (4 mM) in Wasser; Angabe von AcCys-AcA als [AUC]. (B) Reaktion von AcA (1 μM) mit AcCys (4 mM) in reinem Lösungsmittel Wasser, Ethanol (EtOH), Acetonitril (MeCN) oder Dimethylsulfoxid (DMSO), je ohne Zusatz („rein“) und mit Zugabe von Säure (0,01% Essigsäure), bzw. Base (1 μM Natriumhydroxid). Die Bildung von AcCys-AcA [AUC] wurde auf die Adduktbildung in reinem Wasser normiert. Durchführung gemäß Kap. 6.6. Detektion der AUC von AcCys-AcA mittels HPLC-ESI-MS/MS (Methode Kap. 6.5.2.2). (C) Reaktion von AcA (1; 10 μM) mit AcLys (4 mM) in K_2HPO_4 -Puffer (50 mM, pH 7,4) im mikrosomalen System. Detektion von AcLys-AcA mittels HPLC-ESI-MS/MS (Methode Kap. 6.7). $n = 3$, Mittelwert \pm Standardabweichung. AcA: 3-Acetylacrolein; AcCys: *N*-Acetyl-L-cystein, AcLys: *N* $_{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin.

Fazit zur Synthese, Charakterisierung und Bildung der Aminosäure-Addukte von AcA

AcA zeigte sich *in chemico* hoch reaktiv gegenüber AcLys und AcCys, was die Ergebnisse von MF *in silico* bestätigte. Für die Bildung der Addukte AcCys-AcA sowie AcLys-AcA wurde ein nukleophiler Angriff der Sulfhydryl- bzw. Aminogruppe, gefolgt von einem Ringschluss mit Dehydratation postuliert. Im Falle des Addukts AcCys-AcA war eine 2-Methylfuranosylgruppe als Thioether an AcCys gebunden. Die Charakterisierung von AcLys-AcA war komplexer, aufgrund von Umlagerungen bzw. Instabilität in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Auch unter Einbezug der Synthese von AcLys-BDA zum direkten Vergleich wiesen die Daten auf die Entstehung einer isomeren, pyrrolischen Struktur hin. Für beide Aminosäure-Addukte von AcA konnten sensitive (U)HPLC-ESI $^{+/-}$ -MS/MS-Methoden zur quantitativen Bestimmung etabliert werden. Diese wurden genutzt, um die Bildung der Addukte zu untersuchen. Dabei wurden gezielt Bedingungen, wie Puffersysteme, der folgenden Untersuchungen gewählt wurden. AcLys und AcCys reagierten sofort (< 1 min) mit AcA, sodass eine konzentrationsabhängige, aber keine zeitabhängigen Bildung von AcCys-AcA und AcLys-AcA beobachtet wurde.

4.2.3 DNA-Addukte von AcA *in chemico*

Zu Beginn wurde die Reaktivität von AcA mit den Nucleosiden dA, dG, dC und dT in Vorversuchen untersucht, welche mit etablierten Methoden anschließend verifiziert wurden. Dabei ergab sich kein qualitativer Unterschied, ob AcA aus der sauren Hydrolyse freigesetzt oder als synthetisiertes AcA zugesetzt wurde. Während AcA mit den ersten drei Nucleosiden reagierte, konnte keine Reaktion bei der Inkubation mit dT mittels HPLC-UV/Vs oder -MS/MS detektiert werden. Ebenso ließ die Inkubation von MF mit den Nucleosiden keine Adduktbildung in Vorversuchen nachweisen. Die Addukte von AcA mit dA, dG und dC wurden synthetisiert und charakterisiert.

Es wurde eine sensitive UHPLC-MS/MS-Methoden zur gemeinsamen Bestimmung der drei Addukte entwickelt. Zudem wurde in Vorversuchen die enzymatische Hydrolyse als geeignet verifiziert, diese Nucleosid-Addukte aus isolierter DNA freizusetzen. So konnte im nächsten Schritt die Reaktivität von AcA gegenüber isolierter DNA zeit- und dosisabhängig analytisch charakterisiert werden. Ziel war hier über das qualitative sowie quantitative Vorkommen der drei Addukte, die Reaktivität von AcA gegenüber doppelsträngiger (isolierter) DNA und die Verteilung der Addukte zu prüfen. So wurde der Gehalt auch als Addukte pro 10^8 Nucleoside angegeben. Dazu war es notwendig, die Hydrolyserate der DNA über den Gehalt an dG zu bestimmen. Da die Methodik nach Stegmüller *et al.* (2018) durchgeführt wurde und somit keine eigenständige Etablierung darstellt, sind alle weiteren, methodische Angaben im experimentellen Teil (Kap. 6.5.2.5) hinterlegt.

4.2.3.1 Das Addukt dC-AcA

Für die **Synthese** von dC-AcA wurde DHMMF sauer hydrolysiert unter Zugabe von dC. Das Synthesegemisch zeigte im massenspektrometrischen *Fullscan* (Q1) neben dem Moleküllion mit m/z 308, in geringen Spuren m/z 326. Die Massendifferenz von 18 Da lässt die hydratisierte Vorstufe wie in Abb. 41 postuliert annehmen, wie sie für 4-Oxo-2-Alkenal-Addukte beschrieben wurde (Kawai *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 1996). Eine zusätzliche Ansäuerung stellte sicher, dass es zur vollständigen Dehydratisierung, dargestellt als letzter Schritt in Abb. 41, kam. Das ebenfalls via UV/Vis als ein Signal erscheinende Produkt wurde semipräparativ aufgereinigt und lyophilisiert. Es wurde eine Reinheit von 99 % bestimmt über das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum berechnet.

Im **UV/Vis**-Spektrum absorbierte die Substanz in reinem Wasser maximal bei $\lambda_{\text{max}} = 276$ nm, wobei ein zweites, weniger intensive Maximum bei 217 nm beobachtet wurde (NanoDropTM). Es lag im Bereich der im Weiteren referenzierten Literatur mit Absorptionsmaxima bei λ_{max} (pH 7,0) 278 nm ($\epsilon = 11900$), UV λ_{max} (pH 2,0) 296 nm ($\epsilon = 11700$) (Rentel *et al.*, 2005).

Die Signale des ^1H - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrums von dC-AcA (Abb. 38) sind in Tab. 19 den publizierten Werten von Rentel *et al.* (2005) gegenübergestellt und wie in Abb. 39 dargestellt den Strukturkomponenten zugeordnet.

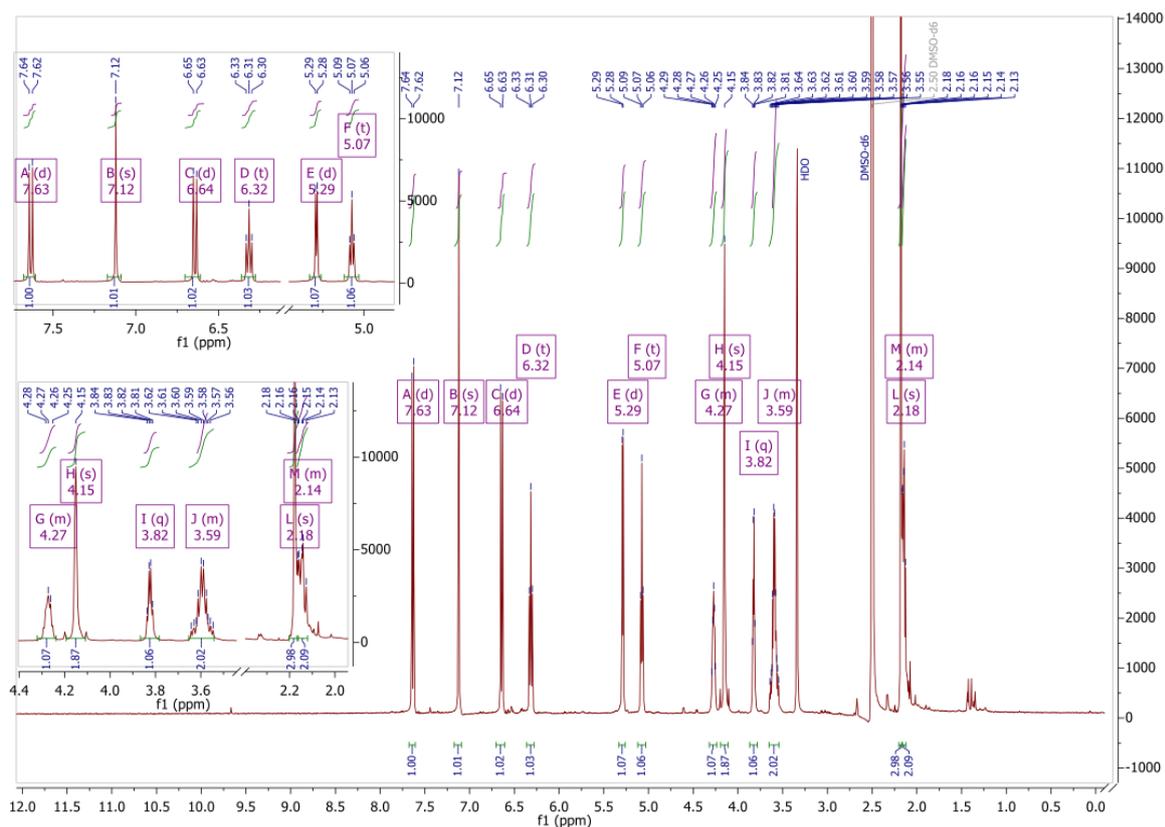


Abb. 38: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz) von dC-AcA in $\text{DMSO-}d_6$. Die Zuordnung der Signale ist in Tab. 19 gezeigt. AcA: 3-Acetylacrolein, dC: 2'-Desoxycytosin.

Tab. 19: $^1\text{H-}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ -Signale von dC-AcA aus der Synthese im Vergleich zu Literaturdaten. Eigene Synthese in $\text{DMSO-}d_6$ mit $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) und $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz), Referenzliteratur in $\text{DMSO-}d_6$ (Rentel *et al.*, 2005). AcA: 3-Acetylacrolein, dC: 2'-Desoxycytosin.

Signal	$^1\text{H-NMR}$				$^{13}\text{C-NMR}$						
	f	δ [ppm]	m	J [Hz]	f	δ [ppm]	M	J [Hz]	Signal	δ [ppm]	Ref. δ [ppm]
A	1 H	7,63	d	8,0	1 H	7,63	D	8,0	a	204,46	204,2
B	1 H	7,12	s		1 H	7,12	S		b	146,88	146,8
C	1 H	6,64	d	8,0	1 H	6,64	D	7,9	c	145,22	145,1
D	1 H	6,32	t	6,8	1 H	6,31	T	6,7	d	132,68	132,6
E	1 H	5,29	d	4,2	1 H	5,28	D	4,2	e	127,92	127,8
F	1 H	5,07	t	5,1	1 H	5,06	T	5,2	f	123,09	123,0
G	1 H	4,27	m		1 H	4,27	M		g	98,94	98,8
H	2 H	4,16	s		2 H	4,15	S		h	87,71	87,6
I	1 H	3,84	q	3,5	1 H	3,83	M		i	84,80	84,7
J	2 H	3,60	m		2 H	3,60	M		j	70,45	70,3
K	3 H	2,19	s		5 H	2,14	M		k	61,31	61,2
L	2 H	2,14	m						l	40,14	40,0
									m	39,83	39,7
									n	29,37	29,2

Zum Vergleich wies das Edukt dC folgende Signale im $^1\text{H-NMR}$ auf: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.78 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J = 27.1$ Hz, 2H), 6.15 (t, $J = 6,6$ Hz, 1H), 5.71 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 5.20 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 4.97 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.22 – 4.13 (m, 1H), 3.75 (q, $J = 3.7$ Hz, 1H), 3.62 – 3.46 (m, $J = 5.0$ Hz, 2H), 2.14 – 2.04 (m, 1H), 1.92 (p, $J = 13.3, 6.2$ Hz, 1H).

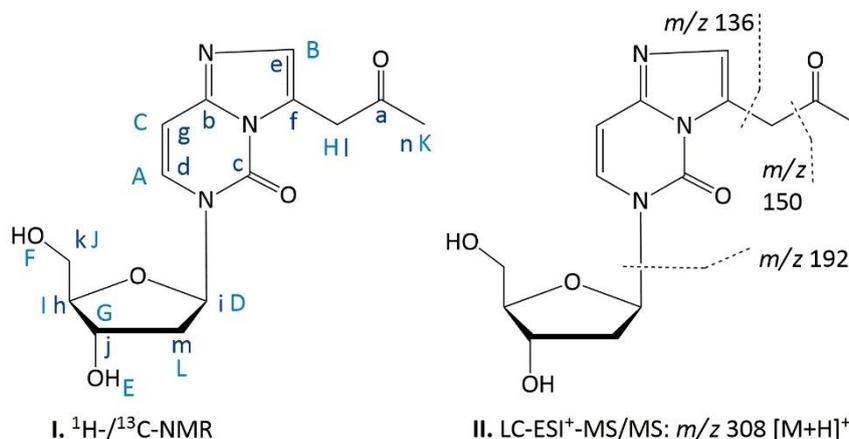


Abb. 39: Identifizierung von dC-AcA. I.) Signalzuordnung aus $^1\text{H-}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren gemäß der Signale in Tab. 19. II.) Fragmentierungsmuster aus LC-ESI⁺-MS/MS-Messungen. AcA: 3-Acetylacrolein, dC: 2'-Desoxycytosin, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Aufgrund der eindeutigen Übereinstimmung und Zuordenbarkeit wird im Folgenden lediglich auf die charakteristischen, bzw. strukturentscheidenden Signale eingegangen. Im $^1\text{H-NMR}$ wurde dem 2'-Desoxyribose-Gerüst des Produkts in $\text{DMSO-}d_6$ die Signale D, E, F, G, I, J und L zugeordnet, wobei die Signale E sowie F als austauschbare Protonen der Hydroxylgruppen in Messungen mit D_2O verschwanden. Die Protonen an Position 5 und 6 des Pyrimidinrings lagen ihrem vinylichen Charakter entsprechend bei $\delta = 6,64$ ppm und $7,63$ ppm (Signal C, A) und koppelten mit $^3J_{A,C} = 8,0$ Hz. Dem addierten AcA wurden die drei Signale B, H und K zugewiesen mit letzterem als isolierte Methylgruppe (s, 3 H, $\delta = 2,19$ ppm). Das Signale B als einprotoniges Singulett im Bereich aromatischer Verschiebung sprach für die Ausbildung einer Doppelbindung und somit den erfolgreichen Ausschluss des Vorliegens der hydratisierten Version. Die Vorstufe (Abb. 41) wurde bereits für Strukturanaloga nachgewiesen, allerdings als nicht stabil (über Δt , bei Raumtemperatur) beschrieben (Liu *et al.*, 1996; Kawai *et al.*, 2004). Da hier das letztendliche Ziel war, die Adduktbildung als ein Produkt zu quantifizieren, wurde durch Zugabe von Säure das Gleichgewicht in Richtung des stabilen, dehydratisierten Produkts dC-AcA gedrängt. Dass das Addukt einen 5-Ring bildete, wurde in Kombination mit H_B durch das Erscheinen des zweiprotonigen Signals H als Singulett im $^1\text{H-NMR}$ bestätigt. Durch seine strukturelle Lokalisation als allylische Protonen mit angrenzender Carbonyleinheit (der Acetylgruppe) war das Signal tieffeldverschoben. Auch die Signale des $^{13}\text{C-NMR}$ s konnten gemäß Tab. 19 und Abb. 39 zugeordnet werden.

Massenspektrometrisch konnte die Struktur eines heterozyklischen 5-Rings an dC mit aromatischem Charakter bestätigt werden. Via ESI⁺-MS/MS wurde im *Fullscan* das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von m/z 308,2 ermittelt, die dem Molekülion von dC plus AcA minus H₂O entsprach. Im Produktionenscan (MS², Abb. 40) war das dominanteste Fragment mit m/z 192 der typischen Abspaltung der Desoxyribose zugeordnet. Die ebenfalls prägnante Abspaltung des Acetyl- als auch Isopropenyloxyl-Rests, die zu den Fragmenten mit m/z 150, bzw. 136 führten, untermauerten die Bildung des exozyklischen Pyrazols. Rentel *et al.* (2005) detektierten mittels hochauflösender MS das natriumaddierte Molekülion mit m/z 330,1061 [M+Na]⁺, welches das hier bestimmte Molekülion mit m/z 308,2 Da bestätigte (unter Abzug der Masse von Natrium mit 23 Da).

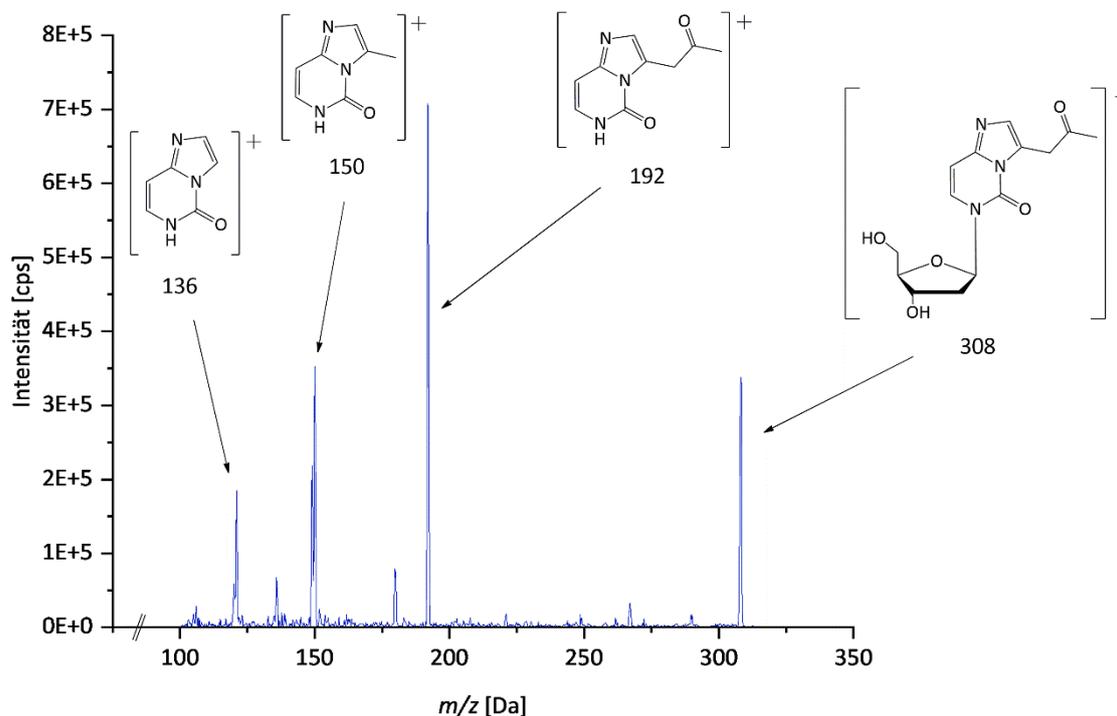


Abb. 40: HPLC-ESI⁺-MS²-Spektrum von dC-AcA mit postulierten, charakteristischen Fragmentstrukturen. AcA: Acetylacrolein, dC: 2'-Desoxycytidin, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Der potentielle **Bildungsmechanismus**, dargestellt in Abb. 41, basierte auf der Überlegungen von Kawai *et al.* (2004), die die Reaktion von 4-Oxo-2-alkenalen mit dC und dG untersuchten. Initiiert durch den nukleophilen Angriff der exozyklischen Aminogruppe von dC an die Aldehydfunktion von AcA, kann es durch einen zweiten Angriff diesmal des endozyklischen Stickstoffs zur Zyklisierung kommen. Die Michael-Addition an das zweite elektrophile Zentrum von AcA, das sp²-hybridisierte C²-Atom, führt zum Halbaminal. Für dG-AcA und dG-BDA wurde die Zwischenstufe bereits isoliert (Liu *et al.*, 1996; Byrns *et al.*, 2002). Durch Dehydratisierung kann folglich ein an die Pyrimidineinheit kondensierter Pyrazolring mit Isopropenyloxyl-Substituenten entstehen. Nicht auszuschließen ist, dass zuerst der nukleophile Angriff des endozyklischen N³ von dC via Michael-Addition an C² von AcA erfolgt, bevor die exozyklische Aminogruppe von dC an die Aldehydgruppe der AcA-Komponente kondensiert.

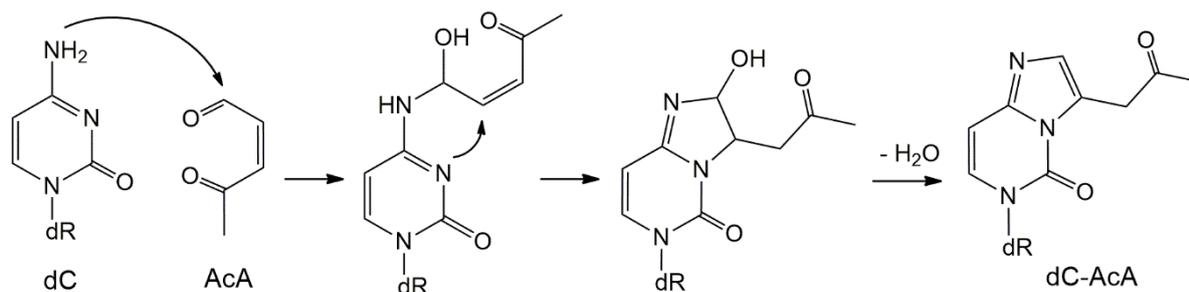


Abb. 41: Hypothetischer Bildungsmechanismus von dC-AcA. Modifiziert nach dem Mechanismus von 4-Oxo-2-alkenalen (Kawai *et al.*, 2004). AcA: 3-Acetylacrolein, dC: 2'-Desoxycytidin, dR: 2'-Desoxyribose.

4.2.3.2 Das Addukt dG-AcA

Die **Synthese** von dG-AcA wurde ausgehend von der sauren Hydrolyse von DHMMF und Zugabe von dG durchgeführt. Mittels zusätzlichen Ansäuerns wurde die Eliminierung von Wasser im letzten Schritt des in Abb. 44 postulierten Bildungsmechanismus sichergestellt. Aus der Literatur war die zeit- und temperaturabhängige Instabilität der hydratisierten Vorstufe bekannt (Liu *et al.*, 1996). Auch hier wurde vor Säurezugabe das Auftreten von zwei Verbindungen im Verhältnis $\sim 1:1$ (über Peakhöhe und -breite determiniert) beobachtet. Sie wiesen via HPLC-ESI⁺-MS/MS Molekülonen mit m/z 348,2 ($R_t = 11,75$ min) und m/z 366,0 ($R_t = 10,75$ min) auf (gemessen am HPLC-MS/MS-3200er-System). Die Massendifferenz von 18 Da entspricht dem Verlust eines Wassermoleküls. Analog zu dC-AcA wurde durch Zugabe von Säure das Gleichgewicht in Richtung des stabilen, dehydratisierten Produkts gedrängt, um dG-AcA als Produkt zu erfassen. So wurde nach semipräparativer Aufreinigung und Lyophilisierung dG-AcA erhalten mit einer Reinheit von 91 % (ermittelt über das ¹H-NMR-Spektrum).

UV/Vis-spektroskopisch wurde von dG-AcA in Wasser zwei Absorptionsmaxima bei $\lambda_{\max} = 231$ nm (schmal) und 286 nm (breit) bestimmt (NanoDropTM). Das Spektrum stimmte mit dem von Hecht *et al.* (1992) publizierte Spektrum bei pH (7,0) überein, welches Absorptionsmaxima bei $\lambda_{\max} = 229$ nm (schmal) und 284 nm (breit) aufwies.

Die Signale und deren strukturelle Zuordnung des ¹H-NMR-Spektrum (Abb. 42) des Produkts in DMSO-*d*₆ sind in Tab. 20 Referenzwerten gegenübergestellt.

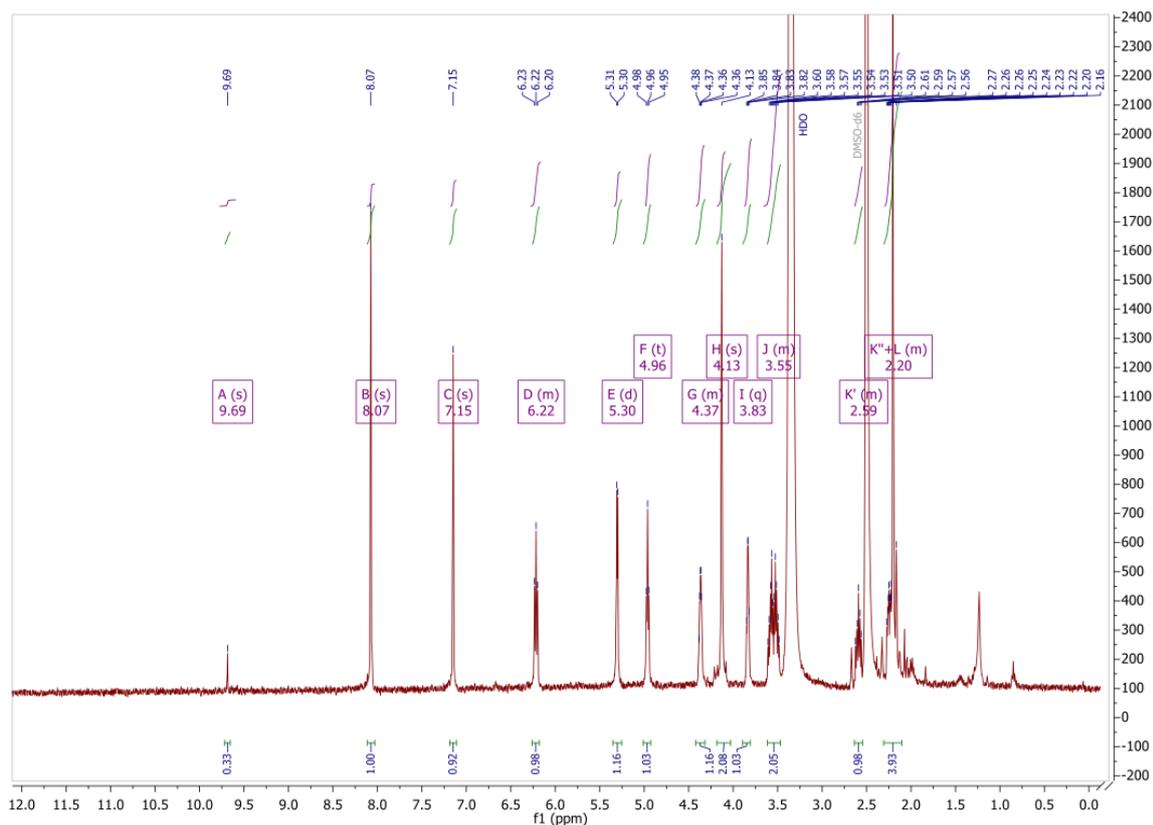


Abb. 42: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von dG-AcA in $\text{DMSO-}d_6$. Die Zuordnung der Signale ist in Tab. 20 gezeigt. AcA: 3-Acetylacrolein, dG: 2'-Desoxyguanosin.

Tab. 20: Identifizierung von dG-AcA via NMR und MS mit Literaturvergleich. Syn: eigene Synthese in $\text{DMSO-}d_6$ mit ^1H -NMR (400 MHz) und charakteristischer Hauptfragmente mittels ESI^+ -MS/MS, Ref.: Referenzliteratur in $\text{DMSO-}d_6$ lag t.w. nur als Spektrum vor, weshalb die mit (~) markierten δ lediglich abgeschätzt wurden (Hecht *et al.*, 1992). *) amid-gebundenes Proton mit geringer Signalintensität. AcA: 3-Acetylacrolein, dG: 2'-Desoxyguanosin, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Signal	Syn.				Ref. ~ δ [ppm]	Signalzuordnung der NMR-Signale und MS-Fragmentierung
	J	δ [ppm]	m	J [Hz]		
A	*	9,69	s			
B	1 H	8,07	s		8,06	
C	1 H	7,15	s		7,13	
D	1 H	6,22	m		~6,2	
E	1 H	5,30	d	4,0		
F	1 H	4,96	t	5,5		
G	1 H	4,37	m		~4,4	
H	2 H	4,13	s		4,10	
I	1 H	3,83	q	4,5	~3,9	
J	2 H	3,55	m		~3,5	
K'	1 H	2,59	m		~2,6	
K''+L	4 H	2,20	m+s		2,20	

Das Grundgerüst der 2'-Desoxyribose stimmte mit den entsprechenden Signalen von dC-AcA und dA-AcA überein. Als austauschbares Proton war neben den Hydroxylgruppen (Signal E, F) auch ein protonierter Stickstoff des anschließenden Ringsystems (Signal A), allerdings in deutlich geringer Intensität bei $\delta_A = 9,69$ ppm, erkennbar. Diese drei Signale austauschbarer Protonen waren die einzigen Signale, die nicht von Hecht *et al.* (1992) beschrieben wurden. Jedoch wurden die Signale der Desoxyribose-gebundenen Alkoholgruppen (E, F) aller drei Addukte auch von Rentel *et al.* (2005) beobachtet. Im konjugierten 5-Ring-System wurde Signal B tieffeldverschoben zu Signal C eingeordnet, aufgrund seiner jeweils geminalen Position zwischen N^7 und N^9 in der Purin-Struktureinheit. Die drei Signale C, H und L stammten von AcA, welches zum Imidazol an den Purinring kondensierte. Dabei spiegelte das einprotonige Singulett bei $\delta_C = 7,13$ ppm die vinylische Bindung sowie Substitution an jeweils Position 4 des 5-Rings wider. Als Substituent war Signal H mit zweiprotonigem Singulett einer isolierten Methylengruppe bei $\delta = 4,10$ ppm zugeordnet. Es schloss die Acetylgruppe mit isolierter, tieffeldverschobenen Methylgruppe (Signal L) an. Letzteres Signal ragte als scharfes Singulett aus dem Multiplett von Signal K'', einem Proton der Desoxyribose an Position 2'. Somit konnte auch hier die Kondensation zum 5-Ring und erfolgreicher Dehydratation bestätigt werden.

Das ^{13}C -NMR-Spektrum von dG-AcA zeigte zwar ausgeprägte Signale wie die Methylgruppe bei $\delta = 29$ ppm, jedoch konnte aufgrund der geringen Signalintensität keine vollständige Auswertung erfolgen. Da das ^1H -NMR, UV/Vis-Spektrum als auch die massenspektrometrischen Untersuchungen eindeutig sowie stimmig mit den anderen Addukten und vergleichbarer Literatur war, wurde hier darauf verzichtet.

Massenspektrometrisch wurde für das aufgereinigte Syntheseprodukt das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis m/z 348,2 im *Fullscan* detektiert, das dem m/z des Moleülon von dG und AcA mit Verlust eines Wassermoleküls (H_2O , 18 Da) entspricht. Als Hauptfragmente wurden die in Abb. 43 dargestellte Abspaltungen beobachtet, welche die Struktur der NMR-Messungen untermauerten. Vor Ansäuerung (und semipräparativer Aufreinigung) des Synthesegemischs wurden zwei Signale massenspektrometrisch beobachtet, die mit m/z 348 ($R_t = 11,75$ min) und m/z 366,0 ($R_t = 10,75$ min) im Abstand von 1 min eluierten. Die Übereinstimmung der Produktionenscans beider m/z sowie deren Massendifferenz von 18 Da, die H_2O entsprach, bestätigt die Vermutung des Vorliegens einer hydratisierten Form dG-AcA- OH_2 . Referenzliteratur untermauerte die Beobachtung, wo ausgehend von m/z 366, dG-AcA- OH_2 $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]^+$, dessen Hauptfragmente m/z 250 $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}-\text{dR}]^+$ und m/z 232 $[\text{M}-\text{dR}]^+$ bestimmt wurde (Liu *et al.*, 1996).

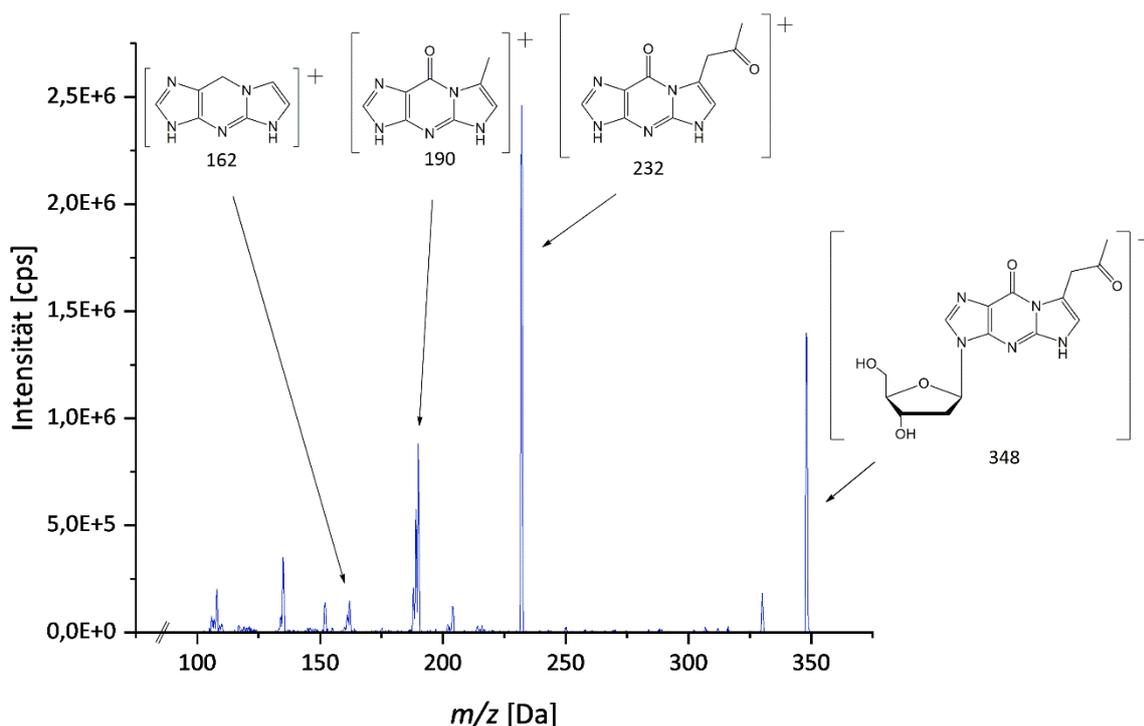


Abb. 43: HPLC-ESI⁺-MS²-Spektrum von dG-AcA mit postulierten, charakteristischen Fragmentstrukturen. AcA: Acetylacrolein, dG: 2'-Desoxyguanosin, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

An dieser Stelle sei zudem das isotopenmarkierte Analoga $^{15}\text{N}_5$ -dG-AcA genannt, welches analog zu dG-AcA als interner Standard synthetisiert wurde. Gegenübergestellt in Tab. 21 wies der markierte Standard das gleiche Fragmentierungsmuster auf, wobei durch die 5 ^{15}N -Stickstoffatome die Massen entsprechend erhöht waren. Aufgrund der geringen Mengen an isotopenmarkiertem Edukt wurde die Charakterisierung auf massenspektrometrische in Kombination mit UV/Vis-spektroskopische Messungen beschränkt.

Tab. 21: Prekursorionen und Fragmente [m/z] im Produktionenscan (MS²) von dG-AcA, dG-AcA-OH₂ und $^{15}\text{N}_5$ -dG-AcA. Ac: Acetyl, AcA: 3-Acetylacrolein, dG: 2'-Desoxyguanosin, dR: 2'-Desoxyribose, m/z : Masse-Ladungs-Verhältnis, PropCO: Isopropenylloxyl.

Substanz	[M+H ₂ O+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M-H ₂ O] ⁺	[M+H ₂ O-dR] ⁺	[M-dR] ⁺	[M-dR-Ac] ⁺	[M-dR-PropCO] ⁺	Fragment des Ringsystem
dG-AcA		348,2	330,2		232,2	190,0	162,0	152,0 135,0
dG-AcA-OH ₂	366,0	348,2	330,2	250,0	232,2	190,0	164,0	152,0 135,0
$^{15}\text{N}_5$ -dG-AcA		353,2	335,0		237,0	195,0	167,0	139,0

Als hypothetischer **Reaktionsmechanismus** der Adduktbildung bietet AcA zwei elektrophile Zentren, eins am Aldehyd und ein anderes am sp²-hybridisierten C-Atom der Doppelbindung (Hecht *et al.*, 1992). Abb. 44 zeigt den nukleophilen Angriff der exozyklischen Aminogruppe von dG an den aldehydischen Kohlenstoff C¹ von AcA zur Schiff'schen Base. Es folgt die Zyklisierung durch einen zweiten nukleophilen Angriff des endozyklischen N¹ von dG an das sterisch günstiger liegende C² von AcA. Das so entstandene dG-AcA-OH₂ wurde analog zur Literatur als Vorstufe beobachtet und kann zu dG-AcA dehydratisieren. Säurekatalytisch ließ sich eine vollständige Elimination des Wassers erreichen. Während Rentel *et al.* (2005) den

nukleophilen Angriff der exozyklischen Aminogruppe als Initialschritt eines Nucleosids an eine 4-Oxo-2-Alkenal annahm, postulierte Hecht *et al.* (1992) die Michael-Addition des endozyklischen N^1 an die Doppelbindung von AcA als ersten Schritt. Auch hier ist nicht auszuschließen, dass die Entstehung der Schiff'schen Base (Angriff der exozyklischen Aminogruppe an C^1 von AcA) der Michael-Addition hintenangestellt ist. Beide Fälle führen zur Zyklisierung und schlussendlich dG-AcA.

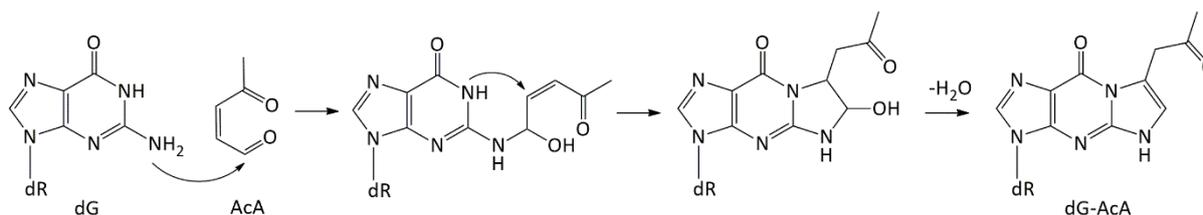


Abb. 44: Postulierter Bildungsmechanismus von dG-AcA. Alternativ ist die umgekehrte Reihenfolge von Schritt 1 und 2 möglich. Mechanismus basierend auf Rentel *et al.* (2005), Hecht *et al.* (1992) und Kawai *et al.* (2004). AcA: 3-Acetylacrolein, dG: 2'-Desoxyguanosin, dR: 2'-Desoxyribose.

4.2.3.3. Das Addukt dA-AcA

Das Addukt von AcA mit dA wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben, weshalb hier nur der Vergleich von dA-AcA mit dG-AcA und dC-AcA gezogen wurde.

Die **Synthese** von dA-AcA erfolgte analog über die saure Hydrolyse von DHDMMF unter Zugabe von dA. Auch hier eluierten via HPLC-MS/MS zwei Verbindungen mit den Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen m/z 332 ($R_t = 11,88$ min, dA-AcA) und m/z 350 ($R_t = 11,51$ min, dA-AcA-OH₂). Deren Massendifferenz von 18 Da ließ wieder das Auftreten einer hydratisierten Form annehmen. Durch zusätzliches Ansäuern kam es zur vollständigen Dehydratation, sodass die vorliegende Einzelverbindung dA-AcA (m/z 332) semipräparativ aufgereinigt und lyophilisiert werden konnte. Via ¹H-NMR wurde eine Reinheit von 93 % bestimmt.

Das **UV/Vis**-Spektrum von dA-AcA zeigte mit Absorptionsmaxima von $\lambda_{\max} = 225$ nm (schmal) und 275 nm (breit) ein vergleichbares Spektrum zu denen von dG- und dC-AcA (NanoDrop™).

Die Signale der ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren (Abb. 46, Kap. 6.4.6) von dA-AcA sind in Tab. 22 der Struktur zugeordnet. Analog zu den bereits diskutierten Addukten wurden die typischen 2'-Desoxyribose-Signale erfasst. Die tieffeldverschobenen Signale A und B des ¹H-NMRs (Abb. 45) wurden den purinischen Protonen zugeschrieben und durch Signal C als eines von drei der AcA-abstammenden Struktureinheit ergänzt. Für die von AcA abstammende Strukturkomponente wurde das gleiche Signalverhalten wie der bisher diskutierten DNA-Addukte beobachtet. Das einprotonige Singulett von Signal C ist Teil eines kondensierten, hier sogar aromatischen Ringsystems, und in *ortho*-Position zum Isopropenyloxy-Substituenten. Dieser wurde durch eine jeweils isolierte Methylen- (Signale H, *m*) als auch Methylgruppe (Signale M, *o*) charakterisiert. Gemäß der Diskussion von dG- und dC-AcA wurde hier auf die Kondensation von AcA zum substituierten Imidazol an dA geschlossen.

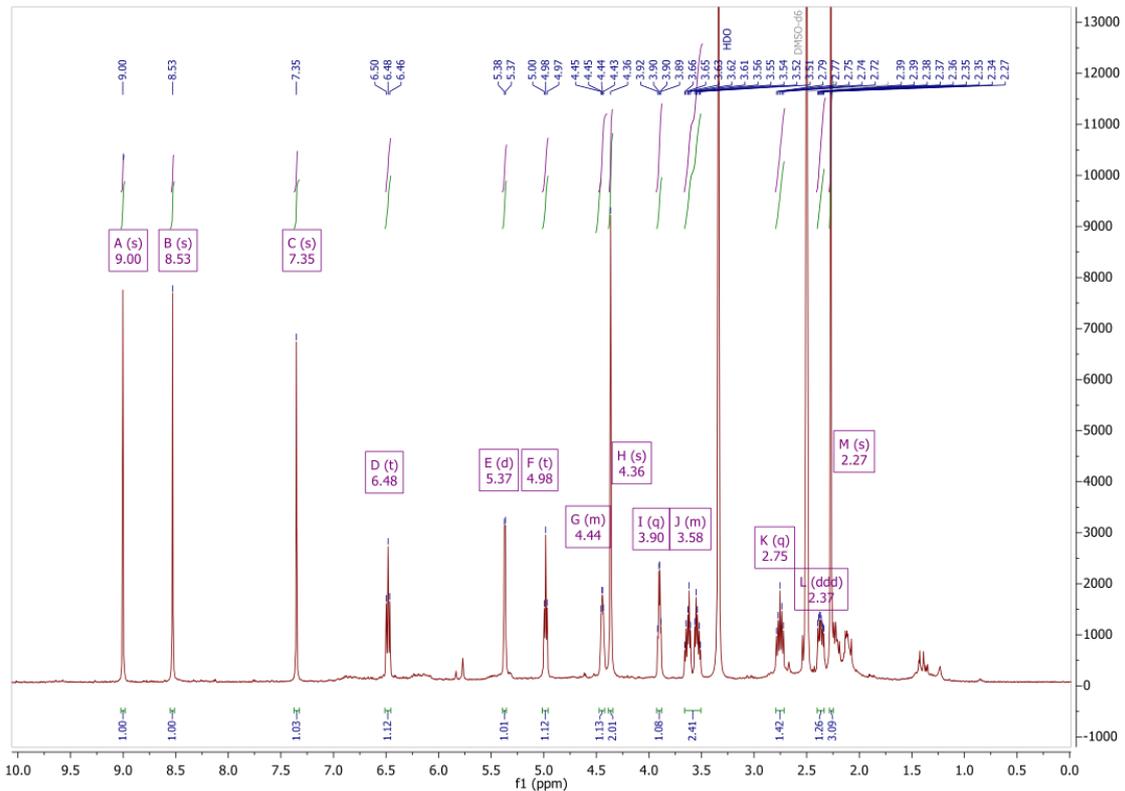


Abb. 45: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von dC-AcA in $\text{DMSO-}d_6$. Die Zuordnung der Signale ist in Tab. 22 gezeigt. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin.

Tab. 22: Identifikation von dA-AcA via NMR und MS. ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale in $\text{DMSO-}d_6$, mit ^1H -NMR (400 MHz) und ^{13}C -NMR (101 MHz) und charakteristischer Hauptfragmente mittels ESI^+ -MS/MS. *) Theoretische Abschätzung durch Überlappung mit Lösungsmittelsignal. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

^1H -NMR				^{13}C NMR		Signalzuordnung der NMR-Signale und MS-Fragmentierung	
Signal	\int	Δ [ppm]	m	J [Hz]	Signal		Δ [ppm]
A	1 H	9,00	s		a	204,45	
B	1 H	8,53	s		b	140,77	
C	1 H	7,35	s		c	139,91	
D	1 H	6,48	t	6,8	d	137,90	
E	1 H	5,37	d	4,1	e	135,88	
F	1 H	4,98	t	5,5	f	131,98	
G	1 H	4,45	m		g	123,11	
H	2 H	4,36	s		h	118,62	
I	1 H	3,90	q	4,6	i	88,03	
J	2 H	3,58	m		j	84,06	
K	1 H	2,75	q	13,2	k	70,78	
				6,1	l	61,73	
				6,2	m	~40*	
L	1 H	2,37	ddd	13,2	l	61,73	
				3,3	n	37,97	
M	3 H	2,27	s		o	29,46	

Auch die **massenspektrometrischen Untersuchungen** via (LC-)ESI⁺-MS/MS bestätigten die Struktur. Hier wurde im *Fullscan* (Q1) die Masse-zu-Ladungs-Verhältnis mit m/z 322 des Produktes detektiert, was der summierten Masse von dA und AcA unter Verlust von H₂O (18 Da) entspricht. Wurde das Synthesegemisch nicht zusätzlich angesäuert, eluierte eine weitere Verbindung $\sim 0,37$ min vorher mit dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis m/z 350, einer Massendifferenz Wasser entsprechend (18 Da). Der Produktionscan (MS², Abb. 46) zeigte auch hier ein übereinstimmendes Fragmentierungsmuster, was auf das Vorliegen von dA-AcA-OH₂ als Vorstufe von dA-AcA schließen ließ. Unter Abspaltung der Desoxyribose wurde das Produktfragment m/z 216 erfasst, dessen weitere Abspaltung einer Acetylgruppe des von AcA-abstammenden Substituenten des Ringsystems (m/z 173) zugeordnet wurde (Tab. 22).

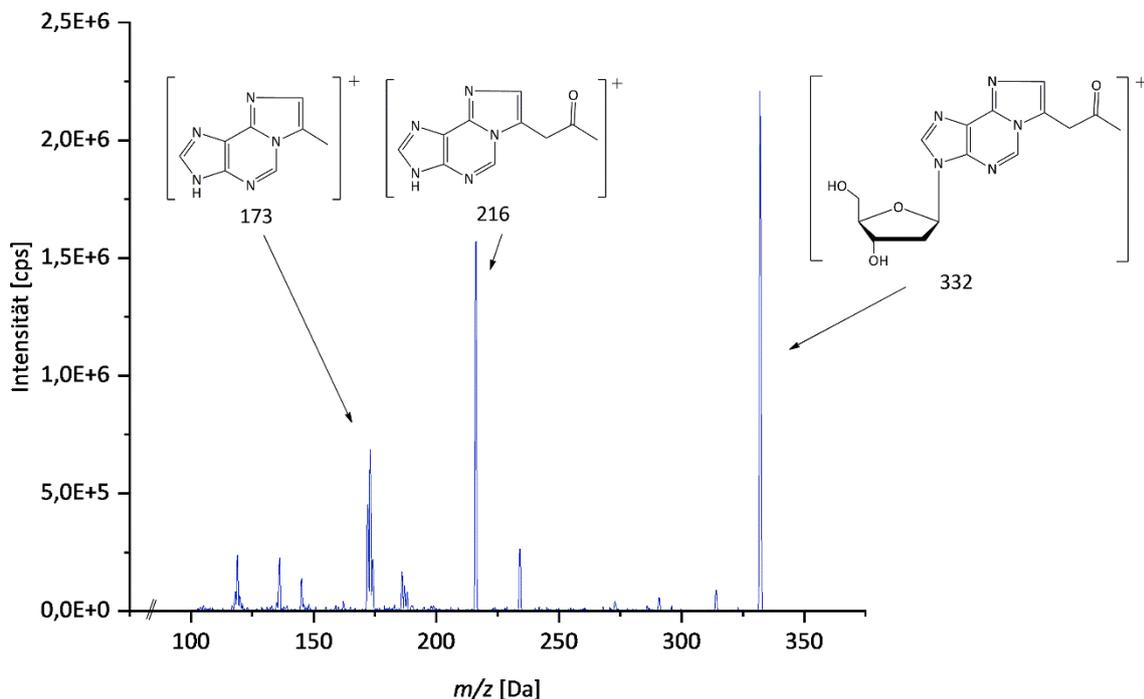


Abb. 46: HPLC-ESI⁺-MS²-Spektrum von dA-AcA mit postulierten, charakteristischen Fragmentstrukturen. AcA: Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Auch für dA-AcA wurde ein ¹⁵N₅-isotopenmarkierter Standard synthetisiert, der den beiden Verbindungen in Tab. 23 gegenübergestellt wurde. Entsprechend der fünf ¹⁵N-Stickstoffatome wies ¹⁵N₅-dA-AcA das gleiche Fragmentierungsmuster auf. Auch hier wurde aufgrund der geringen Mengen an isotopenmarkiertem Edukt die Charakterisierung via Massenspektrometrie und UV/Vis-Spektrum sichergestellt.

Tab. 23: Prekursorionen und Fragmente [m/z] im Produktionscan (MS²) von dA-AcA, dA-AcA-OH₂ und ¹⁵N₅-dA-AcA. Ac: Acetyl, AcA: Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, dR: 2'-Desoxyribose, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis, PropCO: Isopropenyloxy.

Substanz	[M+H ₂ O+H] ⁺	[M+H] ⁺	[M-H ₂ O] ⁺	[M-dR] ⁺	[M-dR-CO ₂] ⁺	[M-dR-Ac] ⁺	[dA+H] ⁺
dA-AcA		332,0	314,0	216,2	186,0	173,0	136,2
dA-AcA-OH ₂	350,0	332,0		216,0	186,0	173,0	136,2
¹⁵ N ₅ -dA-AcA		337,2	319,2	221,0	191,0	179,2	141,0

Aufgrund der Übereinstimmungen von dA-AcA zu dG-/dC-AcA wurde für den **Reaktionsmechanismus** eine entsprechende Hypothese postuliert, wie Abb. 47 veranschaulicht. Die Addition kann nukleophil über die exozyklische Aminogruppe von dA an die Aldehydgruppe von AcA initiiert werden. Die gebildete Schiff'sche Base bietet einen zweiten Angriffspunkt am doppeltgebundenen C²-Atom von AcA, das durch Ringschluss mit N¹ von dA einer Michael-Addition unterliegt. Das so entstandene dA-AcA-OH₂ besitzt das massenspektrometrisch bestätigte Masse-zu-Ladungs-Verhältnis m/z 350 und stellt die Vorstufe von dA-AcA dar. Der letzte Schritt der Eliminierung von Wasser konnte hier säurekatalytisch auf Seiten des Endprodukts geschoben werden. Analog zu der Reaktionshypothese von dG- und dC-AcA kann auch hier Schritt 1 und 2 prinzipiell in umgekehrter Reihenfolge ablaufen.

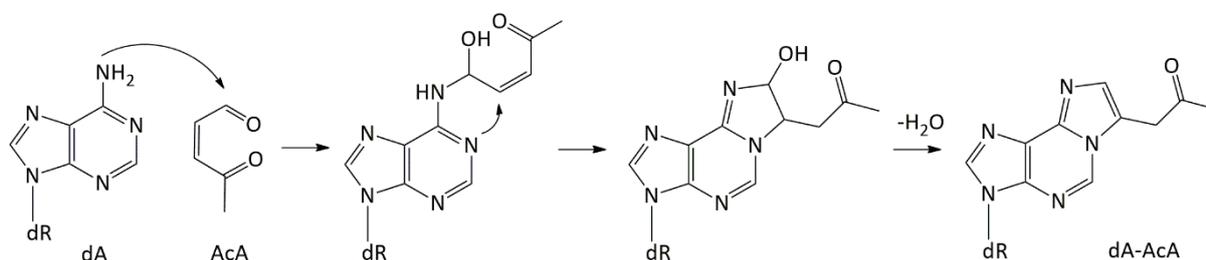


Abb. 47: Hypothetischer Bildungsmechanismus von dA-AcA. Mechanismus abgeleitet von Hecht *et al.* (1992) und Kawai *et al.* (2004). AcA: Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, dR: 2'-Desoxyribose.

4.2.3.4. Quantifizierung der DNA-Addukte von AcA

Nach erfolgreicher Synthese der drei DNA-Addukte wurde eine sensitive UHPLC-ESI⁺-MS/MS-Methode zur gleichzeitigen Quantifizierung der drei Nukleosid-Addukte entwickelt. Für die Etablierung einer Stabilisotopenverdünnungsanalyse (SIVA) wurden ¹⁵N₅-dA-AcA und ¹⁵N₅-dG-AcA als interne Standards verwendet.

Für die Entwicklung einer MRM-Methode für jede Substanz, wurden die intensivsten und gleichzeitig charakteristischen Hauptfragmente herangezogen. Dabei handelte es sich in allen drei Fällen um das Fragment nach Abspaltung des Desoxyribose-Rests, sowie der weiteren Abspaltung der von AcA-stammenden Acetylgruppe. Somit besaßen alle detektierten Fragmente Strukturkomponenten der Base und AcA. Bei der Wahl der Säule, dem Fließmittel mit Zusätzen sowie den chromatographischen Parametern zeigte sich von Beginn an die Problematik eines hohen Hintergrundrauschen im MRM-Modus für dC-AcA. Dies wurde unabhängig von chromatographischen Parametern wie den getesteten Säulen (C18, HILIC Amid-Phase, RP, NP, modifizierte), Fließmittel mit und ohne Zusätze (Puffer, Säuren) sowie deren Gradient beobachtet. Auch die Verwendung unterschiedlicher LC-MS/MS-System und die Variation massenspektrometrischer Parameter erzielte keine Verbesserung. Es waren stets alle drei Hauptfragmente von dC-AcA von einer Erhöhung des Hintergrunds betroffen. Obwohl zwischen dem Zusatz an dC-AcA-Standard und einer Lösungsmittelprobe unterschieden werden konnte, gestaltete sich die quantitative Auswertung als schwierig. Daher wurde dC-AcA nur semiquantitativ bestimmt und nach Wiederfindungsversuchen ¹⁵N₅-

dG-AcA als interner Standard verwendet. Abb. 48 zeigt die überlagerten HPLC-ESI⁺-MS/MS-Chromatogramme von dC-AcA der Konzentrationen 0,01–5 nM (Produktion mit Masse-zu-Ladungs-Verhältnis m/z 308/192).

Die drei Addukte eluierten hintereinander, wobei die Retentionszeiten der isotopenmarkierten Standards mit denen ihrer unmarkierten Verbindungen zusammenfielen (Kap. 6.5.2.4). Ionensuppression wurde nicht beobachtet.

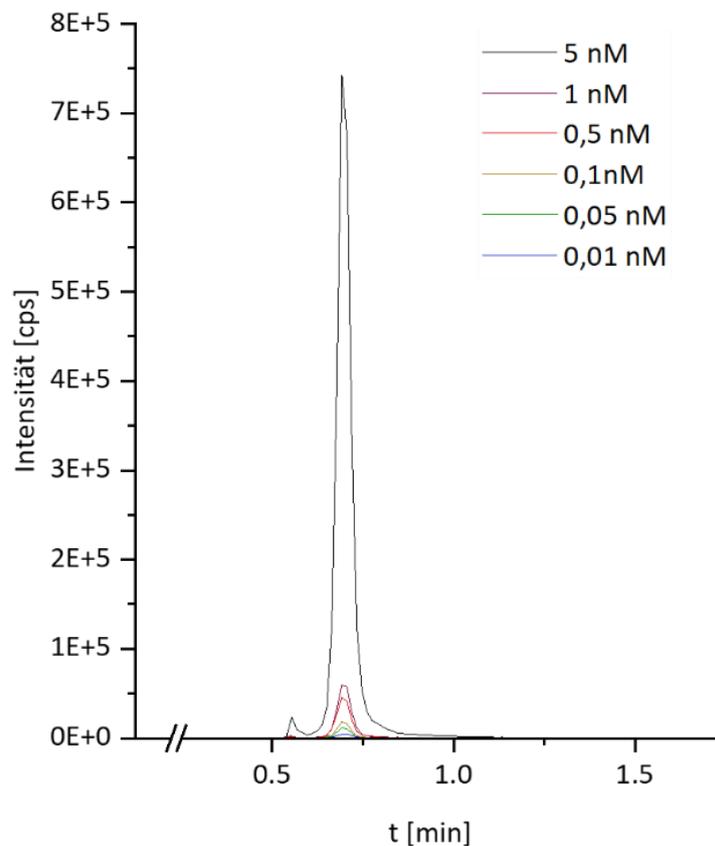


Abb. 48: HPLC-ESI⁺-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Modus mit m/z : 308/192) von dC-AcA (0,01–5 nM). AcA: Acetylacrolein, dC: 2'-Desoxycytidin, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

4.2.3.5. Reaktivität von AcA mit DNA *in chemico*

AcA zeigte sich reaktiv gegenüber den Nukleosiden dA, dG und dC, wobei aufgrund der einheitlichen Adduktmuster auf einen vergleichbaren Bildungsmechanismus geschlossen wurde (Kap. 4.2.3.1–4.2.3.3). Der postulierte Initialschritt des Reaktionsmechanismus würde auch erklären, warum AcA keine Addukte mit Thymin bildet, welches keine exozyklische Amino-Gruppe besitzt. Es wurde folgende Hypothese aufgestellt: Durch den nukleophilen Angriff der exozyklischen Aminogruppe der Base an die Aldehydfunktion von AcA in Kombination mit der Michael-Addition einer endozyklischen Amid-Einheit an das sp^2 -hybridisierte C^2 -Atom von AcA wird die Adduktbildung initiiert. Neben dem dehydratisierten Endprodukt wurde das zyklisierte Halbketal als Vorstufe massenspektrometrisch sowie als UV/Vis-aktive Verbindung erfasst. Während dG-AcA und dA-AcA im Synthesegemisch nach 24 h in etwa gleichem Verhältnis zu ihrer hydratisierten Vorstufe vorlagen (abgeschätzt über die Peakhöhe und Form der MS-Signale), wurden von dC-AcA-OH₂ nur Spuren massenspektrometrisch detektiert. Durch Ansäuern des jeweiligen Synthesegemischs wurde bei allen drei Addukten eine vollständige Dehydratisierung zum entsprechenden Endprodukt erreicht. Dies diente dem letztendlichen Ziel über die Quantifizierung der AcA-Addukte eine Aussage über die Gesamtheit der Bindungen von AcA an DNA zu ermöglichen. Die Synthese der Addukte als Reinsubstanzen ermöglichte die dazu notwendige Etablierung einer sensitiven UHPLC-MS/MS-Methode.

Als nächstes galt es die Reaktivität von AcA gegenüber isolierter DNA zu untersuchen (siehe Experimentalteil Kap. 6.6). Dabei sollte zum einen methodische Fragen geklärt werden, wie die Hydrolyse der DNA in ihre Monomere zur Freisetzung der Nukleosid-Addukte. Zum anderen war das Ziel die verhältnismäßige Verteilung der drei Addukte untereinander zu untersuchen. Über deren zeit- und dosisabhängige Entstehung konnten Rückschlüsse auf die Bildungsrate gezogen werden. Die enzymatische Hydrolyse wurde Methode der Wahl, die über Bestimmung des dG-Gehalts als Hydrolyserate erfasst wurde.

DNA-Addukte in unbehandelter Lachs-DNA

Zu Beginn wurde kommerziell erworbene Lachs-DNA (isoliert vorliegend) für die Testung der Reaktivität von AcA herangezogen. Es zeigten sich jedoch unerwartet hohe Gehalte aller drei Addukte in der unbehandelten Negativkontrolle. Die Abhängigkeit der detektierten DNA-Addukte von der eingesetzten Menge an unbehandelter Lachs-DNA ist in Abb. 49 dargestellt und korrelierten mit einem R^2 zwischen 0,999 und 1. Wurden die Gehalte auf 10^8 Nukleotide normiert, zeigten sich wie zu erwarten keine Unterschiede zwischen den eingesetzten Massen an DNA (2, 10, 20 μ g). Unter Berücksichtigung des durchschnittlichen Vorkommens der Basenpaaren GC (44 %), bzw. AT (66 %) in Lachs-DNA wurde ein Adduktanteil am Gesamtnukleosidgehalt von 4 n-% dA-AcA und 0,3 n-% dG-AcA ermittelt. Die semiquantitative Bestimmung von 19 n-% dC-AcA verdeutlicht einen hohen Anteil an Bindung von AcA an dC.

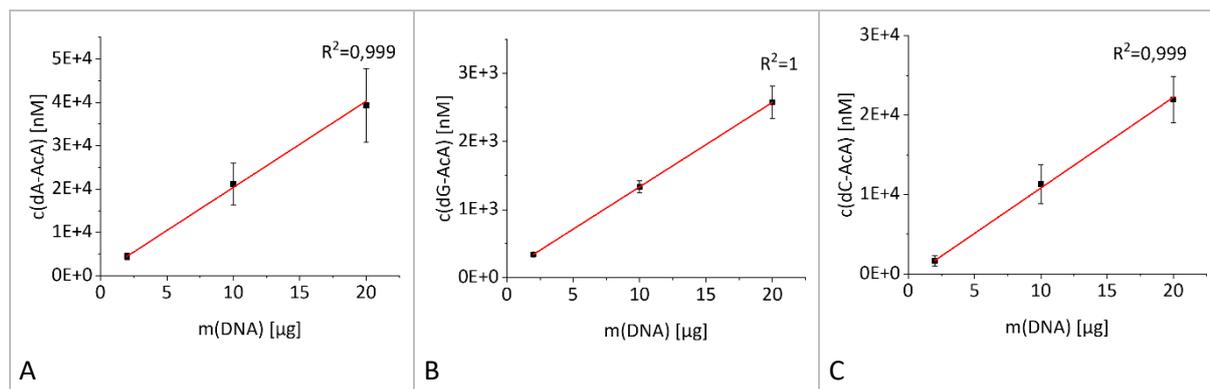


Abb. 49: Gehalt an dA-AcA (A), dG-AcA (B) und dC-AcA (C) in unbehandelter Lachs-DNA. Ermittelt via HPLC-ESI⁺-MS/MS, MRM-Methode Kap. 6.5.2.4. $n = 3$, Mittelwert \pm Standardabweichung. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin.

Da die Lachs-DNA kommerziell erworben wurde, lässt sich über die Ursache der DNA-Addukte in der unbehandelten Kontrolle nur spekulieren. Eine wie hier gefundene hohe Belastung spricht weniger für eine Belastung der tierischen Quelle als für eine prozess- oder lagerbedingte Entstehung. Zudem stammte die Lachs-DNA aus Spermatozoiden, die erstens einen gut geschützten Zelltyp darstellen und zweitens eine prinzipiell reduzierte Belastung an Methylfuran (als v.a. hitzeinduzierte Lebensmittelkontaminante) erfahren sollten. Hinzu kommt, dass DNA unbehandelter pRH keine solchen Addukte aufwies.

In den meisten **Literatur**angaben zu den Synthesen der DNA-Addukte wurden Studien zur Adduktbildung nach Lipidperoxidation durchgeführt. Hier wurde beobachtet, dass aus dem oxidativen Abbau von Fettsäuren entstehende 4-Oxo-2-alkenale mit freien Nukleosiden und isolierter DNA reagieren. Entstandene Adduktmuster entsprachen dem hier charakterisierten dA-, dG- oder dC-AcA. Dabei variierte die am 5-Ring substituierte Kettenlänge abhängig von der eingesetzten Fettsäure, bzw. der Lokalisation ihrer ungesättigten Bindung (Kawai *et al.*, 2004; Kawai und Nuka, 2018; Nuka *et al.*, 2016). Explizit dG-AcA als auch dG-AcA-OH₂ entstanden nach dem Abbau von α -Acetoxy-*N*-nitrosopiperidin zu (*cis*-)AcA bei Inkubation mit isolierter DNA (Hecht *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1996). Bei dem Abbau von β -Carotin wurde AcA lediglich als reaktives Intermediat beschrieben, welches gebunden an dG zu 1,*N*²-Etheno-dG weiter abgebaut wurde. Es wurde dG oder DNA mit Retinal oder β -Carotin in MeCN bei 50 °C für 7 d teilweise mit H₂O₂ gerührt. Während die Ansätze mit dem Oxidationsmittel die höchsten DNA-Adduktlevel aufwiesen, wurde auch in der unbehandelten Kontrolle entsprechende DNA-Addukte nachgewiesen. So wurden (bei pH 7,4) $5,7 \pm 0,18$ 1,*N*²-Etheno-dG/10⁸ dG bestimmt (Marques *et al.*, 2004). Als eine andere Quelle für AcA wurden apurine Stellen der DNA genannt, deren tautomere Umlagerung abgebauter Desoxyribose das α,β -ungesättigte Carbonyl bildeten. Nicht nur dC-AcA auch 3,*N*⁴-Etheno-2'-desoxycytidin wurden als Addukte einer Inkubation von apurinen Stellen mit dC-haltiger DNA-Frequenz beobachtet. Die Reaktion von AcA mit dC wurde als schneller im Vergleich zu dG beschrieben (Rentel *et al.*, 2005).

Die in dieser Arbeit genutzte, lyophilisierte Lachs-DNA wurde bereits mehrere Jahre bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagert. Da mit zunehmender Lagerdauer von einer steten Desintegration der Basen aus der DNA-Struktur auszugehen ist, sind die apurinen Stellen als Quelle der AcA-Addukte in nicht inkubierter Lachs-DNA als wahrscheinlichste Quelle zu vermuten.

Da die verwendete Lachs-DNA bereits ohne Behandlung mit AcA hohe DNA-Adduktlevel an dA-AcA, dG-AcA sowie dC-AcA aufwies, musste eine Alternative zur Untersuchung der Reaktivität von AcA gegenüber isolierter DNA genutzt werden. Hierfür wurde isolierte DNA unbehandelter pRH gewählt.

Reaktivität von AcA gegenüber DNA unbehandelter pRH

Zur Untersuchung der Reaktivität von AcA gegenüber DNA wurden die DNA unbehandelter pRH isoliert und aufgereinigt. Hier waren keine entsprechenden DNA-Addukte, dA-AcA, dG-AcA oder dC-AcA, in der nicht behandelten Kontrolle detektierbar. Isolierte DNA wurde 24 h mit $0,01\text{--}1000\text{ }\mu\text{M}$ AcA, bzw. $0,5\text{--}24\text{ h}$ mit $100\text{ }\mu\text{M}$ AcA inkubiert und anschließend enzymatisch hydrolysiert, um die entsprechenden Nukleoside massenspektrometrischen zu vermessen. Mit der Konzentrationswahl sollte ein möglichst breiter Bereich abgedeckt werden. Dieser umfasste, bzw. unterschritt (um den Faktor 10) die später *in vitro* eingesetzten Konzentrationen an AcA und MF (Inkubation pRH, Kap. 4.4). Damit wurde sichergestellt, dass solche geringen Konzentrationen detektierbar waren.

Es konnten alle drei Addukte nachgewiesen werden, deren Bildung signifikant und linear dosis- als auch zeitabhängig stattfand (siehe Abb. 50). Nach 24-stündiger Inkubation mit einer Konzentration von $100\text{ }\mu\text{M}$ AcA überstieg der Gehalt $6,14 \cdot 10^3$ dA-AcA / 10^8 Nukleosiden den von dG-AcA ($3,02 \cdot 10^2 / 10^8$ Nukleosiden) um das 20-fache. Im Falle von dC-AcA wurden die höchsten Adduktlevel bestimmt, jedoch sind aufgrund der semiquantitativen Methode die 32-fach höheren Adduktlevel zu dA-AcA unter Vorbehalt zu bewerten.

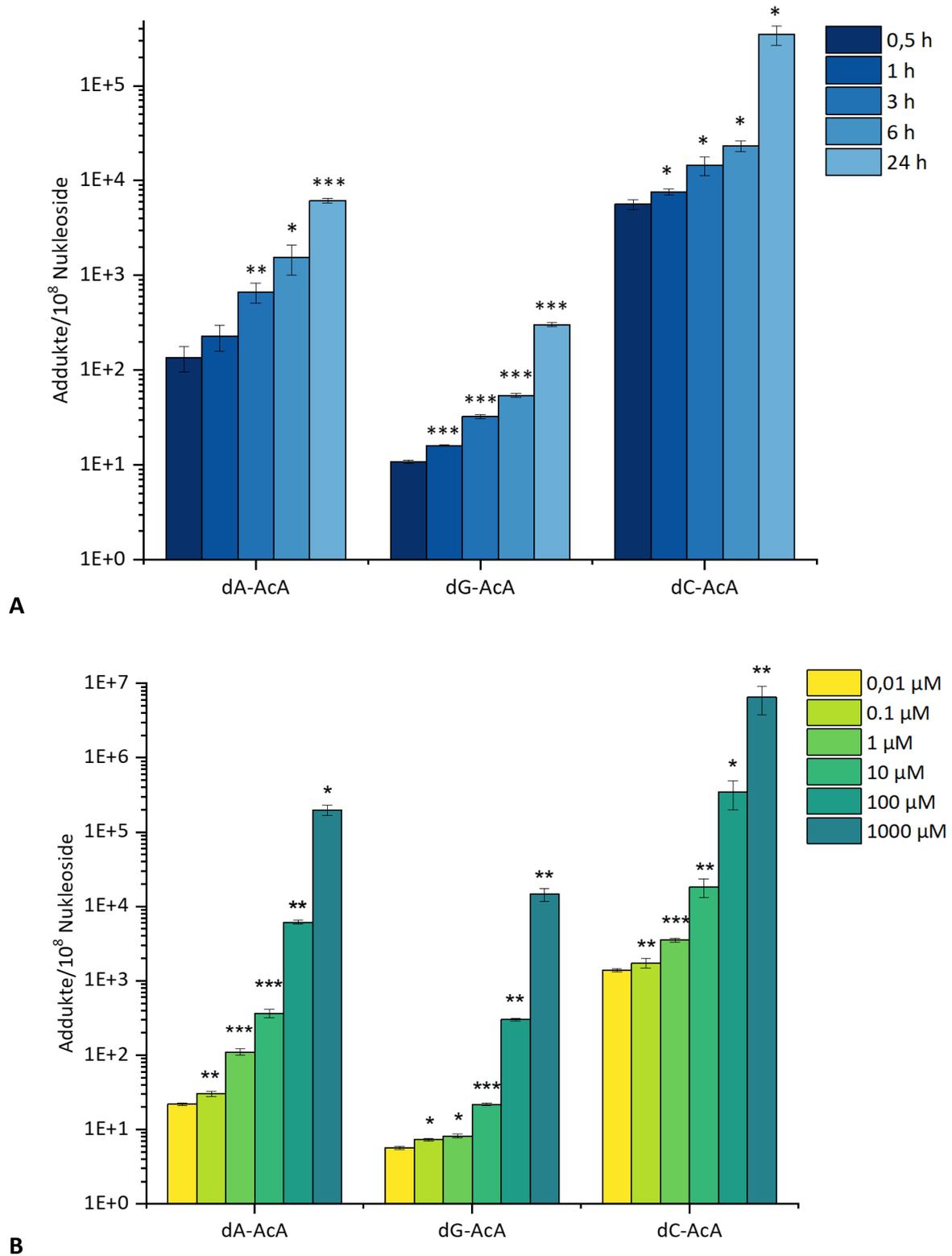


Abb. 50: (A) Zeit- und (B) dosisabhängige Bildung von dA-, dG- und dC-AcA nach Inkubation von isolierter DNA aus pRH mit AcA. Die Inkubationen bei 37 °C wurden im Falle der zeitabhängige Testung mit konstant 100 μM AcA durchgeführt (A), während die dosisabhängige Versuche konstant 24 h inkubiert wurden (B). $n = 3$, Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikanz wurden gegen die nächst niedrigeren Einheit getestet mittels ungepaartem, einseitigem T-Test mit (*) $P < 0,05$ signifikant, (**) $P < 0,01$ hoch signifikant, (***) $P < 0,001$ höchst signifikant. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin.

Die Frage, wieviel des eingesetzten AcAs zu eines der DNA-Addukte umgesetzt wurde, beantwortet die **Umsatzrate** in Abb. 51. Hier wurde das Adduktlevel in Relation zur eingesetzten Stoffmenge an AcA (100 μ M) in [ppm] angegeben. Nach 24 h war AcA zu 376 ± 29 ppm dA-AcA und 24 ± 2 ppm dG-AcA umgesetzt. Der Umsatz zu 27010 ± 6670 ppm dC-AcA ist als semiquantitativer Wert zu betrachten.

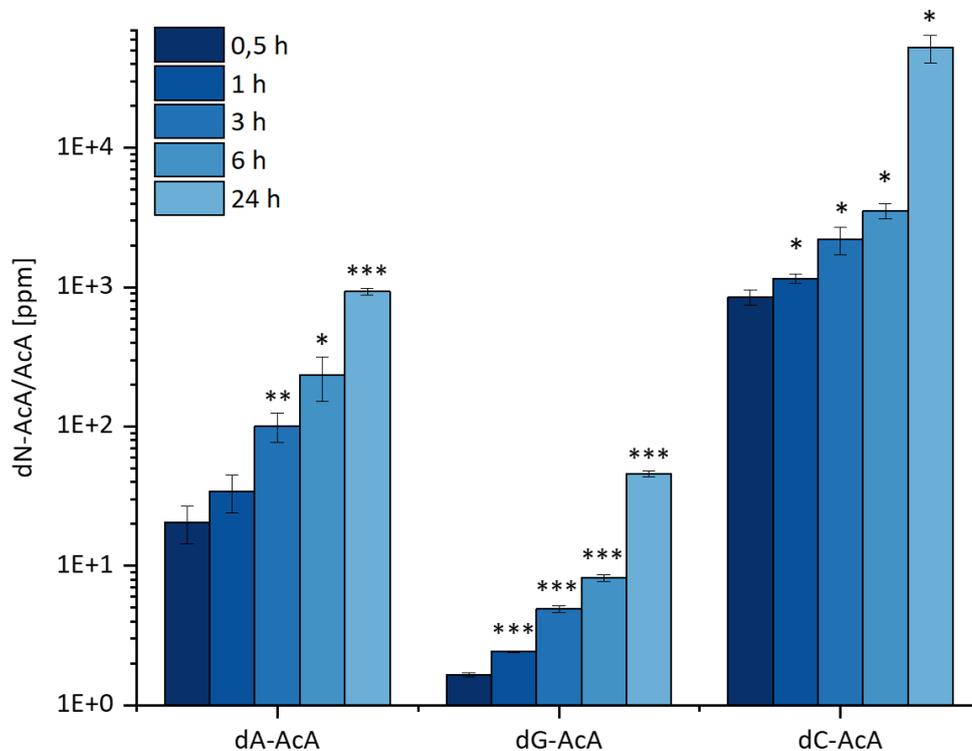


Abb. 51: Umsatzrate (dN-AcA/AcA [ppm]) von AcA zu dA-, dG- oder dC-AcA nach Inkubation mit isolierter DNA aus pRH. $n = 3$, Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikanzen wurden gegen die nächst niedrigeren Einheit getestet mittels ungepaartem, einseitigem T-Test mit (*) $P < 0,05$ signifikant, (**) $P < 0,01$ hoch signifikant, (***) $P < 0,001$ höchst signifikant. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, dN: Nukleosid.

Somit konnte die Methode der DNA-Hydrolyse als geeignet und die massenspektrometrische Erfassung von zwei DNA-Addukte (dA-AcA, dG-AcA) als sensitiv beurteilt werden. Die Bestimmung von dC-AcA ist als semiquantitativ einzuordnen. Hinsichtlich der Reaktivität lässt sich bereits nach kurzer Zeit von 0,5 h stetig, signifikant steigende Adduktlevel verzeichnen. Die zeitabhängige Umsatzrate spiegelt eine kontinuierliche Bildung wider. Dies steht im Gegensatz zur instant ablaufenden Reaktion von AcA mit den acetylierten Aminosäuren AcLys oder AcCys. In deren Fall wurden stete Adduktlevel bereits nach 1 min beobachtet.

Ein wichtiger Parameter zur Einschätzung des gentoxischen Potentials ist die Bindungsstelle des Addukts am Nukleosid. Insbesondere die Basenregionen, welche die Wasserstoffbrückenbindungen zur komplementären DNA-Base eingehen, sind hervorzuheben. In Folge einer Basenfehlpaarung, die von der DNA-Reparatur nicht erkannt wird, kann sie sich nach Replikation als Mutation etablieren. Solche kritische Regionen der DNA-Basen sind die $N1$ - und N^6 -Position von dA, $N1$ -, N^2 - und O^6 -Position von dG als auch die $N3$ -, N^4 - sowie O^2 -Position von dC (Jarabek *et al.*, 2009; Kunz *et al.*, 2009). In allen drei DNA-Addukten von AcA sind solche Regionen betroffen, was ein mutagenes Potential vermuten lässt. Das unterstreicht die Notwendigkeit, die Bildung von AcA-DNA-Addukte *in vitro* und ggf. weiterführend *in vivo* zu untersuchen (Kap. 4.4.3).

Fazit zur Synthese, Charakterisierung und Bildung der DNA-Addukte von AcA

AcA bildete Addukte mit den Nukleosiden dA, dG und dC, während keine Reaktivität gegenüber dT beobachtet wurde. Für den Bildungsmechanismus wurde ein nukleophiler Angriff der exozyklischen Aminogruppe des jeweiligen Nukleotids mit der anschließenden Ausbildung eines exozyklischen 5-Rings postuliert. Ohne exozyklische Aminogruppe bot dT keine nukleophile Angriffsgruppe zur Bindung an die Aldehydfunktion von AcA. Nach Zyklisierung konnte ein hydratisiertes Intermediat beobachtet werden, das durch Säurezugabe über Kondensation zum Endprodukt reagierte. Nach erfolgreicher Charakterisierung von dA-AcA, dG-AcA sowie dC-AcA wurden $^{15}\text{N}_5$ -dA-AcA sowie $^{15}\text{N}_5$ -dG-AcA als interne Standards synthetisiert. Sie ermöglichten die Etablierung einer sensitiven (U)HPLC-ESI⁺-MS/MS-Methode zur quantitativen Bestimmung mittels SIVA. Die Bestimmung von dC-AcA wurde aufgrund von messmethodischen Interferenzen semiquantitativ betrachtet. Wurde im Anschluss isolierte DNA von pRH mit AcA inkubiert, konnte die zeit- und dosisabhängig Bildung der drei identifizierten Addukte dG-AcA, dA-AcA und dC-AcA nachgewiesen werden.

4.3. Metabolische Aktivierung von 2-Methylfuran

Ziel war die Untersuchung der Phase I des Fremdstoffmetabolismus von MF, dessen metabolische Aktivierung bereits anhand „*mixed-function oxidase systems*“ untersucht wurde. Da Studien mit ^{14}C -markiertem MF im Einklang mit histopathologischen Untersuchungen die Leber als Hauptzielorgan identifiziert (Gill *et al.*, 2014; Ravindranath *et al.*, 1986), wurden hier Lebermikrosomen verwendet. Zuerst galt es AcA als Metabolit zu verifizieren, dessen Bildung bisher nur indirekt über die proteingebundene Radioaktivität von ^{14}C -markiertem MF bestimmt wurde. Weiterführend sollten interspezifischen Unterschiede zwischen humanen (HLM) *versus* Rattenlebermikrosomen (RLM) verglichen werden. Hierauf baute die Frage auf, welches Enzym, bzw. welche Enzyme im vielfältigen Mikrosomenansatz für die Umsetzung als Schlüsselenzym(e) verantwortlich ist/sind.

Mikrosomen sowie SupersomesTM als Testsystem wurden kommerziell erworben. Dabei stammten die RLM aus ~79 männlichen Sprague-Dawley-Ratten, die HLM hingegen aus einem breiten Pool von 150 männlichen und weiblichen Spendern. Berücksichtigt wurde eine typische Verteilung an polymorphen CYPs, um den durchschnittlichen Metabolismus zu repräsentieren. Als einzelne Enzyme (SupersomesTM) wurde CYP 1A2, CYP 2A6, CYP 2C9*1, CYP 2D6*1, CYP 2E1 und CYP 3A4 ausgewählt, wobei polymorphe CYP (*1) in der am häufigsten auftretenden Isoform erworben wurden.

Die Auswahlkriterien für die Verwendung der oben genannten CYPs sei im Folgenden kurz erläutert. Zunächst spielte der Gehalt und die Aktivität in Lebermikrosomen eine große Rolle, worunter CYP 3A4 (30 %), 1A2 (13 %), 2C9 (20 %) fielen (Shimada *et al.*, 1994, 1994; Shimada *et al.*, 1997). Aber auch die Beteiligung am Arzneistoff-Metabolismus wurde herangezogen, der dafür sprach CYP 3A4 (50 %), 1A2 (5-10 %) sowie 2D6 in die Untersuchungen einzubinden (Evans und Relling, 1999). Wie bereits angesprochen stellt die Leber das primäre Zielorgan der MF-Toxizität dar, weshalb die in Tab. 1 gelistete Lokalisierung entscheidend war zwischen verwandten CYPs mit ähnlichem Substrat-, bzw. Metabolitenspektrum zu wählen. So wurde z. B. CYP 1A2, das hauptsächlich in der Leber vorkommt dem in der Lunge überwiegenden CYP 1A1 vorgezogen (Dekant, 2017). CYP 2C9 und CYP 2C19 weisen ebenfalls ein ähnliches Metabolitenspektrum auf. Hier entschied ihr Gehalt in HLM (CYP 2C9: 20 % *versus* CYP 2C19: < 5 %). In der Literatur wurde *in vitro* als auch *in vivo* eine Zunahme der metabolischen Aktivierung von MF bei vorheriger Gabe von Phenobarbital beobachtet (Ravindranath und Boyd, 1985; Ravindranath *et al.*, 1986). Als klassischer Induktor von v.a. CYP 2B, CYP 2C und CYP 3A4 bestätigte dies die bisherige Auswahl (Dekant, 2017). Nicht zuletzt wurde sich auf den bekannten Metabolismus strukturell ähnlicher Substanzen bezogen. So werden verwandte Moleküle geringer molekularer Massen wie Furan, Ethanol oder Acrylamid von CYP 2E1 metabolisiert (Gates *et al.*, 2012; Dey, 2013; Heit *et al.*, 2013; Boettcher und Angerer, 2005). Um Reaktionsmuster hinsichtlich C-Oxidation und weiterer Hydroxylierung abzudecken, wurde auch CYP 2A6 in die Liste der zu testenden CYPs aufgenommen.

Zu Beginn der Methodenetablierung wurde, wie in Kap. 4.2.2.3 beschriebene, eine Abfangreaktion für AcA etabliert, da der reaktive Metabolit nicht adäquat mittels HPLC-MS/MS detektiert werden konnte. Auch sollte durch das Angebot eines (weiteren) Reaktionspartners die Bindung an mikrosomales Protein gehindert oder reduziert werden. Die Bindung des MF-Metaboliten an mikrosomales Protein gefolgt von Inhibierung des Metabolismus wurde von Ravindranath *et al.* (1984a) mittels ^{14}C -markiertem MF beobachtet. In Kap. 4.2.2.3 wird die Reaktivität von AcA mit AcLys und AcCys in Gegenwart der für die enzymatischen Inkubationen geeigneten Puffersysteme verglichen. Das Ausbleiben der Adduktbildung mit AcCys in Kaliumphosphatpuffer ließ AcLys als Abfangreagenz wählen. Die Methodenetablierung hinsichtlich der enzymatischen Inkubationen sind in Kap. 6.7 aufgeführt. Als Negativkontrolle wurde entweder kein NADPH (als essentielles Reduktionsäquivalent) zugegeben oder die Enzyme zuvor hitzeinaktiviert (30 min, 90 °C). Dennoch zeigte sich auch ohne Enzymen eine marginale Bildung von AcLys-AcA sobald MF und AcLys anwesend waren (Abb. 53). Dies war nicht zeit-, aber strikt dosisabhängig, was auf eine sofortige Reaktion (< 1 min, minimale Inkubationszeit) hinwies (Abb. 37, C). Auch Ravindranath *et al.* (1984a) beobachteten dies und nahmen die Oxidation von MF durch Luftsauerstoff an. Die Subtraktion des integralen Wertes der entsprechenden Konzentration von den Probenergebnissen (im intakten Enzymsystem) zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Signifikanz oder den Größenbereich der Umsatzrate. Aus Gründen der realitätsgetreuen Darstellung der Daten wurden diese ohne Subtraktion der Negativkontrolle ausgewertet. Als Reaktionskontrolle wurde 1 oder 10 μM AcA anstelle von MF dem Inkubationsgemisch zugegeben (Abb. 37). Es diente zudem der Erfassung der Umsatzraten. Die quantitative Bestimmung von AcA als AcLys-AcA erfolgte via HPLC-MS/MS im MRM-Mode (Methode I) mit AcLys-BDA als internem Standard (Kap. 6.5.2.3). Aufgrund der spezifischen Messmethode wurden die einzelnen Enzyme nicht auf deren Aktivität mit anderen Substanzen untersucht. Die externe Bestimmung der Gehalte und deren Aktivität durch einheitliche Messmethoden (Tab. 1) ist jedoch Tab. 66 sowie Tab. 67 zu entnehmen. Dies machte ein standardisiertes Vorgehen nach den Durchführungsangaben des Herstellers erforderlich.

Zu Beginn der Untersuchungen wurde bei konstanter MF-Konzentration (100 μM oder 500 μM) der lineare Bereich der zeitabhängigen Umsetzung ermittelt. Dazu wurden Mikrosomen oder SupersomesTM 1–120 min inkubiert und die Sättigung der Enzymkapazität erfasst. Eine Inkubationszeit von 10 min stellte sich als geeignet heraus, um im linearen Bereich zu agieren und gleichzeitig eine adäquate Menge an Produkt zur Detektion zu generieren. Im zweiten Schritt wurde bei konstanter Inkubationszeit (10 min) die Dosisabhängigkeit der MF-Umsetzung (10–750 μM) bestimmt. Die in Kap. 6.7 erläuterten Modelle wurden zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter herangezogen. Schlussendlich wurde die Umsatzrate von MF zu AcA insbesondere bezüglich eingesetzter Substratkonzentrationen betrachtet.

4.3.1. Bildung von 3-Acetylacrolein

Die Wahl der Testkonzentrationen und -zeiten richtete sich zunächst nach Richtwerten, die den Durchführungsprotokollen des Herstellers entnommen wurden. Der Konzentrationsbereich wurden anschließend erweitert, um den Verlauf mit einer Sättigung zu generieren, bzw. bis Grenzen der Löslichkeit (1000 μM) erreicht wurden. Die maximale Inkubationszeit von 120 min bestimmte sich durch die danach anzunehmende Reduktion der enzymatischen Aktivität (Herstellerangaben).

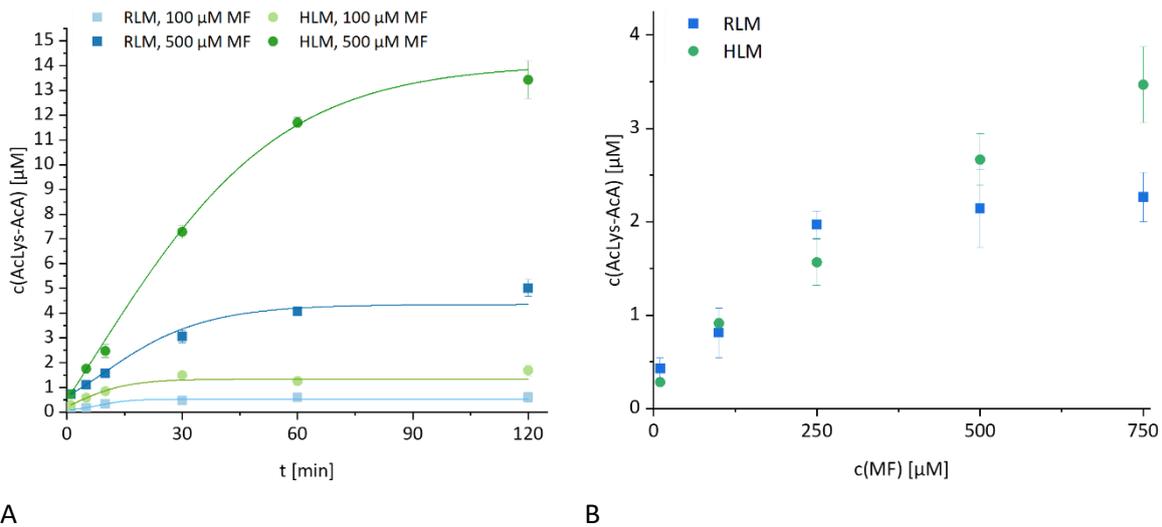


Abb. 52: AcA-Bildung in RLM und HLM nach Inkubation mit MF. (A) Zeitabhängige Inkubation (1–120 min) mit 100 μM bzw. 500 μM MF, (B) Dosisabhängige Inkubation (10 min, 10–750 μM MF). AcA abgefangen mit AcLys und detektiert als AcLys-AcA. Eingesetzt wurde je 1 mg mikrosomales Protein/mL. $n = 3-5$, Mittelwert \pm Standardabweichung, Signifikanzen getestet mittels ungepaartem, zweiseitigem T-Test mit (*) $P < 0,05$ signifikant, (**) $P < 0,01$ hoch signifikant, (***) $P < 0,001$ höchst signifikant. Bis auf die Inkubationszeit von 1 min (A) mit 500 μM AcA lagen alle Werte signifikant erhöht zur Negativkontrolle. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin, HLM: humane Lebermikrosome, MF: 2-Methylfuran, RLM: Rattenlebermikrosome.

Zu Beginn wurden **RLM** mit 100 μM und 500 μM MF für 1, 5, 10, (15,) 30, 60 oder 120 min inkubiert und der reaktive Metabolite AcA mit AcLys (AcLys-AcA) abgefangen. Ab 5-minütiger Inkubation lag die Bildung von AcA in allen Inkubationsansätzen mindestens hoch signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle. Im Falle von 100 μM MF war sie bereits nach 1 min signifikant über der Negativkontrolle. Nach höchst signifikantem Anstieg (bis 30 min) wurde ein Plateau erreicht, wobei als linearer Bereich das Zeitfenster zwischen 1–10 min eingegrenzt werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte bei der Inkubation mit 500 μM MF über den kompletten Zeitraum ein höchst signifikanter Anstieg der AcA-Bildung mit einem linearen Anstieg zwischen 1–30 min erfasst werden. Wurden **HLM** mit 100 μM oder 500 μM MF inkubiert, zeichnete sich ein ähnliches Bild, was Abb. 52 (A) verdeutlicht. Bis auf die 1-minütige Inkubation mit 500 μM MF lag die AcA-Bildung aller Inkubationen höchst signifikant im Vergleich zur entsprechenden Negativkontrolle. Einen (höchst) signifikanten Anstieg der Metabolitenbildung war mit 100 μM MF über einen Zeitraum von 1–60 min, während dieser bei 500 μM MF analog zu den Inkubationen n mit RLM bis hin zu 120 min, zu beobachten. Als linearer Bereich wurde für beide Konzentrationen die Inkubationsdauer von 1–15 min bestimmt. Dabei zeichnete sich neben dem zeitabhängigen Anstieg der Metabolitenbildung

bereits jeweils eine Dosisabhängigkeit zwischen 100 μM und 500 μM ab. Nach 10-minütiger Inkubation von RLM, bzw. HLM mit 500 μM MF wurde die Bildung von $1,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$, bzw. $2,5 \pm 0,3 \mu\text{M}$ AcLys-AcA bestimmt. Die dosisabhängige AcA-Bildung bei 10-minütiger Inkubation ist in Abb. 52 (B) dargestellt, soll jedoch im folgenden Kapitel im Rahmen der Bestimmung enzymkinetischer Parameter eingehend diskutiert werden. Wurde der **Maximalumsatz** von 500 μM MF nach 120 min von RLM mit HLM verglichen, zeigten letztere mit 3-fach höherem Gehalt an AcA einen höchst signifikanten Unterschied. Ebenfalls signifikant war die Differenz der Ergebnisse nach Mikrosomeninkubation mit 100 μM MF, was einen speziesspezifischen Unterschied vermuten lässt. Auch um diesen genauer betrachten zu können, stellte sich im Folgenden die Frage, welche(s) Enzym(e) im mikrosomalen Proteinmix hauptverantwortlich für die metabolische Aktivierung ist/sind. Hierzu wurden die **Supersomes™** CYP 1A2, 2A6, 2C9, 2D6, 2E1 und 3A4 mit 100 μM MF für 60 min sowie 500 μM MF für 10, 30 und 60 min inkubiert. Damit wurde sie im Konzentrations- und Zeitrahmen analog zu den Inkubationen mit RLM und HLM getestet (Kap. 6.7). Abb. 53 zeigt, wie innerhalb der getesteten CYPs lediglich bei CYP 2E1 eine signifikante Bildung von AcA im Vergleich zur Negativkontrolle, gefolgt von einem zeit- und dosisabhängigen Anstieg, beobachtet wurde. Da aufgrund der Messmethodik keine explizite Aktivitätskontrolle für jedes Enzym bei jedem Versuch mitgeführt wurde, wurde sich hier auf die chargenspezifischen Angaben der mitgelieferten Zertifikate berufen (elektronischer Anhang III). Daneben limitiert die Nachweisgrenze von AcLys-AcA die endgültige Aussage, inwiefern die neben CYP 2E1 getesteten CYPs eine (untergeordnete) Beteiligung am MF-Metabolismus haben.

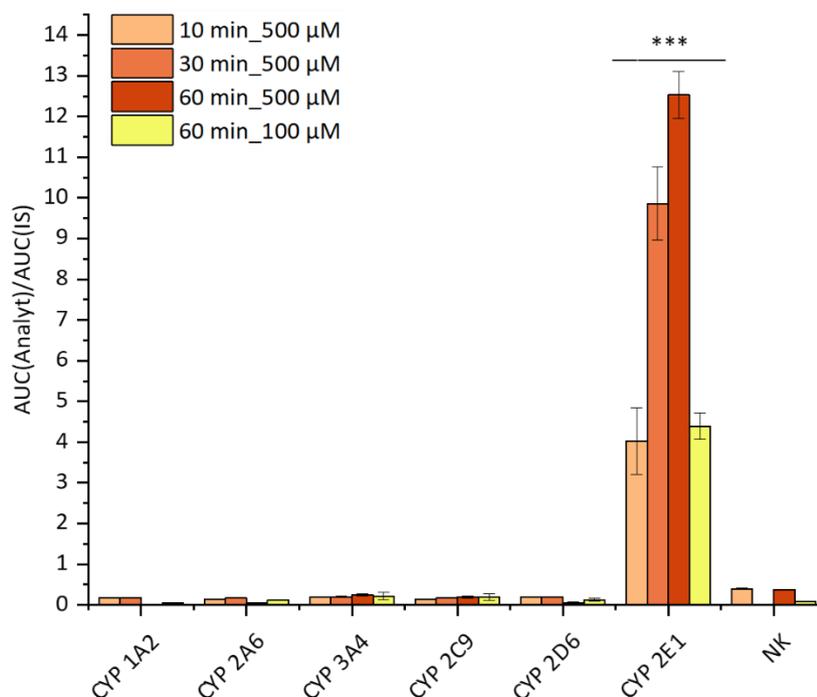


Abb. 53: Inkubation der Supersomes CYP 1A2, 2A6, 2C9, 2D6, 2E1 und 3A4 mit MF (100; 500 μM) für 10, 30 oder 60 min zur Bestimmung der AcA-Bildung. Detektiert als AcLys-AcA (Analyt) mit AcLys-BDA als interner Standard (IS). $n = 3-5$, Mittelwert \pm Standardabweichung, Signifikanzanzen getestet gegen die Negativkontrolle (NK, ohne NADPH) mittels ungepaartem, zweiseitigem T-Test mit (*) $P < 0,05$ signifikant, (**) $P < 0,01$ hoch signifikant, (***) $P < 0,001$ höchst signifikant. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial, CYP: Cytochrom P450, MF: 2-Methylfuran.

Daraufhin wurde das Supersome™ CYP 2E1 (analog zu den Mikrosomeninkubationen) mit 100 μM , bzw. 500 μM für 1, 5, 10, 30, 60 und 120 min auf die Bildung von AcA untersucht. Ein (höchst) signifikanter Anstieg von AcA wurde bei Inkubationen mit 100 μM MF zwischen 1–30 min, bzw. 1–60 min bei 500 μM MF bestimmt. Der Umsatz der niedrigen Konzentration verlief bis 10 min und der der höheren bis 30 min linear. So bestätigten sich die zeit- und dosisabhängigen Bildungen aus den Mikrosomeninkubationen mit RLM und HLM. Die in Abb. 54 dargestellten Verläufe der Umsetzung von MF mit RLM, HLM und CYP 2E1 sind wie folgt einzuordnen. Bei Vergleich des Maximalumsatzes von MF ist zu beachten, dass mikrosomale Inkubationen mit 1 mg Protein/mL durchgeführt wurden, während einzelnen Enzymen als 120 nM CYP/mL eingesetzt wurden. Dies war begründet durch die praktische Notwendigkeit im linearen Bereich der Umsatzgeschwindigkeiten zu arbeiten. Für eine einheitliche Testung wurde 10 min als geeigneter Inkubationszeitraum gewählt, um RLM, HLM sowie CYP 2E1 mit 10, 100, 250, 500 und 750 μM MF zu inkubieren. Die entstandenen Gehalte an AcA sind in Abb. 54 gegen die eingesetzte Konzentration an MF aufgetragen. Alle Probenwerte lagen höchst signifikant über der Negativkontrolle. Während die AcA-Bildung mit RLM bis 250 μM MF (hoch bis höchst) signifikant anstieg, wurde mit HLM sowie CYP 2E1 bis zur höchsten Konzentration von 750 μM MF eine (hoch bis höchst) signifikante Zunahme, das heißt keine Sättigung, erreicht. Experimente mit höheren Substratkonzentration (1000 μM getestet) konnten aufgrund der limitierten Löslichkeit von MF nicht durchgeführt werden. Eine Erhöhung des organischen Anteils (> 0,05 % DMSO) wurde ausgeschlossen, da es die Aktivität der Enzyme messbar beeinträchtigte (Daten nicht gezeigt).

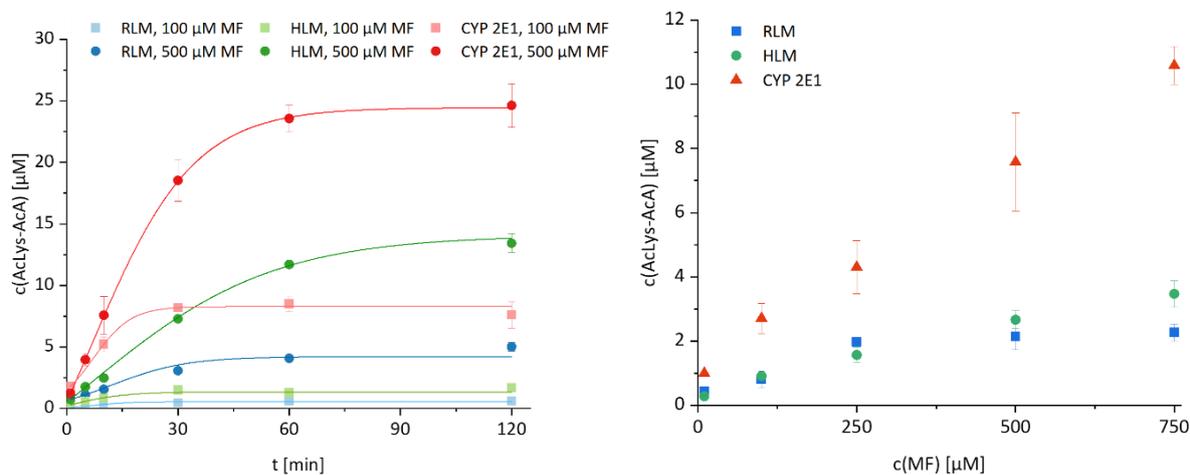


Abb. 54: AcA-Bildung in Supersome™ CYP 2E1 sowie RLM und HLM nach Inkubation mit MF. (A) Zeitabhängige Inkubation (1–120 min) von CYP 2E1 mit 100 μM und 500 μM MF verglichen mit derer von RLM und HLM. (B) Dosisabhängige Inkubation von CYP 2E1, RLM und HLM Inkubation (10 min, 10–750 μM MF). AcA abgefangen mit AcLys und detektiert als AcLys-AcA. Eingesetzt wurde 120 nM CYP 2E1/mL, bzw. 1 mg mikrosomales Protein/mL. $n = 3-5$, Mittelwert \pm Standardabweichung, Signifikanzen getestet mittels ungepaartem, zweiseitigem T-Test mit (*) $P < 0,05$ signifikant, (**) $P < 0,01$ hoch signifikant, (***) $P < 0,001$ höchst signifikant. Alle Werte wurden als höchst signifikant zur Negativkontrolle (ohne NADPH, hitzeinaktivierte Enzyme) getestet. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin, CYP: Cytochrom P450, HLM: humane Lebermikrosome, MF: 2-Methylfuran, RLM: Rattenlebermikrosome

Somit konnte die zeit- und dosisabhängige Bildung von AcA als reaktiver Phase I-Metabolit von MF durch Umsatz mit RLM, HLM und CYP 2E1 als Schlüsselenzym (innerhalb der getesteten Supersome™-Auswahl) nachgewiesen werden. Für die Inkubationen mit Supersomes™ wurde 120 nM CYP 2E1 eingesetzt, was 12 pmol pro Inkubationsansatz ($V = 100 \mu\text{L}$) entsprach. Wird von 20 ± 13 pmol CYP 2E1/mg Protein in HLM (Shimada *et al.*, 1997) ausgegangen, entsprach dies einer Menge von $2 \pm 1,3$ pmol CYP 2E1 in HLM-Inkubationen. Die 6-fach höhere Stoffmenge an CYP 2E1 im Versuchsansatz mit Supersome™ spiegelt sich in der reduzierten AcA-Bildung bei Inkubation mit HLM wider (Abb. 54). Gemäß der Herstellerangaben ist bei Supersomes™ eine 6-fach höhere katalytische Aktivität zu HLM zu erwarten, was hier bestätigt wurde.

Die Inkubation (120 min) HLM mit MF (500 μM) erzeugte im Vergleich zu RLM einen 3-fach höheren Gehalte an AcA, obgleich jeweils 1 mg mikrosomales Protein/mL eingesetzt wurde. Das lässt die Frage nach einem speziesspezifischen Unterschied zu. Shimada *et al.* (1994) verglichen die CYP 2E1-Aktivität in HLM und RLM anhand der enzym-spezifischen Anilin-*p*-Hydroxylierung. Sie beobachteten eine 1,7–4,2-fach höhere Oxidationsrate in HLM (696 ± 986 pmol Produkt/(mg Protein \cdot min)) als in RLM (403 ± 57 pmol Produkt/(mg Protein \cdot min)). Die Standardabweichungen verdeutlichen jedoch den große Umsatzbereich der CYP 2E1-Aktivität in HLM, insbesondere im Gegensatz zu standardisierten Laborbedingungen aus welchen die RLM stammen. So haben zum einen Umwelt- und *Life style*-Faktoren eine Wirkung auf die CYP 2E1-Expression oder -Aktivität (Emery *et al.*, 2003). Zum anderen sind Polymorphismen für CYP 2E1 bekannt, die abhängig von der ethnischen Herkunft eine entscheidende Rolle im Fremdstoffmetabolismus von Arzneimitteln oder Toxinen spielen (Kim *et al.*, 2015). So wurde nicht nur eine unterschiedliche metabolische Kapazität isomerer Formen mikrosomal nachgewiesen (Yang *et al.*, 2012), sondern auch die Korrelation zu pathologischen Ereignissen als genetische Prädisposition gezogen (Yang *et al.*, 2007; Jia *et al.*, 2009). CYP 2E1 ist für die Monooxygenierung von Fremdstoffen, wie beispielsweise *N*-Nitrosamine, Benzol und Alkoholen, verantwortlich (Nedelcheva *et al.*, 1999; Yamazaki *et al.*, 1992; Heit *et al.*, 2013; Lieber, 1997). Somit ist in dieser Arbeit durch den Vergleich von HLM und CYP 2E1, welche die durchschnittliche Aktivität repräsentieren, aber nicht die komplette Spannweite der Variabilität in HLM abdecken, nicht per se auf einen speziesspezifischen Unterschied zwischen Menschen und Ratten zu schließen.

In der Literatur wurde die Durchführung erster mikrosomaler MF-Inkubationen in Kombination mit Semicarbazid als Abfangreagenz beschrieben, um als Disemicarbazon die Bildung eines reaktiven Metaboliten nachzuweisen (Ravindranath *et al.*, 1984a; Ravindranath und Boyd, 1985). In folgenden Mikrosomeninkubationen aus teilweise vorbehandelten Ratten wurde die Radioaktivität gebunden an mikrosomales Protein (isoliert) nach Inkubation mit ^{14}C -MF bestimmt. Die Bindung von ^{14}C -markiertem Material an isoliertem Protein wurde dem quantitativen Umsatz von MF zum reaktiven Metaboliten gleichgesetzt. Während

Lebermikrosomen von Ratten, die mit Phenobarbital (CYP-Induktor) vorbehandelt wurden, eine Erhöhung an mikrosomal gebundenem ^{14}C -MF aufwiesen, wurde kein Unterschied bei einer Vorbehandlung mit 3-Methylchloranthren (CYP-Induktor) beobachtet. Eine Reduktion des Umsatzes zeigte sich, wenn eine Behandlung der Ratten mit den CYP-Inhibitoren Piperonylbutoxid oder *N*-Octylimidazol vorausging. Die mit dem Einfluss der CYP-Induktoren und -Inhibitoren einhergehende Bedeutung der CYP-Enzyme für den MF-Metabolismus, konnte hier bestätigt werden. Qualitativ lässt sich hier auch die Analogie zur metabolischen Aktivierung von Furan zu BDA via CYP 2E1 ziehen (Gates *et al.*, 2012; Gates *et al.*, 2014; Peterson *et al.*, 2006). Die oxidative Ringöffnung zur reaktiven α,β -ungesättigten Carbonylverbindung wurde ebenfalls unter Einsatz eines Abfangreagenz in HLM, RLM und Mauslebermikrosomen nachgewiesen. Auch hier zeigte sich eine große Variabilität zwischen HLM verschiedener Spender. Es verdeutlicht die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen, um eine definitive Aussage über die speziesspezifische Metabolisierung von MF zu machen. Als Schlüsselenzym für die BDA-Bildung aus Furan wurde in der gleichen Studie ebenfalls CYP 2E1 identifiziert (Gates *et al.*, 2012). Diese Erkenntnisse bestärkt die Hypothese, dass MF einem ähnlichen toxisierenden Metabolismus wie Furan unterliegt, was entscheidend für Vergleiche in der Risikobewertung ist.

4.3.2. Enzymkinetische Parameter

Die dosisabhängigen Messungen der AcA-Bildung aus der 10-minütigen Inkubation von MF in RLM, HLM und CYP 2E1 bildeten die Grundlage für die Berechnung enzymkinetischer Parameter. Als typische Größen wurde die Michaelis-Menten-Konstante K_M und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} , bzw. die Wechselzahl k_{cat} für SupersomesTM kalkuliert. Daraus wurde die katalytische Effizienz E_{cat} für CYP 2E1, bzw. die *in vitro*-intrinsische Clearance CL_{int} berechnet. Die grundlegenden Formeln und Entscheidungskriterien für die Wahl des adäquaten Berechnungsmodells sind in Kap. 6.7 aufgeführt.

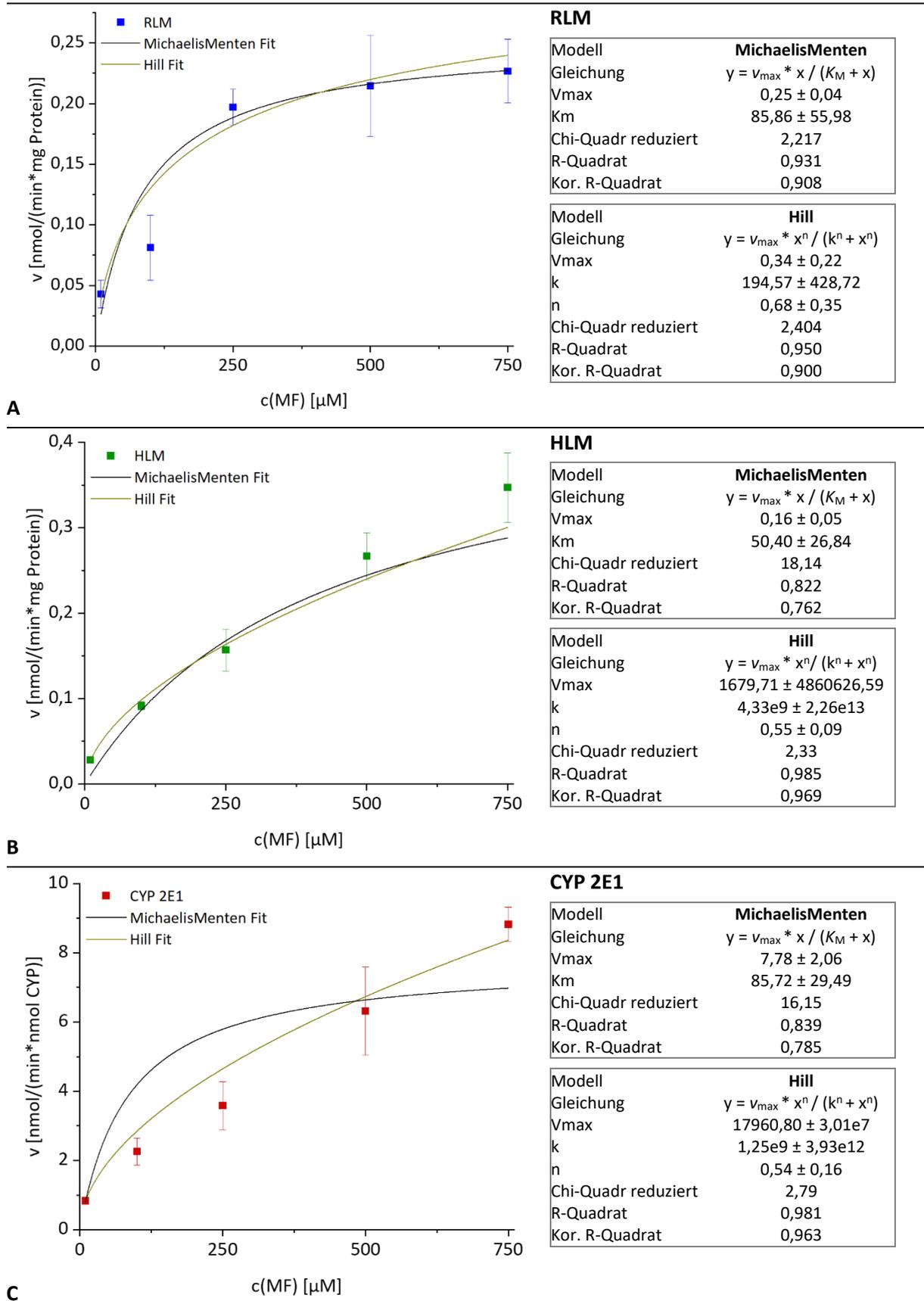
Die Parameter abgeleitet aus der Auftragung der Daten nach dem Michaelis-Menten- und Hill-Modell sind in Abb. 55 dargestellt. Sie modellieren eine Annäherung an die tatsächlichen Probenwerte, jedoch wurde insbesondere das erste Kriterium der Konvergenz nicht bei allen Inkubationen erreicht. Zudem wurde über den Hill-Faktor ($n_H < 1$) eine negative Kooperativität festgestellt. Dies kann ein Hinweis auf eine biphasische Enzymreaktion sein, welche es mittels Eadie-Hofstee-Plot zu überprüfen galt.

Die Darstellung der Daten im Eadie-Hofstee-Diagramm (Abb. 56) zeigte unterschiedliches Verhalten bei verschiedenen Konzentrationen. Abb. 57 fasst die hierüber kalkulierten enzymkinetischen Parameter zusammen. Alle drei Enzymsysteme zeigten das Muster eines schnellen Metabolismus bei hohen Substratkonzentrationen und einer kleinen Maximalgeschwindigkeit bei kleinen MF-Konzentrationen. Sie können in Abschnitte von hoher Affinität mit geringer Kapazität (K_M klein) und Bereiche geringer Affinität mit hoher Kapazität

(K_M groß) eingeteilt werden. Die beiden Phasen werden durch die zwei Gleichungen angegeben, die Grundlage für die Berechnung der kinetischen Größen waren. Zu beachten ist, dass die Daten basierend auf einer Zweipunktgleichung (Geraden II) besonders bei den niedrigen Konzentrationen mit Vorsicht zu behandeln sind. Sie geben jedoch einen guten Anhaltspunkt und werden durch das wiederkehrende Auftauchen in allen drei Enzymsystemen untermauert.

Nach den priorisierten Kriterien (Kap. 6.7) ist für die Inkubation mit HLM sowie CYP 2E1 die Auftragung nach Eadie-Hofstee das Modell der Wahl. Bei hohen Substratkonzentrationen mit RLM wurde jedoch eine schwache korrelative Übereinstimmung bei Inklusion der vier höchsten Konzentrationen (Wert 1–4) ermittelt. Ebenso lässt die Lage der Geraden zueinander auf eine eingeschränkte Repräsentation der Werte durch das Modell schließen (siehe Abb. 56). Zwar lässt die Exklusion einzelner Datenpunkte eine bessere Interpretation zu, jedoch kann deren Ausschluss nicht statistisch begründet werden. Daher wurde für den Umsatz von MF mit RLM K_M und v_{max} konservativ aus dem Hill-Fit abgeleitet. Die Parameter liegen allerdings innerhalb des Standardfehlers der Werte abgeleitet aus der Eadie-Hofstee-Auftragung, was deren Repräsentativität stützt.

So deutet die maximale Geschwindigkeit auf eine effektive oxidative Ringöffnung von MF zu AcA durch RLM, HLM und CYP2E1 hin.



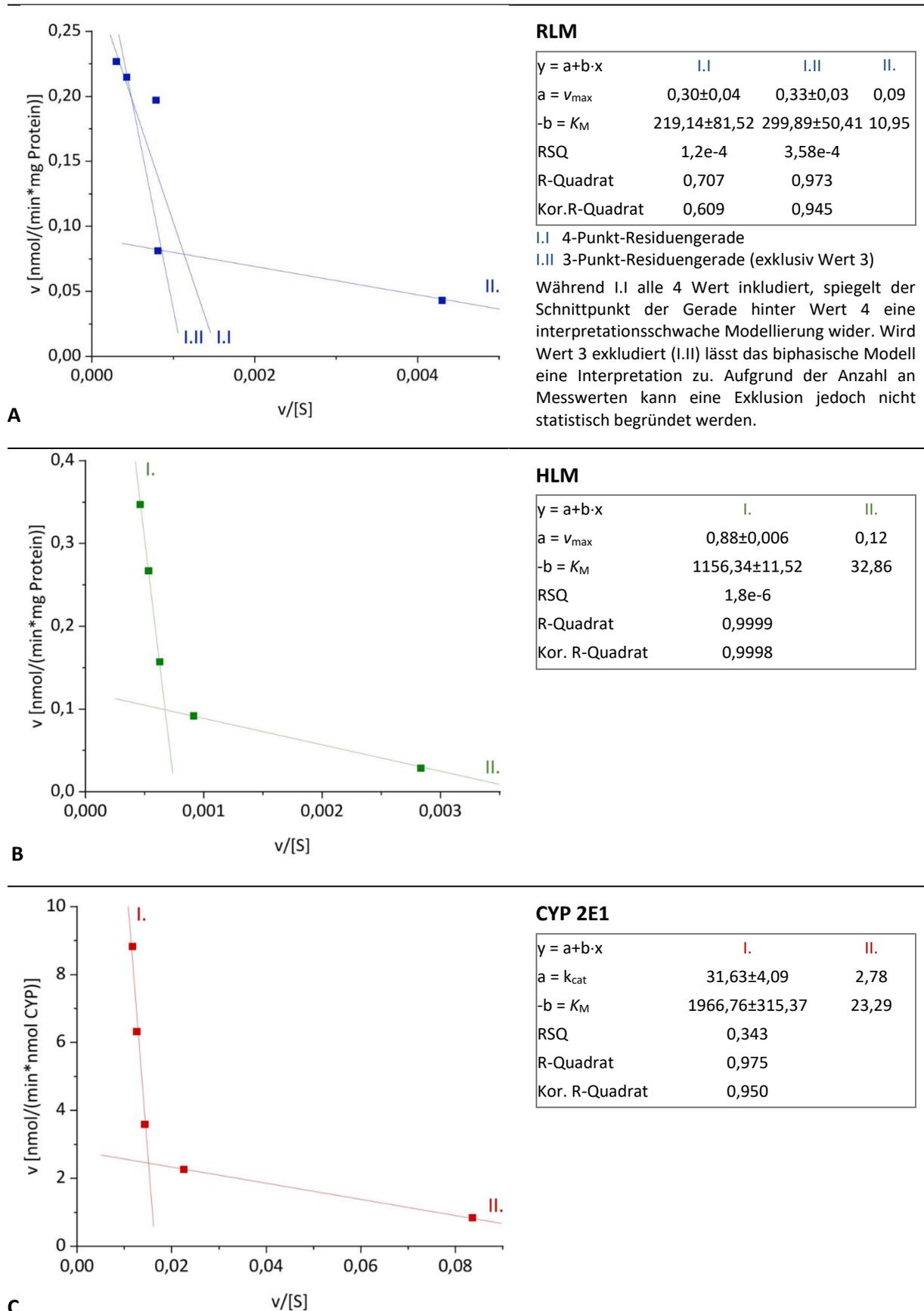


Abb. 56: Eadie-Hofstee-Plots und abgeleitete Parameter für die AcA-Bildung in RLM (A), HLM (B) und CYP 2E1 (C) nach Inkubation mit 10, 100, 250, 500 oder 750 μM MF. Parameter wurden bestimmt als v_{\max} für Mikrosomen, bzw. k_{cat} für Supersomes. AcA: 3-Acetylacrolein, CYP: Cytochrom P450, HLM: humane Lebermikrosome, MF: 2-Methylfuran, RLM: Rattenlebermikrosome, RSQ: Residuenquadratsumme.

Tab. 24: Enzymkinetische Parameter der AcA-Bildung eigener Ergebnisse im Vergleich zu Daten aus der Literatur. Im biphasischen System steht (I) für die Reaktion bei hohen Substratkonzentrationen (250, 500, 750 μM) und (II) für die Reaktion bei niedrigen Substratkonzentrationen (10, 100 μM). *) Mikrosomen aus Phenobarbital vorbehandelten Ratten. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden Literaturwerte ggf. in die entsprechende Einheit umgerechnet und gerundet (siehe elektronischer Anhang III). CYP: Cytochrom P450, HLM: humane Lebermikrosome, LM: Lebermikrosomen, MF: 2-Methylfuran, RLM: Rattenlebermikrosome, unbeh.: unbehandelt Ratten, vorbeh.: vorbehandelte Ratten.

Substrat	Testsystem	$v_{\max} k_{\text{cat}}^*$ [$\mu\text{mol}/(\text{mg Prot.}\cdot\text{min})$] [$\mu\text{mol}/(\mu\text{mol CYP}\cdot\text{min})$]	K_M [μM]	$CL_{\text{int}} E_{\text{cat}}^\#$
<i>Eigene Messungen: Bestimmt als AcA-Addukt (HPLC-MS/MS) nach mikrosomaler Inkubation (mit 10–750 μM MF)</i>				
MF	RLM, unbeh.	I) 0,34; II) 0,09	I) 194,57; II) 10,95	I) 1,7e-3; II) 8,2e-3
	HLM	I) 0,88; II) 0,12	I) 1156,34; II) 32,86	I) 7,6e-4; II) 3,6e-3
	CYP 2E1	I) 31,68; II) 2,78	I) 1966,76; II) 23,29	I) 1,6e-2; II) 1,1e-1
<i>Ravindranath und Boyd (1985): Bestimmt als mikrosomal gebundenes, radioaktives Signal aus ^{14}C-MF (2,5–20 mM gesamt MF)</i>				
MF	RLM, unbeh.	0,27	1417	1,9e-4
	RLM, vorbeh.	0,41	463	8,9e-4
<i>Peterson et al. (2005): Bestimmt als BDA-Addukt (HLPC-MS/MS) nach mikrosomaler Inkubation (10–500 μM)</i>				
Furan	RLM, unbeh.	$0,0025 \pm 0,1$	$37,6 \pm 4,3$	$6,6e-5$
	RLM, vorbeh.	$0,0059 \pm 0,5$	$18,5 \pm 6,8$	$3,2e-4$
	CYP 2E1	26	$65,1 \pm 16,4$	$3,9e-1$
<i>Gates et al. (2012): Bestimmt als BDA-Addukt (HPLC-MS/MS) nach mikrosomaler Inkubation (LM: 50 μM Furan, CYPs: 20 oder 400 μM Furan)</i>				
Furan	RLM, unbeh.	0,0016		
	HLM	0,0013		
	CYP 2E1	34 ± 4	24 ± 13	1,4

In Tab. 24 wurden die enzymkinetischen Parameter der AcA-Bildung im eigenen Testsystemen mit Daten vergleichbarer Durchführungen aus der **Literatur** verglichen.

Ravindranath und Boyd (1985) bestimmten über die Auftragung der Daten im Eadie-Hofstee-Diagramm aus der Inkubation RLM unbehandelter Ratten ein $v_{\max} = 0,53 \mu\text{mol}/2 \text{ mg}$ mikrosomalem Protein/min mit $K_M = 1,417 \text{ mM}$. Wurden die Ratten mit Phenobarbital vorbehandelt, wurde ein $v_{\max} = 0,81 \mu\text{mol}/2 \text{ mg}$ mikrosomalem Protein/min und $K_M = 0,463 \text{ mM}$ erreicht. Die Gesamt-MF-Konzentrationen von 2,5–20 mM lagen weit über den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen. Die Parameter in Tab. 24 zeigen dennoch vergleichbare v_{\max} (0,27; bzw. 0,41 $\mu\text{mol}/(\text{mg Prot.}\cdot\text{min})$) unbehandelter, bzw. vorbehandelter RLM) mit dem Hochkonzentrationsbereich der eigenen Messungen (0,34 $\mu\text{mol}/(\text{mg Prot.}\cdot\text{min})$). Auch der Parameter K_M verweist auf die hohen Konzentration, welche von Ravindranath und Boyd (1985) verwendet wurden. Anzumerken ist, dass es sich wieder um die indirekte Messung eines reaktiven Metaboliten als die Menge radioaktiv markiertem

Material gebunden an isoliertes, mikrosomales Protein handelt. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit AcA mit AcLys abgefangen und das spezifische Addukt (AcLys-AcA) direkt detektiert. Somit spiegelt es das frei zugängliche AcA wider, das Potential zur Reaktion mit zellulären Bestandteilen besitzt. Für die Beurteilung der Toxikodynamik und -kinetik ist die Aussage über frei vorliegendes AcA, das nicht an mikrosomales Protein gebunden ist, von Vorteil. Dennoch kann die Inaktivierung und weiterführend Depletion von CYP durch die Bindung von AcA (als Suizidsubstrat) von Bedeutung für den weiteren Fremdstoffmetabolismus sein.

Zum Vergleich ist der mikrosomalen Umsatzes von Furan zu BDA in Tab. 24 zusätzlich aufgeführt. In beiden Literaturquellen wurden RLM, HLM sowie CYP(s) mit Furan inkubiert und das reaktive Intermediat BDA in Anwesenheit von AcLys und AcCys im Überschuss als Konjugat via HPLC-MS/MS detektiert. Über die Inkubation un-/behandelte RLM aber auch HLM wurden deutlich geringe Reaktionsgeschwindigkeiten ermittelt als für MF. Dies betraf Inkubationsbereiche von 10–500 μM Furan (Peterson *et al.*, 2005; Gates *et al.*, 2012). Die Inkubation verschiedener CYPs mit 20 oder 400 μM Furan charakterisierte CYP 2E1 mit $K_M = 24 \pm 13 \mu\text{M}$ und $v_{\text{max}} = 34 \pm 4 \text{ pmol BDA/pmol CYP/min}$ als Schlüsselenzym für die metabolische Aktivierung von Furan (Gates *et al.*, 2012). Damit lag die Konstante K_M von Furan im Bereich der K_M niedriger Substratkonzentration von MF (eigener Messungen), während die Wechselzahl $k_{\text{cat}}(\text{Furan})$ der k_{cat} von MF (eigener Messungen) bei hoher Substratkonzentration entsprach. Da für Furan nur zwei Inkubationskonzentrationen gewählt wurden (Gates *et al.*, 2012), ist hier kein Vergleich hinsichtlich einer biphasischen Reaktionskinetik möglich.

4.3.3. Umsatzrate von MF

Zuletzt sollte die Umsatzrate zu AcA in Relation zur eingesetzten Substratmenge MF betrachtet werden, um den Einfluss verschiedener Substratkonzentrationen zu erfassen. Dazu wurde in Abb. 57 die gebildete Stoffmenge von AcA (n_{AcA}) pro eingesetzter Stoffmenge MF (n_{MF}) dosisabhängig aufgetragen. In allen drei Enzymsystemen war der relative Umsatz in n-% signifikant am höchsten in der kleinsten Substratkonzentration von 10 μM MF. Es folgte ein schneller Abfall der Umsatzrate in den höheren Konzentrationen von 100–750 μM auf ein Plateau. Das kann für einen inhibitorischen Effekt von AcA oder MF als Suizidsubstrat in den höheren Konzentrationen sprechen.

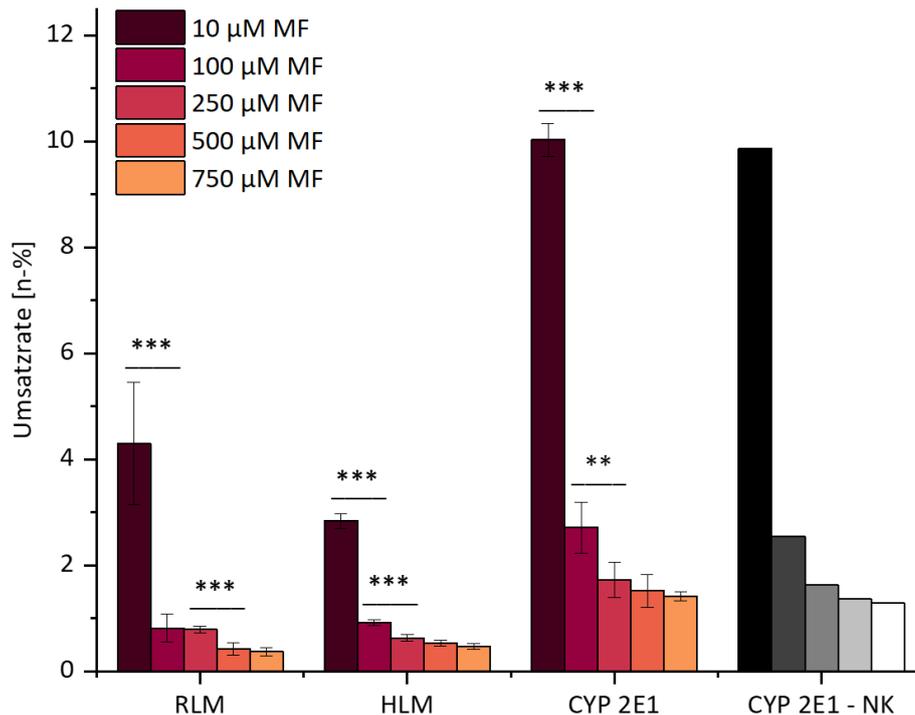


Abb. 57: Relative Umsatzrate [n-%] der Enzyme zu AcA bezogen auf eingesetzte Stoffmenge MF. Vergleich von RLM, HLM, CYP 2E1 und CYP 2E1 mit Abzug der Negativkontrolle (-NK). $n = 3-5$, Mittelwert \pm Standardabweichung, Signifikanzen getestet mittels ungepaartem, zweiseitigem T-Test mit (*) $P < 0,05$ signifikant, (**) $P < 0,01$ hoch signifikant, (***) $P < 0,001$ höchst signifikant. AcA: 3-Acetylacrolein, CYP: Cytochrom P450, HLM: humane Lebermikrosome, MF: 2-Methylfuran, RLM: Rattenlebermikrosome.

Der Anteil der NK an der Gesamtumsatzrate n_{AcA}/n_{MF} wurde als gering (deutlich innerhalb der Standardabweichung) ohne Einfluss auf die Aussagekraft (mit proportionalem Verhalten) festgestellt (Abb. 57). Zwar stellte sich damit auch die weiterführende Frage inwiefern der Fremdstoff-/Metabolismus anderer Substanzen von einer Überladung mit MF beeinflusst werden können, jedoch sind die betroffenen Bereiche jenseits physiologischer Relevanz in der Leber. Der Vergleich der relativierten Umsatzraten nach 120 min spiegelt die beobachteten Proportionen in Abb. 54 wider: CYP2E1 > HLM > RLM (100 µM MF: 8 %; 2%; 1 %, bzw. 500 µM: 5 %; 3%; 1 %).

Auch Ravindranath *et al.* (1984a) beschrieben die Inhibition des Metabolismus ab 500 µM, die sich durch keine Bindung von ^{14}C -markiertem Material an isoliertes, mikrosomales Protein bemerkbar machte. Dem gleichen Messprinzip folgend wurde Furan als Suizidsubstrat beschrieben (Parmar und Burka, 1993).

Fazit zur metabolischen Aktivierung von MF

Es wurde die metabolische Aktivierung von MF zu AcA in RLM bestätigt und in HLM erstmals nachgewiesen. Für die oxidative Ringöffnung von MF wurde CYP 2E1 als Schlüsselenzym innerhalb der untersuchten Supersomes™ (CYP 1A2, 2A6, 2C9, 2D6, 2E1, 3A4) erstmals gezeigt, was analog zum bereits bekannten Metabolismus von Furan zu BDA ist. Die relative Umsatzrate bezogen auf die eingesetzte Substratkonzentration [n-%] deuten auf einen inhibitorischen Effekt von MF als Suizidsubstrat hin.

4.4. Adduktbildung und Toxizität von 2-Methylfuran und 3-Acetylacrolein *in vitro*

Es konnte gezeigt werden, dass MF durch Phase I-Enzyme der Leber zu AcA metabolisch aktiviert wird (Kap. 4.3.1). Parallel wies die α,β -ungesättigte Carbonylverbindung *in chemico* eine hohe Reaktivität gegenüber Aminosäure-Derivaten und DNA auf (Kap. 4.2.2.3). Ob und in welchem Ausmaß dies auf die zelluläre Ebene übertragbar ist, soll in diesem Kapitel betrachtet werden. Die konkreten Fragen lauteten: Sind die Aminosäure-Addukte AcLys-AcA und AcCys-AcA im Zellüberstand mit MF behandelte Zellen nachweisbar? Und werden die identifizierten DNA-Addukte zellulär tatsächlich gebildet? Der Nachweis von AcA-Addukten ließe die tatsächliche Bildung von AcA in der Zelle schlussfolgern. Um die Muster an potentiellen Addukt Mengen zu vergleichen und direkte Rückschlüsse zwischen MF und AcA ziehen zu können, wurden alle Inkubationen mit MF und AcA durchgeführt. Insbesondere für die Wahl der Inkubationskonzentrationen wurde zu Beginn die Zytotoxizität beider Substanzen untersucht. Ziel war Konzentrationen verschieden zytotoxischer Effektlevel zu ermitteln. Die jeweils niedrigste Konzentration sollte keine Zytotoxizität induzieren, während die höchste die relative Vitalität der Zellen auf 60–70 % reduzieren sollte. Als hepatische Testsysteme dienten pRH, die mit der metabolisch weniger kompetenten Zelllinie HepG2 verglichen wurde (Kap. 4.4.1). Für die Untersuchung der Addukt Mengen wurden ausschließlich die metabolisch kompetenteren Zellen mit MF oder AcA inkubiert. Nach Ablauf von 1–48 h wurden die Zellüberstände von den Zellen separiert aufgearbeitet. Via UHPLC-MS/MS wurden Aminosäure-Addukte im aufgearbeiteten Medium bestimmt (Kap. 4.4.2), während die aus den Zellen extrahierte DNA hydrolysiert auf die Bildung von DNA-Addukten hin untersucht wurde (Kap. 4.4.3).

4.4.1. Zytotoxizität von MF und AcA *in vitro*

Zur Bestimmung zytotoxischer Effekte wurden pRH als auch HepG2-Zellen mit MF oder AcA inkubiert und anschließend mittels Resazurin-Reduktions-Assay die relative Vitalität ermittelt. Der auf der Anwesenheit von Reduktionsäquivalenten beruhende Test spiegelt somit auch die Stoffwechselaktivität der Zelle wider. Im Gegensatz zu HepG2-Zellen ist bei frisch isolierten pRH nicht mehr von aktiver Zellteilung auszugehen sowie von einer Abnahme der Vitalität ab 48–72 h. Das stellte den limitierenden Faktor für die Inkubationsdauer dar, die in Zeiträumen von 1, 6, 18, 24 und 48 h aufgeteilt wurden. Als Negativkontrolle wurde 0,1 % DMSO, dem den Proben entsprechenden Gehalt des Lösungsmittels, mitgeführt.

Abb. 58 stellt dosisabhängig die relative Vitalität von pRH der permanenten Zelllinie HepG2 gegenüber, die je 24 h mit 0,1–10 mM MF inkubiert wurden. In beiden Testsystemen wurde die Vitalität der Zellen durch die kleinste Konzentration von 0,1 mM MF nicht beeinträchtigt. Sie fiel mit zunehmender MF-Gabe bis auf 2,4 % in pRH (5 mM MF), bzw. 9,8 % in HepG2 (10 mM MF) ab. Es wurden für die Zytotoxizität von MF ein EC_{50} -Wert von $0,55 \pm 0,04$ mM MF

in pRH, bzw. $5,53 \pm 0,36$ mM MF in HepG2-Zellen ermittelt (sigmoidaler Fit, Dose Response). Der Wert weist auf eine deutlich erhöhte Zytotoxizität von MF in pRH im Vergleich zu HepG2-Zellen hin.

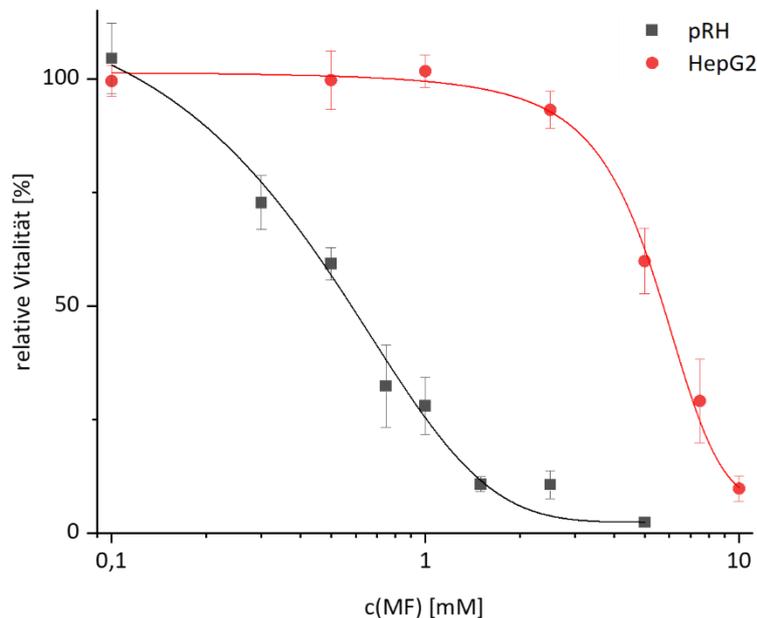


Abb. 58: Zytotoxizität von MF (0,1–10 mM) in pRH und HepG2-Zellen nach 24 h-Inkubation via Resazurin-Reduktions-Assay. Gemessen als relative Vitalität [%] durch Bezug auf Negativkontrolle (DMSO, 0,1 %). $n = 3-5$, berechnet als Mittelwert \pm Standardabweichung, Sigmoidaler Fit nach Boltzmann. MF: 2-Methylfuran, pRH: primäre Rattenhepatozyten.

Die naheliegende Erklärung basiert auf der unterschiedlichen metabolischen Kapazität der beiden Testsysteme. In der Literatur wurde im Vergleich zu primären Hepatozyten in HepG2-Zellen eine reduzierte Expression der Phase-I-Enzyme kombiniert mit einer erhöhten Produktion von Phase II-Enzymen beschrieben. Ein protektiver Effekt Promutagenen (bzw. proaktiven Substanzen) gegenüber kann nicht ausgeschlossen werden, was zu falsch negativen Ergebnissen führen kann (Wilkening *et al.*, 2003; Hart *et al.*, 2010). So lassen die hier erzielten Ergebnisse zur Zytotoxizität die zuvor gezeigten Erkenntnisse zur metabolischen Aktivierung von MF vermuten, dass die Metabolisierung zu AcA und dessen Reaktivität für die toxischen Effekte von MF verantwortlich sein könnte. In anderen Quellen wurde für Rattenhepatozyten in Primärkultur von 2sFou-Hepatomazellen ein IC_{50} -Wert (als Reduktion der Zellzahl um 50 %) von 800 ± 56 μ M ermittelt. Wurden die Zellen mit Phenobarbital oder β -Naphthoflavon vorbehandelt, wurde dieser reduziert auf 32 ± 5 μ M, bzw. 84 ± 44 μ M (Fry *et al.*, 1990). Ein ähnliches Verhalten wurde in pRH von Wistar-Ratten beschrieben. Eine 24 h-Inkubation pRH aus unbehandelten Ratten 24 h führte zu einem EC_{50} -Wert von 794 μ M MF (Median, Range: 668–944 μ M). Durch Vorbehandlung *in vivo* mit Phenobarbital und β -Naphthoflavon reduzierte sich die LD_{50} *in vitro* um 77 %, bzw. 86 % (Phenobarbital: 34 μ M Median, Range: 10–45 μ M; β -Naphthoflavon: 57 μ M Median, Range: 10–211 μ M) (Hammond und Fry, 1991). Die erhöhte Toxizität nach Vorbehandlung mit CYP-Induktoren hebt erneut die Rolle der Monooxygenierung durch CYP hervor. Unter Berücksichtigung, dass eine andere

Zelllinie (HepG2) genutzt wurde und der Endpunkt auf einem anderen Messprinzip beruht, liegen die hier ermittelten Messwerte in der gleichen Größenordnung wie die Literaturwerte.

Daraufhin wurden die weiteren Untersuchungen nur noch in pRH als das repräsentativere Testsystem durchgeführt. Die Ausprägung des zytotoxischen Effekts wurde in Zeiträumen getestet, wie sie auch später für die Untersuchung der Adduktbildung vorgesehen waren. In Abb. 59 ist die relative Vitalität von pRH nach 1, 6, 18, 24 oder 48 h-Inkubation mit (A) 0,05–5 mM MF und (B) 0,1–100 μM AcA abgebildet. Für AcA wurde ein EC_{50} -Wert von $8,5 \pm 1,3 \mu\text{M}$ nach 24 h in pRH ermittelt. In beiden Fällen war ein zeit- und dosisabhängiger Verlauf ersichtlich, wobei durchschnittlich um den Faktor 100 geringere Konzentrationen an AcA im Vergleich zu MF notwendig waren, um die Zellen zu schädigen. Bei der Inkubation mit MF ist eine zeitliche Verzögerung des toxischen Effekts erkennbar. So lag auch in der höchsten Konzentration von 5 mM MF die relative Vitalität nach 1 h noch bei 76 %, sank jedoch mit der Zeit auf 66 % (6 h), 26 % (18 h) und schließlich 2 % nach 24 h. Der EC_{50} -Wert von MF lag für die 24-stündige Inkubation bei $551,1 \pm 53,5 \mu\text{M}$. Im Gegensatz dazu wurde bei den Inkubationen mit AcA eine geringere Differenz zwischen den Zeitintervallen einer Konzentration beobachtet. Dies ließ vermuten, dass, während MF noch metabolisch aktiviert werden muss, um zytotoxische Wirkungen zu zeigen, AcA als bereits reaktiver Metabolit direkt zytotoxisch wirken kann.

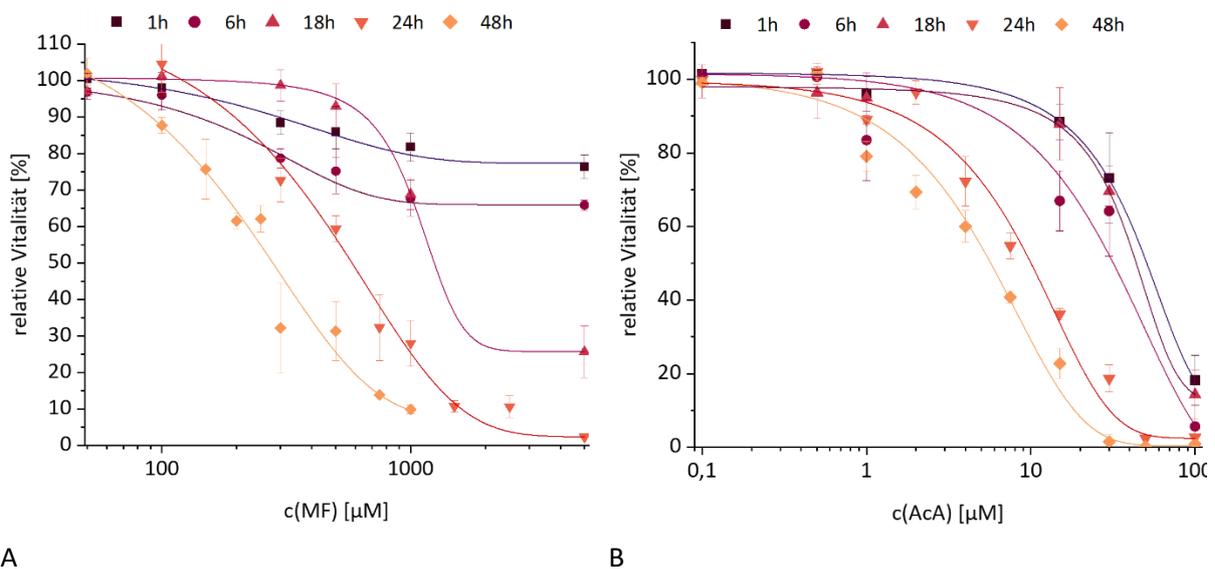


Abb. 59: Zytotoxizität von (A) MF und (B) AcA in pRH, zeit- und dosisabhängig via Resazurin-Reduktions-Assay. Gemessen als relative Vitalität [%] durch Bezug auf Negativkontrolle (DMSO, 0,1 %). $n = 3-5$, berechnet als Mittelwert \pm Standardabweichung, Sigmoidaler Fit nach Boltzmann. AcA: 3-Acetylacrolein, MF: 2-Methylfuran, pRH: primäre Rattenhepatozyten.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Konzentrationen für die Untersuchung der Adduktbildung festgelegt, um den Bereich von 60-70 % bis 100 % relativer Vitalität in den untersuchten Zeitintervallen abzudecken. Für AcA ergab dies Inkubationskonzentration von 0,1, 0,5, 1 und 5 μM , während MF in Konzentrationen von 10, 50, 100, 500 und 1000 μM eingesetzt wurde. Die höchste Konzentration MF fiel für die längere Inkubationsdauer aus den

zuvor definierten Bereichen hinsichtlich der Minimalvitalität, wurde jedoch für Grenzbewertung mitgeführt.

4.4.2. Bildung von Aminosäure-Addukte *in vitro*

Ziel war die Untersuchung von MF und AcA in pRH bezüglich potentieller Biomarker der Exposition aber auch des Effekts. Die gegebenenfalls einhergehende Charakterisierung der zellulärer Toxikokinetik könnte zum Nachweis der AcA-Bildung in pRH herangezogen werden. Dazu wurden pRH mit MF (10, 50, 100, 500, 1000 μM) oder AcA (0,1; 0,5; 1; 5 μM) inkubiert und nach 1, 6, 18, 24 sowie 48 h der Zellüberstand gemäß Kap. 6.8.5 aufgearbeitet. Hierzu wurde im Vorfeld auf Grundlage einer in der Arbeitsgruppe entwickelten SPE-Methode zur Aufreinigung von BDA-Addukten die Methode für AcA-Addukte modifiziert. Via der in Kap. 6.5.2 entwickelten (U)HPLC-MS/MS-Methoden wurde die Bildung von AcCys-AcA und AcLys-AcA untersucht. Die entsprechenden Wiederfindungsraten und Parameter der Methodvalidierung sind in Kap. 6.8.5 aufgeführt. Als Negativkontrolle wurde eine Endkonzentration von 0,1 % DMSO mitgeführt, entsprechend dem Gehalt in den Proben.

4.4.2.1. Bildung von AcCys-AcA in pRH

In Vorversuchen konnte kein Hinweis auf die Bildung von AcCys-AcA in den Zellüberständen mit MF oder AcA inkubierter pRH beobachtet werden. Die Wiederfindung nach der Probenaufbereitung mittels SPE zeigte im Grenzbereich, dass 10 nM AcCys-AcA noch quantitativ detektiert werden konnte ($S/N=5$). Daher wurde kein interner Standard für AcCys-AcA etabliert, sondern lediglich mittels dem internen Standard von AcLys-AcA (AcLys-BDA) quantifiziert. Es wurden alle Proben des Hauptversuchs nach AcCys-AcA gescreent, was das Resultat der Vorversuche bestätigte.

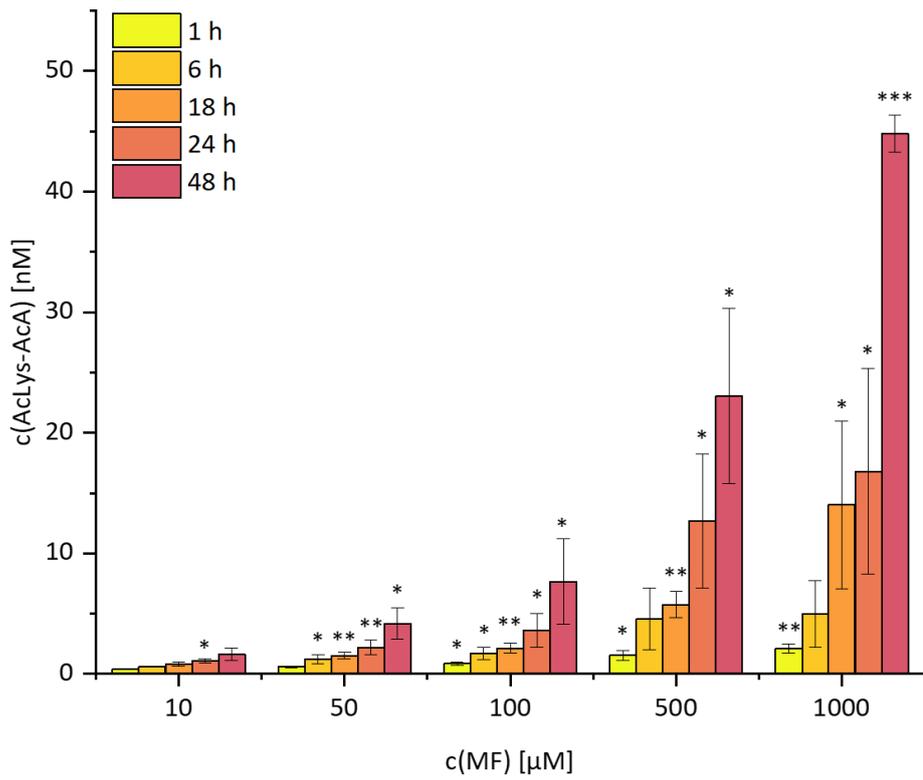
Vor Beginn der Untersuchungen lag die Hypothese vor, dass AcCys-AcA als Reaktionsprodukt nach Exposition mit AcA oder metabolischer Aktivierung von MF in pRH entstehen könnte. Addukte von AcCys können über den Abbau von GSH-Addukten zu Mercaptursäure entstehen, wie es für Acrylamid oder Acrolein der Fall ist (Watzek *et al.*, 2012). Die Hypothese konnte hier nicht bestätigt werden. Weiterführende Untersuchungen von Daniel Bohlen (in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Richling, TU Kaiserslautern) konnten keine Depletion von GSH in pRH oder HepG2-Zellen nach Belastung mit MF feststellen (unpublizierte Daten). Dies lässt die Vermutung zu, dass die Konjugation an GSH nicht den primären Detoxifizierungsschritt für AcA darstellt. Im Gegensatz dazu ist die Bildung von GSH-BDA-Addukten bei Furan-Exposition *in vitro* als auch *in vivo* bekannt (Peterson *et al.*, 2006).

4.4.2.2. Bildung von AcLys-AcA in pRH

Im Gegensatz zu den Beobachtungen bezüglich AcCys-AcA konnte in den Vorversuchen die Bildung von AcLys-AcA in den Zellüberständen von pRH nach Inkubation beider Testsubstanzen detektiert werden. Im Zuge der Validierung der SPE- als auch HPLC-MS/MS-Methode zeigte sich AcLys-BDA als interner Standard für AcLys-AcA als geeignet. Entsprechende Wiederfindungsversuche sind im Abschnitt zur Methodvalidierung zu finden (Kap. 6.8.5). Zunächst wurden die Proben mit HPLC-ESI⁺-MS/MS Methode I (Kap. 6.5.2.3) vermessen. Jedoch lag die massenspektrometrische Intensität der niedrigen Inkubationskonzentrationen und Negativkontrolle zwischen dem LOD und LOQ. Durch Reetablierung der Methode am sensitiveren Massenspektrometer (Methode II) konnten alle Proben quantitativ erfasst werden, deren Ergebnis in Abb. 60 dargestellt wurde. Die Methodik und Validierungsparameter sind dem Experimentalteil in Kap. 6.5.2.3 zu entnehmen.

Auffallend war der Nachweis von AcLys-AcA in den **Negativkontrollen**, welche mit beiden Methoden, sprich an beiden Geräten in übereinstimmenden Gehalten nachgewiesen wurde (Abb. 60, B). Nach dem Ausschluss messtechnischer Fehler oder Kontamination wurden der Übertritt von flüchtigen MF aus Proben in die Negativkontrollen im Inkubationsraum geprüft. Dazu wurden drei unabhängige Experimente mit jeweils frisch isolierten pRH einzeln mit 0,1 % DMSO wie die Negativkontrolle inkubiert. Zusätzlich wurden nicht-exponierte pRH mitgeführt, um einen Einfluss des Lösungsmittels auszuschließen. In beiden Ansätze (pRH inkubiert mit/ohne 0,1 % DMSO, $n = 3$) wurden die gleichen Gehalte an AcLys-AcA wie in der Negativkontrolle erfasst, die zusammen mit den MF-inkubierten Proben durchgeführt wurde. So konnte ein Transfer von MF in die Negativkontrollen während der Inkubation ausgeschlossen werden. Da in reinem Kulturmedium ohne Zellen keine Addukte detektierbar waren, stellte sich die Frage nach einer endogenen Bildung von AcLys-AcA in unbehandelten pRH. Eine hypothetische, endogene Quelle stellt die Lipidperoxidation dar. Dabei könnte nicht nur MF entstehen (Adams *et al.*, 2011), sondern auch AcA, bzw. 2-Oxo-4-alkenyle (Kawai und Nuka, 2018; Rentel *et al.*, 2005). Die Entstehung von AcA und dessen Vorläufer, insbesondere aus dem Abbau von Fettsäuren, wurde bereits ausführlich in Kap. 4.2.3.5 zur Reaktivität gegenüber DNA diskutiert. Dabei ist die Reaktion von AcA gegenüber Aminosäuren anstelle der DNA nicht auszuschließen. Die Isolation und Translokation der pRH zur Kultivierung stellt eine Stresssituation für die organoid gewachsenen Hepatozyten dar, was in der eingeschränkten Lebensdauer von maximal 72 h deutlich wird. Oxidativer Stress, weiterführend Lipidperoxidation, könnte somit eine hypothetische Ursache für die beobachtete Bildung von AcLys-AcA in der Negativkontrolle sein.

A



B

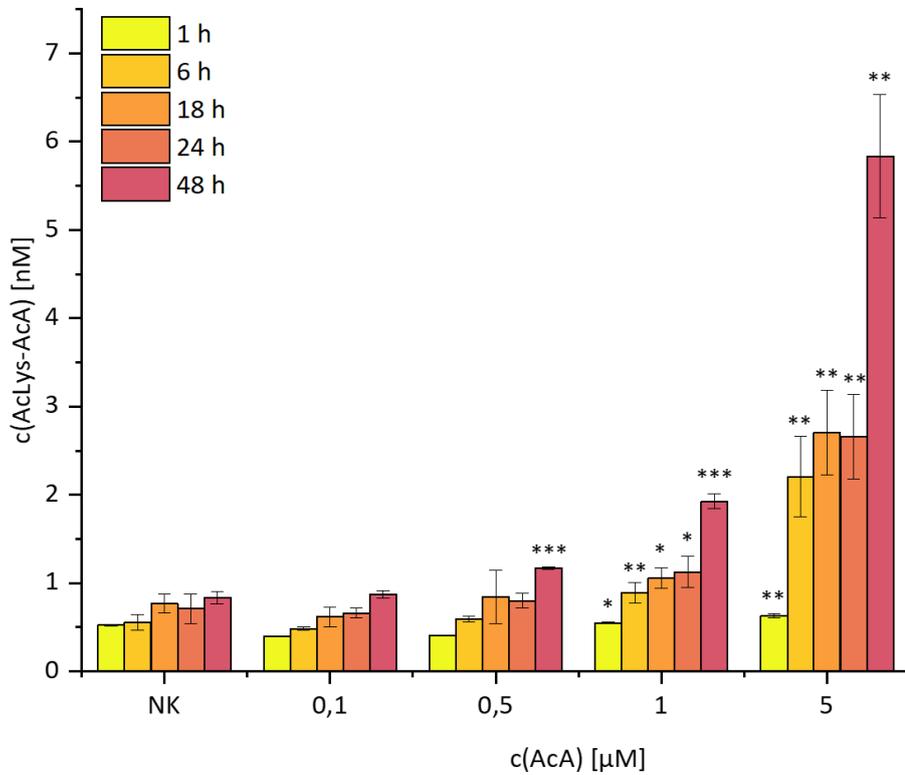


Abb. 60: Bildung von AcLys-AcA [nM] in pRH nach Inkubation mit (A) MF (10–1000 µM) und (B) AcA (0,1–5 µM). Die Signifikanzen wurden gegen die Negativkontrolle (NK; DMSO 0,1 %) getestet im einseitigen T-Test. $n = 3-5$, Mittelwert \pm Standardabweichung, Signifikanzen getestet mittels ungepaartem, einseitigem T-Test mit (*) $P < 0,05$ signifikant, (**) $P < 0,01$ hoch signifikant, (***) $P < 0,001$ höchst signifikant. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin, MF: 2-Methylfuran, pRH: primäre Rattenhepatozyten.

In den Zellüberständen mit **MF** exponierter Zellen konnte eine signifikante zeit- und dosisabhängige Bildung von AcLys-AcA beobachtet werden (Abb. 60, A). Nach 1 h zeigten Konzentrationen ab 100 μM MF einen signifikanten Anstieg des Addukts gegenüber der Negativkontrolle, während ab 6 h bereits 50 μM MF zu einer signifikante Differenz führten. Ausnahmen waren hier die 6-stündige Inkubationen mit 500 μM und 1000 μM MF, die durchschnittlich im zeitabhängigen Trend lag, jedoch aufgrund größerer Standardabweichungen nicht den einseitigen t-Test auf Signifikanz bestanden. Die Dosisabhängigkeit bestand bei allen Zeitpunkten, getestet zwischen 10 und 1000 μM , bzw. 100 μM bei 6 h (abweichende Testung aufgrund der hohen Standardabweichung in zwei höchsten Konzentrationen). Die weiteren Ergebnisse sind in Abb. 60 (A) dargestellt.

Abb. 60 (B) stellt dem die ebenfalls signifikant zeit- und dosisabhängige Bildung von AcLys-AcA nach Inkubation pRH mit **AcA** gegenüber. Bis auf die 48-stündige Inkubation, die sich bereits bei 0,5 μM AcA signifikant von der Negativkontrolle unterschied, wurde bei den übrigen Inkubationsdauern erst ab 1 μM AcA ein signifikanter Anstieg von AcLys-AcA festgestellt. 5 μM AcA führte jedoch zu einer höchst signifikanten Zunahme der Adduktlevel im Vergleich zur Negativkontrolle zu allen Zeitpunkten und wies eine Dosis- (gegen 0,1 μM) wie auch Zeitabhängigkeit (1 h gegen 6 h, 24 h gegen 48 h) auf. Die signifikante Veränderung über einen Zeitraum von 2 Tagen erscheint bei einer *in chemico* als schnell ablaufend charakterisierte Reaktion zunächst überraschend. Jedoch benötigen die zellulären Prozesse *in vitro* durchaus Zeit. Darunter fällt die Absorption in sowie Elimination aus der Zelle, aber auch gegebenenfalls der Abbau an AcA gebundener Peptide (oder Proteine) zu AcLys-AcA. Je nach Schritt kann sich somit die Eliminationsdauer unterscheiden.

Ergänzend wurde die stoffmengenbezogene **Umsatzrate** [in ppm] als gebildete Stoffmenge AcLys-AcA in Relation zur entsprechend eingesetzten Stoffmenge von MF, bzw. AcA berechnet. Teil A und B der Abb. 61 beschreibt zunächst die Umsatzrate ohne Berücksichtigung der Negativkontrolle von AcLys-AcA als antiproportional zum eingesetzten Substrat zu allen Zeitpunkten. Wurde die Negativkontrolle vom Probenwert abgezogen, wie in Teil C und D der Abb. 61 dargestellt, zeigte sich der Einfluss der Negativkontrolle auf die Umsatzrate. Durch Normierung auf die eingesetzte Substratmenge konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen MF (Abb. 61, C) festgestellt werden. Lediglich die Tendenz einer verringerten Bildung mit zunehmender Konzentration wurde beobachtet. Über die Interpretation als inhibitorischer Effekt auf die metabolisierenden Enzyme, wie es in Kap. 4.3.3 beschrieben wurde, lässt sich hier jedoch nur vermuten. Bezüglich der Veränderung der Umsatzrate über die Zeit ist eher von einer tendenziellen Zunahme zu sprechen. Gleiches ist auch im Fall der Umsatzrate von AcA zu AcLys-AcA exklusive der Negativkontrolle (Abb. 61, D) erkennbar. Diese könnte z. B. durch eine verzögerte Elimination von AcLys-AcA aus der Zelle in den Zellüberstand bedingt sein.

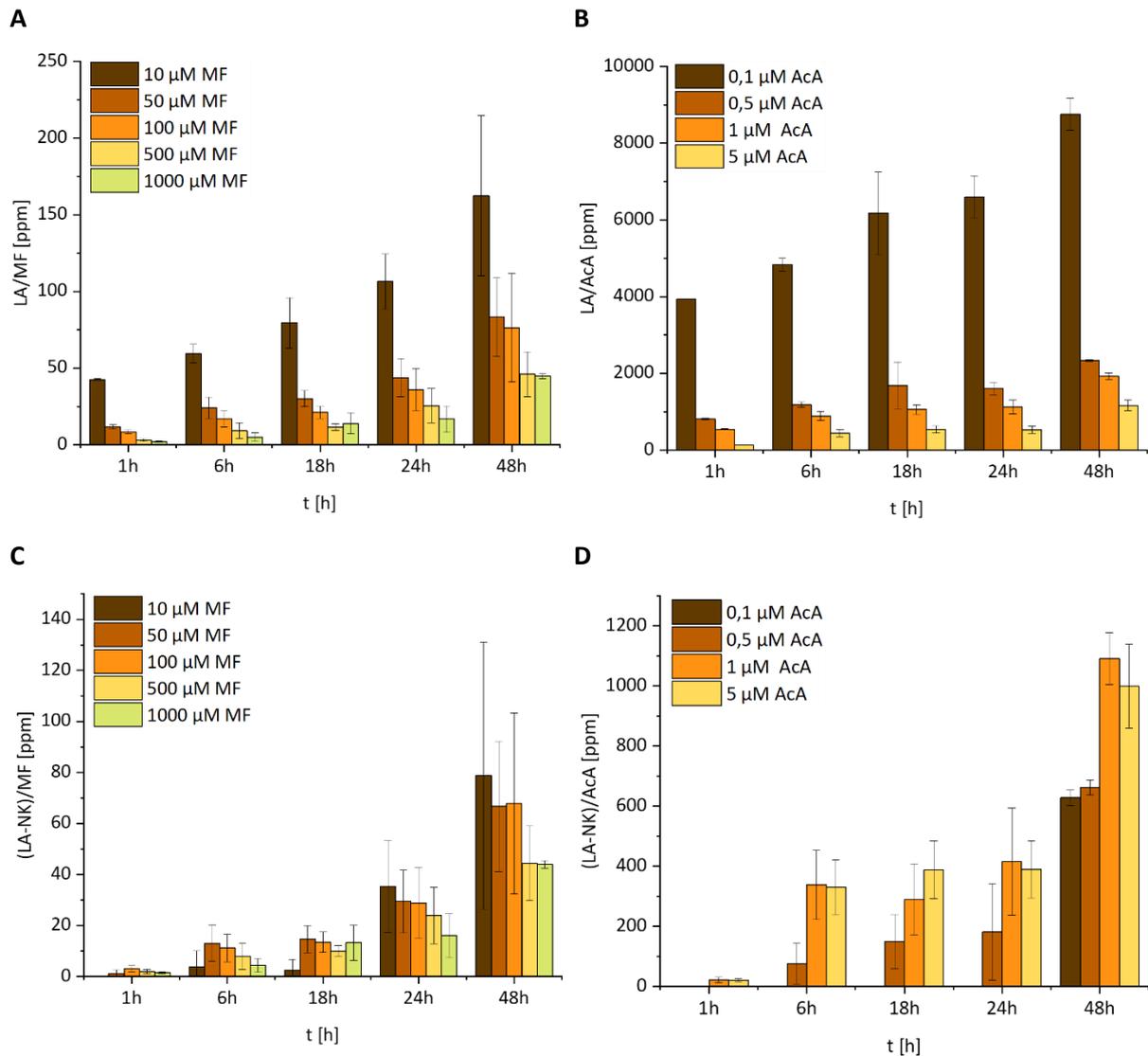


Abb. 61: Relative Umsatzrate [ppm] zu AcLys-AcA (LA) in pRH (1–48 h) bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge MF (10–1000 μM ; **A,C**) und AcA (0,1–5 μM ; **B,D**), ohne (**A,B**) und mit (**C,D**) Subtraktion der Negativkontrolle (NK; DMSO, 0,1 %). $n = 3–5$, Mittelwert \pm Standardabweichung. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_{α} -Acetyl-L-Lysin, MF: 2-Methylfuran, pRH: primäre Rattenhepatozyten.

Mit der Tatsache, dass durch Inkubation von pRH mit AcA das Addukt wie bei der Exposition mit MF mit analogen Bildungsmustern entstand, wurde die Metabolisierung von MF zu AcA *in vitro* erfolgreich nachgewiesen.

Daraufhin wurde in der Arbeitsgruppe in einer Pilotstudie humaner Urin nach Kaffeekonsum (als MF-haltige Lebensmittel) auf potentiellen Biomarker untersucht. In *untargeted* Messungen wurde ein zeitabhängiger Verlauf eines Molekülions mit m/z (sowie deren Fragmentierung) detektiert, der dem Addukt AcLys-AcA zugeordnet wurde. Da jedoch die Aufnahme an MF in der Studie nicht kannt war, kann hier keine Aussage über die Korrelation zwischen der Aufnahme von MF und der Ausscheidung von AcLys-AcA getroffen werden (Stegmüller *et al.*, 2020). Die Hypothese von AcLys-AcA als tatsächlicher Biomarker von MF gilt es somit in einer Humanstudie mit definierter MF-Aufnahme zu testen. Allerdings ist die Aufnahme in einer Lebensmittelmatrix, aus vielen verschiedenen Substanzen wie in Kaffee,

weitaus komplexer als die gezielte Belastung eines *in vitro*-Systems mit MF. Es bedarf somit einer klar definierten Studie mit isotopenmarkiertem internem Standard von AcLys-AcA. Insbesondere da AcLys-BDA aus der metabolischen Umsetzung von Furan, welches ebenfalls in Kaffee vorkommt, entstehen könnte. So beschrieben Gates *et al.* (2014) semiquantitativ die Bildung von AcLys-BDA im Medium von Hepatozyten aus Ratten, Mäusen und humanen Proben. Ebenso wiesen sie die multiple Adduktbildung von BDA mit GSH in Kombination weiterer Bindungspartner wie Lysin oder Glutamin nach. Auch wenn die Reaktivität von AcA im Vergleich zu BDA aufgrund der Acetylgruppe anstelle einer zweiten Aldehydgruppe als geringer einzuschätzen ist, sollten weiterführende Untersuchungen zu Biomarkern ebenfalls verschiedene Reaktionen mit Bindungspartnern in Betracht ziehen.

4.4.3. Bildung von DNA-Addukte *in vitro*

Neben der Bildung von Aminosäure-Addukten nach Exposition mit MF und AcA, sollte auch das Auftreten von den *in chemico* definierten DNA-Addukten dA-AcA, dG-AcA sowie dC-AcA (Kap. 4.2.3.5) auf zellulärer Ebene untersucht werden. Es wurden pRH 1, 6, 18, 24 und 48 h mit MF (10, 50, 100, 500, 1000 μM) oder AcA (0,1, 0,5, 1, 5 μM) inkubiert. Im Anschluss wurden aus den Zellen die DNA extrahiert und enzymatisch hydrolysiert. Mittels UHPLC-MS/MS wurden die charakterisierten DNA-Addukte (Kap. 4.2.3) unter Verwendung der isotopenmarkierten, internen Standards (SIVA) untersucht (Kap. 6.8.6, 6.5.2.4). In allen eingesetzten Konzentrationen und Zeitpunkten konnte keines der drei DNA-Addukte ermittelt werden. Im Fall des semiquantitativ bestimmbaren dC-AcA konnte keine Unterschied zum Hintergrund in der Lösungsmittel- oder Negativkontrolle festgestellt werden. Die mitgeführten isotopenmarkierten Standards $^{15}\text{N}_5\text{-dA-AcA}$ und $^{15}\text{N}_5\text{-dG-AcA}$ bestätigten hinsichtlich Intensität und Verhältnis der Massenübergänge eine konstante Nachweisbarkeit der Addukte. Die Wiederfindung aufdotierter Proben (aufgearbeiteter DNA aus mit MF oder AcA inkubierter pRH, siehe Kap. 6.8.6) lag bei 80-95 %. Hier konnte ab 1 nM eingesetztem dC-AcA das Signal des Moleküls vom Hintergrund der Negativkontrolle unterschieden werden. Da für jede Probe der Gehalt an extrahierter DNA UV/Vis-spektroskopisch zur Einstellung der Menge bestimmt wurde, kann eine fehlerhafte Extraktion ausgeschlossen werden. Die Versuche in Kap. 4.2.3.5 zur Reaktivität von AcA gegenüber isolierter DNA aus unbehandelten pRH bestätigen, dass potentiell gebildete Addukte erfolgreich mittels enzymatischer Hydrolyse freigesetzt werden können. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es während der Isolierung der DNA aus der Zelle zur Desintegration der Addukte kam. Diese Option wurde als unwahrscheinlich eingeschätzt, da sich die in dieser Arbeit charakterisierten Addukte wie auch vergleichbare, zyklische Etheno-Addukte in der Literatur als stabil beschrieben werden (Hecht *et al.*, 1992; Eberle *et al.*, 1989). Mit Ausschluss messtechnischer und aufarbeitungsbedingter Fehler, blieb die Schlussfolgerung, dass bis zu den Bestimmungs-, bzw. Wiederfindungsgrenzen kein dA-AcA, dG-AcA oder dC-AcA in pRH gebildet wurden.

Begrenzt ist die Aussage auf die eingesetzten Konzentrationen, die Inkubationsdauer und die semiquantitative Bestimmung von dC-AcA.

Eine Erklärung für die nicht erfolgte Bildung der AcA-DNA-Addukte im zellulären System ist die *in chemico* beobachtete höhere Reaktivität von AcA gegenüber den Aminosäure-Derivaten. Während der Metabolit sofort (< 1 min) mit AcLys oder AcCys reagierte, konnte die Bildung der DNA-Addukte zeitabhängig (bis 24 h getestet) verfolgt werden. Hinzu kommt, dass die MF metabolisierenden CYPs vornehmlich in die Membran des endoplasmatischen Retikulums intergiert sind. Was bedeutet, dass AcA als Metabolit von MF im Cytosol freigesetzt wird, wo Nukleophile als potentielle Bindungspartner vorliegen. Ist das Potential an solche zu binden hoch, wird hier die Wahrscheinlichkeit in den Nukleus zur DNA zu diffundieren reduziert. Sind reaktive Moleküle wie andere 2-Oxo-4-alkenyle über eine längere Kohlenwasserstoffkette mesomeriestabilisiert, ist ein Erreichen und Binden an DNA wahrscheinlicher. Die Tatsache, dass AcLys-AcA hier nachgewiesen wurde, spricht für eine zumindest teilweise Detoxifizierung von AcA. Zwar ist die Depletion von Aminosäuren, bzw. Peptiden in hohem Ausmaß auch zellschädigend, jedoch wird so zunächst die problematischere DNA-Adduktbildung unterbunden, bzw. reduziert.

In der Literatur wurde die Reaktivität von AcA *in vivo* gegenüber Glutathion oder Sulfhydrylgruppen von Proteinen als so reaktiv eingeschätzt, dass nur geringe Gehalte an DNA-Addukten postuliert wurden (Hecht *et al.*, 1992). Etheno-Typ-Addukte würden „generell in geringen Gehalten *in vivo* produziert“, obgleich es einige hoch persistente, mutagene Gegenbeispiele, wie Vinylchlorid, gibt (Hecht *et al.*, 1992; Eberle *et al.*, 1989).

Für Furan wurde ein vergleichbares Verhalten hinsichtlich einer hohen Reaktivität gegenüber isolierter DNA und dem nicht erfassen entsprechender Addukte *in vivo* beschrieben. So wurde analog zu AcA für BDA die Bildung von Etheno-Addukten an Nukleoside und isolierter DNA beobachtet (Byrns *et al.*, 2004; Byrns *et al.*, 2002). Wurde Ratten *in vivo* entweder in einer Einzeldosis oder über 360 Tage verteilt 9,2 mg/kg KG Furan verabreicht, konnte in hepatischer DNA die BDA-Addukte nicht nachgewiesen werden (Churchwell *et al.*, 2015). Wurden hingegen *Salmonella typhimurium* mit 1,5, 2, 3 mM BDA inkubiert, konnten mit Zugabe von *o*-Benzyl-hydroxylamin DNA-Addukte konzentrationsabhängig im Bereich ~0,01–0,2 pmol/μmol Nukleosid abgefangen werden. Dabei bildete BDA über die beiden Aldehydfunktionen die Brücke zwischen DNA-Base und Abfangreagenz. BDA könnte demnach über dessen zwei Aldehydgruppen *crosslinks* ausbilden (Byrns *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu zeigten Gentoxizitätsstudien *in vivo* einen sekundären MOA von Furan zur indirekten Induktion hepatischer Kanzerogenese in Ratten. Inflammation, Zellproliferation und histopathologische Schädigungen, wie Einzelzellnekrose und Apoptose in der Leber wurden auf oxidativen Stress zurückgeführt (Ding *et al.*, 2012). Inwieweit diese Überlegungen auf AcA übertragbar sind, gilt es jedoch zu überprüfen.

Für die Risikobewertung von MF kann festgehalten werden, dass die *in chemico* definierten DNA-Addukte (dA-AcA, dG-AcA, dC-AcA) bis zur Bestimmungsgrenze (0,05; 1 nM) nicht gebildet wurden. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass abweichende Addukte durch Belastung mit MF entstehen könnten. So gilt es zu testen, ob andere Nebenmetabolite wie FFA durch Hydroxylierung der Methylgruppe via Phase I des Fremdstoffmetabolismus entstehen. Für FFA ist die Bildung von DNA-Addukten *in vivo* bekannt (Høie *et al.*, 2015a; Monien *et al.*, 2011). Folglich wäre der Vergleich von mechanistischen Eigenschaften zwischen MF und Furan durch den Unterschied im entscheidenden Strukturelement hinfällig.

Auch im Einklang mit den Beobachtungen zu Furan (Knutsen *et al.*, 2017) wurde für MF in neueren Studien die Induktion von oxidativem Stress aufgegriffen. Dies ist ein möglicher indirekter Mechanismus wie die beschriebenen hepatotoxischen Effekte hervorzurufen werden könnten (Hu *et al.*, 2021). Der Vergleich zwischen DNA- zu Protein-bindendem Potential lässt das cytosolische Abfangen von AcA zunächst als detoxifizierend einordnen. Insbesondere da es für gentoxische Effekte (DNA-Bindung) theoretisch keinen Schwellenwert gibt, gemäß dem Dogma „keine Dosis ohne Wirkung“. Jedoch stellt auch die Depletion von Proteinen gefolgt von einer reduzierten Funktionalität der Zelle ab einer kritischen Konzentration ein toxisches Ereignis dar. Hierfür kann prinzipiell ein Schwellenwert bestimmt werden (Uhlig und Wendel, 1992). Die Fragestellung des zugrundeliegenden MOA ist entscheidend in der Risikobewertung, welche Grenzwerte für den MOE anzusetzen sind. Handelt es sich um eine gentoxische Substanz, sind Werte < 10 000 besorgniserregend, während im Falle eines anderen MOA der Grenzwert auf 100 erweitert wird (Knutsen *et al.*, 2017). Hier konnte kein gentoxisches Potential basierend auf den *in chemico* identifizierten DNA-Addukten beobachtet werden. Somit bleibt die Einschätzung des CONTAM Panel der EFSA beschrieben in Kap. 2.2.5 unberührt, bzw. wird bestärkt.

Fazit zu *in vitro* Untersuchungen

Untersuchungen zur Zytotoxizität wiesen auf eine notwendige metabolische Aktivierung von MF hin, da in pRH mit höherer metabolischer Kapazität MF zytotoxischer war als in HepG2-Zellen. AcA wies im Vergleich zu MF einen geringeren EC₅₀-Wert auf und wirkte mit einer geringeren Zeitverzögerung.

In Zellüberständen von MF oder AcA inkubierter pRH konnte die Bildung von AcLys-AcA zeit- und dosisabhängig bestimmt werden. Die übereinstimmenden Bildungsmuster lassen AcLys-AcA als potentiellen Biomarker in Betracht kommen. Dies wird unterstützt durch *untargeted Screening* von Urinproben nach Kaffeekonsum mit von Natur aus hohem MF-Gehalt. Zeitgleich kann auf die zelluläre Bildung von AcA rückgeschlossen werden. Allerdings konnte AcLys-AcA auch in Negativkontrollen detektiert werden. Nach Ausschluss methodischer Fehler steht die Hypothese einer endogenen Bildung von AcLys-AcA *in vitro* im Raum. AcCys-AcA konnte dementsgegen in pRH, die mit MF oder AcA inkubiert wurden, nicht nachgewiesen werden.

In mit MF oder AcA exponierten pRH konnten die *in chemico* identifizierten DNA-Addukte dA-AcA, dG-AcA und dC-AcA nicht nachgewiesen werden. Dies kann auf eine effiziente Abfangreaktion im Cytoplasma als Bildungsort von AcA hinweisen. So zeigte AcA sich *in chemico* auch reaktiver gegenüber Aminosäuren als DNA. Nicht auszuschließen ist die Bildung anderer DNA-Addukte oder abweichender MOAs.

5. Zusammenfassung & Ausblick

Das CONTAM Panel der EFSA veröffentlichte 2017 eine „Opinion“ zur wissenschaftlichen Beurteilung von Furan und MF basierend auf bisherigen Forschungsergebnissen. Während Furan weitaus häufiger untersucht worden war, wurden entscheidende Lücken über den Wissenstand von MF aufgedeckt (Knutsen *et al.*, 2017). Essentiell für die Risikobewertung der ubiquitär in Lebensmitteln vorkommenden Kontaminante MF (Becalski *et al.*, 2016) ist die Abschätzung der Exposition sowie die mechanistische Grundlage der beobachteten toxikologischen Effekte. So wurde in Ratten die Leber als primäres Zielorgan der Schädigung durch MF identifiziert. Hier wurden histopathologische Veränderungen wie Nekrosen beschrieben, während die Lunge in weitaus geringerem Ausmaße betroffen war (Gill *et al.*, 2014). Verteilungs- und Bindungsstudien bestätigten die Ergebnisse durch primäre Verteilung von ¹⁴C-markiertem MF in die Leber, gefolgt von den Nieren, Lunge und Blut. Sie zeigten zusätzlich die Detektion von protein- und DNA-gebundenem ¹⁴C-Material (Ravindranath *et al.*, 1986). Den toxikologischen Effekten wurde die metabolische Aktivierung von MF zum reaktiven Intermediat AcA zugrunde gelegt. So wurde nach Inkubation von RLM mit MF AcA zu Beginn als Disemicarbazon abgefangen. In weiterführenden Studien wurde über die Bindung von radioaktivem Material an zuvor isoliertes, mikrosomales Protein der Umsatz von MF zu reaktivem Metabolit bestimmt (Ravindranath *et al.*, 1984a; Ravindranath und Boyd, 1985).

Ziel dieser Arbeit war es die zugrundeliegenden, molekularen und chemischen Mechanismen von MF, bzw. dessen diskutierten Metabolit AcA zu erforschen, um Rückschlüsse auf dessen toxikologische Effekte zu ermöglichen. Dadurch ergaben sich vier Hauptschwerpunkte, die sich in den vier Kapiteln widerspiegeln und folglich zusammengefasst werden als:

- 1) Die Einordnung von MF *in silico* unter Einbezug potentieller Metabolite zur toxikologischen Klassifizierung mit endpunktspezifischer QSAR-Analyse.
- 2) Die Synthese und Charakterisierung von AcA als postulierter Hauptmetabolit sowie dessen Reaktivität gegenüber Aminosäuren und Nukleosiden *in chemico*. Entsprechende Addukte galt es zu synthetisieren und sensitive Quantifizierungsmethoden zu entwickeln.
- 3) Die mikrosomale Untersuchung der metabolischen Aktivierung von MF zu AcA durch Verifizierung von AcA, der Übertragung auf den humanen Metabolismus und schließlich die Identifizierung des verantwortlichen Schlüsselenzyms.
- 4) Die Untersuchung der AcA-Adduktbildung *in vitro* nach Inkubation pRH mit MF und AcA, um potentielle Biomarker zu identifizieren und de-/toxifizierende Mechanismen einordnen zu können.

Zu Beginn wurde MF *in silico* basierend auf der chemischen Struktur toxikologisch eingestuft. Genutzt wurde das Programm *Toxtree*, welches zur initialen Kategorisierung und Gegenüberstellung von Strukturanaloga diente. *QSAR toolbox* der OECD diente der endpunktspezifischen QSAR-Analyse. MF wurde als „substituierter, aromatischer Heterozyklus mit Etherkomponente“ in Cramer-Klasse III mit hohem toxikologischem Potential eingeordnet. Für dessen toxikologische Relevanz wurde eine initiale, CYP-vermittelte, metabolische Aktivierung in Kombination mit einem Protein-/DNA-Bindungspotential postuliert. Die *in silico* generierten Metabolite wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Während die „AcA“-Gruppe sich durch oxidative Ringöffnung auszeichnete, wurden Metabolite mit variierender Oxidationsstufen der Alkylgruppe als „FFA“-Gruppe (abgeleitet von Furfurylalkohol) zusammenfasst. In Referenzliteratur wurde bisher jedoch nur von AcA als reaktiver Metabolit berichtet (Ravindranath und Boyd, 1985). Im Anschluss wurde unter Einbezug metabolische Umsetzung endpunktspezifische QSAR-Analysen durchgeführt, zu deren Methodvalidierung sofern möglich RAAF implementiert wurde. So wurde der Endpunkt „Genetische Toxikologie *in vitro*“ (*profiling*) als auch „Genetische Toxikologie *in vivo*“ (QSAR ohne RAAF) als negativ eingeschätzt. Im Gegensatz dazu wurde für die Endpunkte „Chromosomenaberrationen“ und „Hautsensibilisierung“ (für das Proteinbindungspotential stehend) ein positives Ergebnis postuliert. Die Abschätzung konnte unter Implementierung des RAAF erfolgreich durchgeführt werden. Die *in silico* Einordnung von MF verdeutlichte zum einen den Handlungsbedarf den Mechanismus der Kontaminante näher zu untersuchen. Gleichzeitig kam sie dem 3R-Konzept der REACH-Verordnung nach. Dabei wurde die Bedeutung der metabolischen Aktivierung von MF für dessen toxikologisches Potential hervorgehoben. Unter Einbezug des Kenntnisstands aus der Literatur wurde sich im Folgenden auf AcA als reaktiver Metabolit von MF fokussiert.

***In chemico* wurde AcA, als auch dessen Addukte mit Aminosäuren und DNA identifiziert, synthetisiert und charakterisiert. Daraus wurden quantitative Analysemethoden entwickelt und die Reaktivität von AcA untersucht.** Zunächst wurde AcA über zwei Wege synthetisiert, die sich durch ihren Aufwand, Effizienz und Reinheit unterschieden. Die einschrittige, saure Hydrolyse von DHMMF wurde für Vorversuche und die Synthese von Standards verwendet. Aufgrund der Gleichgewichtseinstellung konnte jedoch kein frei vorliegendes AcA isoliert werden. Dieses war essentiell für Stabilitätsuntersuchungen und den Einsatz in Inkubationsansätzen. Daher wurde über die Oxidation von MF mittels DMDO *cis*-AcA synthetisiert, welches bei tiefen Temperaturen stabil in organischen Lösemitteln wie DMSO war. Bei Raumtemperatur wurde die Umlagerung zu *trans*-AcA beobachtet (~50 % nach 1 d). Wurde *cis*-AcA in Wasser gelöst, kam es unter Zyklisierung zur Ausbildung von 2,5-Dihydroxy-2-methyl-5H-furan (*cis*-AcA-OH₂) im Verhältnis 10:1 (zu *cis*-AcA). *Trans*-AcA zeigte in wässriger Lösung ebenfalls eine Hydratisierung, jedoch bildete sich hier (*E*)-5,5-Dihydroxypent-3-en-2-

on (*trans*-AcA-OH₂) im Verhältnis 2:3 (zu *trans*-AcA). Für weiterführende Reaktions- und Inkubationsansätze wurde lediglich *cis*-AcA genutzt.

Im nächsten Schritt wurde die Adduktbildung von AcA mit AcCys und AcLys untersucht. Als zwei N_α-geschützte Aminosäuren enthielten sie eine Amino- bzw. Thiolgruppe. Beide Reaktanten zeigten ein hohes Potential über die primäre Amino-, bzw. Sulfhydrylgruppe nukleophil an die Aldehydfunktion an AcA zu addieren. Es folgte jeweils ein Ringschluss mit Dehydratisierung. Während die Zyklisierung des AcCys-Adduktes über den ringständigen Sauerstoff stattfand, kam es zum Einschluss des ε-Stickstoffs von AcLys in die Ringstruktur. Parallel wurde AcLys-BDA basierend auf einer in der Arbeitsgruppe etablierten Methode synthetisiert. Sie resultierte in zwei isomeren Formen, die jedoch semipräparativ getrennt werden konnten, sodass das gewünschte Isomer charakterisiert wurde. Währenddessen gestaltete sich die Charakterisierung von AcLys-AcA als komplexer, aufgrund von Umlagerungen und/oder Instabilität in organischen Lösungsmitteln. Über die Kombination an massenspektrometrischen und verschiedenen NMR-Messtechniken wurde ein Gesamtbild diskutiert. Zur vollständigen Aufklärung der Struktur ist bspw. eine Kristallstrukturanalyse notwendig. Dennoch gelang es eine robuste (U)HPLC-MS/MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von AcLys-AcA zu entwickeln.

Daneben wurde die Adduktbildung von AcA mit Nukleosiden untersucht. Während AcA nicht mit dT reagierte, konnten die Addukte dA-AcA, dG-AcA sowie dC-AcA synthetisiert und charakterisiert werden. Als initialer Schritt deren Bildung wurde der nukleophile Angriff der exozyklischen Aminogruppe der DNA-Basen postuliert, gefolgt von einer Zyklisierung über den endozyklischen Stickstoff. Als Intermediat wurde die bereits in ähnlichen Reaktionen beschriebene hydratisierte Form beobachtet, welche durch Säurezugabe dehydratisiert wurde. So wurde sichergestellt, dass bei späteren quantitativen Untersuchungen ein Produkt (ohne hydratisierte Zwischenstufe) vorlag. Analog wurden die isotopenmarkierten Standards ¹⁵N₅-dA-AcA und ¹⁵N₅-dG-AcA synthetisiert, um mittels SIVA eine sensitive UHPLC-MS/MS-Methode zur quantitativen Bestimmung der drei DNA-Addukte zu entwickeln. Aufgrund von messtechnischen Interferenzen von dC-AcA war dessen Bestimmung semiquantitativ.

Mit etablierten Bestimmungsmethoden wurde die Reaktivität von AcA gegenüber der fünf Reaktanten hinsichtlich der Durchführungsbedingungen folgender Experimente genauer geprüft. AcLys und AcCys reagierten sofort (< 1 min), sodass nur eine Dosisabhängigkeit zu beobachten war. Währenddessen konnte nach Inkubation von AcA mit isolierter DNA die Bildung von dA-AcA, dG-AcA als auch dC-AcA zusätzlich zeitabhängig verfolgt werden. Da die Reaktion von AcCys mit AcA in Gegenwart von Kaliumphosphatpuffer unterdrückt wurde, dieser jedoch für Mikrosomeninkubationen vorzuziehen ist, wurde AcLys als Abfangreagenz für die Untersuchung der metabolischen Aktivierung von MF gewählt. Die beobachtete Reaktivität gegenüber Aminosäure-Derivaten und Nukleosiden steht somit im Einklang mit den Einschätzungen *in silico*.

Es wurde die metabolische Aktivierung von MF zu AcA bestätigt, die interspezifische Umsetzung verglichen und das Schlüsselenzym der oxidativen Ringöffnung identifiziert.

Zunächst wurde für den reaktiven MF-Metaboliten AcA eine Methode mit AcLys als Abfangreagenz etabliert, in welcher AcLys-AcA via HPLC-ESI⁺-MS/MS detektiert wurde.

Zur Untersuchung des Phase I-Metabolismus von MF wurden RLM als auch HLM für 1–120 min mit 100 und 500 μM MF inkubiert. Dabei wurde die zeit- und dosisabhängige Bildung von AcA beobachtet, wobei nach 120 min der Maximalumsatz von HLM einen 3-fach erhöhten Gehalt an AcA ergab. Die kommerziell erworbenen HLM aus 150 gepoolten Spendern repräsentierten die durchschnittlich zu erwartende Enzymaktivität, insbesondere polymorpher Isoformen. Literatur mit Daten zu Einzelspendern von HLM zeigen jedoch eine hohe Variabilität an CYP-Aktivitäten, die durch *Life style*-Faktoren und genetische Disposition bedingt sind. Daher ist hier nicht automatisch auf einen signifikanten speziesspezifischen Unterschied zu schließen. Es kann die Aussage getroffen werden, dass humane Leberenzyme (HLM) wie auch die der Ratte (RLM) MF zu AcA metabolisieren. Damit bestätigten sich die *in silico* Abschätzungen bezüglich der metabolischen Aktivierung.

Um die Frage nach dem Schlüsselenzym zu klären, wurden die SupersomesTM CYP 1A2, CYP 2A6, CYP 2C9, CYP 2D6, CYP 2E1 und CYP 3A4 analog mit MF inkubiert. Dabei stellte sich CYP 2E1 als das Schlüsselenzym für die Umsetzung von MF heraus. Die übrigen SupersomesTM zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle oder Dosis- noch Zeitabhängigkeit. Damit wurde ein analoger Phase I-Metabolismus wie für Furan nachgewiesen, dessen oxidative Ringöffnung zu BDA ebenfalls primär über CYP 2E1 vermittelt wird (Gates *et al.*, 2012).

Zur Bestimmung enzymkinetischer Parameter wurden die drei Testsysteme (RLM, HLM und CYP 2E1) im linearen Umsatzbereich von 10 min mit 10–750 μM MF inkubiert. Über die Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration wurden die entsprechenden Größen K_M , v_{max} bzw. k_{cat} und E_{cat} bzw. CL_{int} ermittelt. Die Auftragung im Eadie-Hofstee-Plot zeigte eine biphasische Reaktionskinetik.

Wurden die stoffmengenbezogenen Umsatzraten auf die eingesetzte MF-Konzentration normiert, war eine signifikant erhöhte Umsetzung bei der kleinsten Konzentration (10 μM MF) zu beobachten. Dies kann als inhibitorischer Effekt von MF in höheren Konzentrationen auf die Enzyme interpretiert werden, was es jedoch gezielt zu testen gilt. Inwiefern die metabolische Aktivierung von MF zu AcA in der Zelle stattfindet und weitere Reaktionen des hoch reaktiven Metaboliten ablaufen, wurde im nächsten Schritt in pRH untersucht.

Schließlich wurde die Bildung von AcA und dessen Addukte *in vitro* untersucht. Vorab wurde die Zytotoxizität von MF in pRH bestimmt und mit der metabolisch weniger kompetenten Zelllinie HepG2 verglichen. Der signifikant höhere EC_{50} -Wert von MF in HepG2-Zellen weist auf die Notwendigkeit der metabolischen Aktivierung zur Induktion von Zytotoxizität hin. Die folgenden Inkubationen beschränkten sich daraufhin auf pRH. Wurden diese 1–48 h mit

MF (0,05–5 mM) oder AcA (0,1–100 µM) inkubiert, zeigte sich eine ~100-fach zytotoxischere Wirkung von AcA. Im Gegensatz zu AcA wurde bei MF innerhalb einer Konzentration ein zeitlich verzögerter Eintritt des zytotoxischen Effekts beobachtet. Dies kann auf die zuerst notwendige Phase I-Metabolisierung von MF zurückgeführt werden. Basierend auf diesen Vorkenntnissen wurde für die Untersuchung der Adduktbildung Konzentrationen gewählt, die verschiedenen Stufen an relativer Vitalität abdecken.

So wurden pRH mit 10–1000 µM MF oder 0,1–5 µM AcA inkubiert, wobei die höchste MF-Konzentration eine zytotoxische Grenzwertbetrachtung darstellte. Nach Ablauf von 1–48 h wurde der Zellüberstand für die Untersuchung von Aminosäure-Addukten aufgearbeitet, während aus den Zellen die DNA für die Bestimmung von DNA-Addukten aufbereitet wurde. Im Mediumüberstand konnte kein AcCys-AcA detektiert werden, jedoch wurde die zeit- und dosisabhängige Bildung von AcLys-AcA erfasst. Auffallend war das Auftreten geringer Adduktlevel von AcLys-AcA in der Negativkontrolle, für die nach Ausschluss methodischer Fehler ein endogener Ursprung postuliert wurde. Basierend auf Referenzliteratur wurde die Möglichkeit diskutiert, dass durch oxidativen Stress ausgelöste Lipidperoxidation 2-Oxo-4-alkenyle generierte, welche an Proteine und DNA binden können (Kawai und Nuka, 2018). Durch Vergleich der Bildungsmuster zwischen den Inkubationen mit MF und AcA konnte zum einen AcLys-AcA als potentieller Biomarker identifiziert werden. Zum anderen wurde die metabolische Aktivierung von MF zu AcA auch auf zellulärer Ebene erstmals nachgewiesen. Aufgearbeiteten Proben der gleichen Inkubationen zeigten jedoch über den untersuchten Zeitraum sowie Konzentrationsbereich keine Bildung der *in chemico* identifizierten DNA-Addukte dA-AcA, dG-AcA oder dC-AcA (bis zu 0,05 nM Bestimmungsgrenze). Dies könnte durch eine effiziente Detoxifizierung bzw. Reaktion des im Cytosol gebildeten AcA mit nukleophilen Zellkomponenten erklärt werden. *In chemico* wurde zudem eine höhere Reaktivität gegenüber den Aminosäure-Derivaten AcLys und AcCys als isolierter DNA ermittelt. Eine weitere Erklärung wäre das Auftreten anderer DNA-Addukte wie *cross-links*, die hier in den Vorversuchen methodisch nicht erfasst worden wären. Ebenso sind andere sekundäre MOAs nicht auszuschließen, wie beispielsweise die Induktion von oxidativem Stress. Die neuen Erkenntnisse zu MF stehen mit den Beobachtungen zu Furan im Einklang. Zwar wurde für Furan der genotoxische Charakter ambivalent diskutiert und die *in chemico* äquivalenten BDA-DNA-Addukte bestimmt, jedoch konnten auch diese *in vivo* als auch *in vitro* nicht nachgewiesen werden (Byrns *et al.*, 2002; Byrns *et al.*, 2004; Churchwell *et al.*, 2015). Für die Risikowertung lässt sich somit schlussfolgern, dass durch die Identifizierung und Charakterisierung von AcLys-AcA *in vitro* ein potentieller Biomarker identifiziert wurde. In ersten Pilotstudien konnte er in Urin nach Kaffeekonsum nachgewiesen werden, was den Anlass bietet die Toxikokinetik nach humaner Exposition zu untersuchen. Hinsichtlich eines genotoxischen Potentials von MF konnten hier analog zu Furan nicht die *in chemico* charakterisierten DNA-Addukte nachgewiesen werden. Jedoch lässt sich eine DNA-Schädigung über anderem Wege nicht ausschließen. Es sollte in Betracht gezogen werden, dass AcA zwar

als Hauptmetabolit bestätigt werden konnte, es durch die zusätzliche Methylgruppe im Vergleich zu Furan einen weiteren Angriffspunkt für den Phase I-Metabolismus gibt. So könnte FFA einen weiteren, hypothetischen Metaboliten von MF darstellen, was es zu untersuchen gilt. Bis dahin konnten in dieser Arbeit einige Postulate, auf denen die bisherige Einschätzung des CONTAM Panels der EFSA zu MF basieren, erfolgreich verifiziert, genauer charakterisiert und ergänzt werden.

Ausblick

Neben den genannten Punkten sind folgende Fragestellungen relevant für die weitere toxikologische Untersuchung von MF als Lebensmittelkontaminante.

Nachdem *in silico* zwei mögliche Hauptmetaboliten für MF postuliert wurden, fokussierte sich diese Arbeit auf AcA als reaktives Intermediat. Dennoch ist die Bildung von FFA als Folge einer Seitenkettenhydroxylierung von MF nicht auszuschließen. Zur Untersuchung dieser lipophileren Substanz ist die Etablierung einer Methode zur Isolation aus der Probenmatrix sowie eine sensitive GC-MS-Methode notwendig. Anschließend können mikrosomale Inkubationen analog zu den hier beschriebenen durchgeführt werden.

Bezüglich dem Addukt AcLys-AcA steht dessen abschließende Strukturaufklärung aus, die über Kristallstrukturanalysen geklärt werden kann. Dabei muss jedoch die Instabilität der Substanz in organischen Lösemitteln bedacht werden.

Eine weitere Fragestellung ist die endogene Bildung von AcLys-AcA. Hier kann der Hypothese aus der Literatur nachgegangen werden, dass AcA durch oxidativen Abbau zellulärer Bestandteile, wie Lipiden, entstehen kann (Onyango, 2012). *In vitro* kann über die Gabe von bspw. Wasserstoffperoxid oxidativer Stress simuliert werden, um die Adduktbildung von AcLys-AcA zu beobachten.

Desweiteren ist die Bildung von AcLys-AcA *in vivo* als humaner Expositionsbiomarker von MF zu testen. Wie Pilotstudien zeigten, eignet sich Urin als nicht-invasive Probenmatrix zur Untersuchung des Kurzzeitbiomarker AcLys-AcA. Um Rückschlüsse auf die Toxikokinetik von MF ziehen zu können, muss die MF-Exposition bekannt sein. Als Expositionsmedium eignet sich bspw. Kaffee, welcher erstens die Hauptexpositionsquelle von MF darstellt und über den zweitens gut dosierbar MF verabreicht werden kann. Dabei muss die zeitgleiche Aufnahme von Furan und weiteren Furan-Derivate berücksichtigt werden. Auch wenn AcCys-AcA *in vitro* in pRH nicht nachgewiesen werden konnte, sollte das Addukt in Humanstudien untersucht werden. Hier würden sich Unterschiede im detoxifizierenden Mechanismus, insbesondere GSH betreffend, zeigen.

Für die Risikobewertung wurde die Bildung von den spezifischen DNA-Addukten dA-AcA, dG-AcA sowie dC-AcA bis zur Nachweisgrenze ausgeschlossen, jedoch stellt sich die Frage nach abweichenden gentoxischen Ereignissen. Die Bildung anderer DNA-Addukte kann entweder im Hinblick auf weitere reaktive Metabolite, wie FFA, erfolgen oder eine andere Art von

Schäden, wie *cross-links*, untersucht werden. Auch indirekte Mechanismen, bspw. die Induktion von Transkriptionsfaktoren, können getestet werden.

Mit Beantwortung der vier Hauptfragestellungen dieser Arbeit, wurden der bisherige Kenntnisstand zum Metabolismus und folgender Toxizität von MF bestätigt und ergänzt. Dies ermöglicht eine genauere Risikobewertung als Lebensmittelkontaminante, obgleich weiterführende Untersuchungen ausstehen. Auf dieser Grundlage können gezielt neue Fragestellungen hinsichtlich der Toxikokinetik, hypothetischer Metabolite und alternativer MOA aufbauen.

6. Experimenteller Teil

6.1. Allgemeines

Für alle Ansätze mit Wasser wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Zur Vereinfachung wurden Ansätze in Konzentrationsreihen und Pipettierschema wie folgt abgekürzt: EL: Endlösung, GL: Gebrauchslösung; IL: Inkubationslösung, LM: Lösungsmittel, SL: Stammlösung, ZV: Zwischenverdünnung.

Experimente wurden mit einem Stichprobenumfang von $n = 3-6$ durchgeführt, welcher zusammen mit Angabe zur duplikaten oder triplikaten Vermessung in der Ergebnisdarstellung vermerkt wurde. Genannte Vorversuche wurden in einem Umfang von $n = 2-4$ durchgeführt. Die Messdaten mit Berechnungen sind dem elektronischen Anhang (I–IV) zu entnehmen.

6.2. Material

Tab. 25: Verwendete Chemikalien mit Herstellern/Lieferanten. *) primäre Nutzung, falls nicht anders vermerkt. **) Verwendung als Fließmittel und Ansätze bei Nutzung des UHPLC-MS/MS-System III.

Chemikalien	Hersteller
Aceton (zur Analyse)	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril	
<i>HPLC gradient grade</i> *)	VWR International, Darmstadt, Deutschland
<i>LC-MS grade</i> **)	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure	
<i>Analytical grade</i> *)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
<i>LC-MS grade</i> **)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
2-Aminoanthracen, 96 %	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
4',6-Diamin-2-phenylindol	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
2,5-Dihydro-2,5-dimethoxy-furan	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
2,5-Dihydro-2,5-dimethoxy-2-methylfuran	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
2'-Desoxyadenosin-monohydrat, 99 %	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
[¹⁵ N ₅]-2'-Desoxyadenosin	Silantes GmbH, München, Deutschland
2'-Desoxycytosin-Monohydrat	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
2'-Desoxyguanosin-Hydrat (6 m-% H ₂ O)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
[¹⁵ N ₅]2'-Desoxyguanosin	Silantes GmbH, München, Deutschland
2'-Desoxythymidin-Monohydrat	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Dimethylformamid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	VWR International, Darmstadt, Deutschland

Fortsetzung Tab. 25: Verwendete Chemikalien mit Herstellern/Lieferanten. *) primäre Nutzung, falls nicht anders vermerkt. **) Verwendung als Fließmittel und Ansätze bei Nutzung des UHPLC-MS/MS-System III.

Chemikalien	Hersteller
Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)	Riedel-de Haen AG, Seelze, Deutschland
Dinatrium-ethylendiamintetraessigsäure (Na_2 -EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> (DMEM) - <i>low glucose</i> (1 g/L) mit Phenolrot - <i>high glucose</i> (4,5 g/L) ohne Phenolrot, ohne HEPES	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Essigsäure <i>Analytical grade</i> *)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
<i>LC-MS grade</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Eisessig (100 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (95 % in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Fötale Kälberserum (FKS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glycerin	Merck Chimie GmbH, Darmstadt, Deutschland
Heparin (für Perfusion)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> (HBSS) 2-(4-)-2-Hydroxyethyl)-1-piperazinylethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Immersol 518F	Zeiss, Jena, Deutschland
Kaliumcarbonat (K_2CO_3)	Merck Chimie GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Chimie GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Riedel-de Haen AG, Seelze, Deutschland
Kaliumiodid (KI)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Kollagenase	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Magnesiumchlorid-hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Methanol, <i>HPLC gradient grade</i>	VWR International, Darmstadt, Deutschland
2-Methylfuran <i>Analytical grade</i> *)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Zur Synthese stabilisiert mit BHT	Merck Chimie GmbH, Darmstadt, Deutschland
N_α -Acetyl-L-Cystein; analytischer Standard	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
N_α -Acetyl-L-lysin; analytischer Standard	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck Chimie GmbH, Darmstadt, Deutschland

Fortsetzung Tab. 25: Verwendete Chemikalien mit Herstellern/Lieferanten. *) primäre Nutzung, falls nicht anders vermerkt. **) Verwendung als Fließmittel und Ansätze bei Nutzung des UHPLC-MS/MS-System III.

Chemikalien	Hersteller
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Natriumthiosulfatpentahydrat (Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O)	Acros organics Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
N-Laurylsarcosin-Natrium-Salz	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Oxone® (Kaliumhydrogenmonopersulfate, 2KHSO ₅ ·KHSO ₄ ·H ₂ SO ₄)	Merck Chimie GmbH, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep): 5000 Units/mL Pen; 5000 µg/mL Strep	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep 2x): 10 000 Units/mL Pen; 10 000 µg/mL Strep	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pentobarbital	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Percoll®	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Proteinase K	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Ribonuklease A (RNase A)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Resazurin	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
RPMI-1640-Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sulforhodamin 101 (SR 101)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Titriplex III	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau-Färbelösung	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Trypsin, from bovine pancreas	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

Tab. 26: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Hersteller/Lieferanten.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Braunüle Vasocan 14G (orang); 18G (grün)	B. Braun, Meslungen, Deutschland
DC-Platten: Kieselgel	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Deckgläser 24x24	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmal-Injektionskanülen Sterican 26G 0,45 x 12 mm	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Einmal-Injektionsspritzen Omnifix-F 1 mL	B. Braun, Melsungen, Deutschland
<u>HPLC-Säulen:</u>	
Acquity UPLC BEH Amide; 1,7 µm; 2,1 x 50mm	Waters Corporation, Milford, USA
LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 125 x 4 mm	Merck, Darmstadt, Deutschland
Synergi™ Hydro-RP, 4 µm, 3 x 150 mm	Phenomenex, Torrance, USA
<u>HPLC-Semi-/Präparative Säulen:</u>	
Synergi™ Polar-RP, 4 µm, 250 x 10 mm	Phenomenex, Torrance, USA
VDSpher PUR C18-SE, 5 µm, 250 x 20 mm	VDS Optilab, Berlin, Deutschland
<u>HPLC-Vorsäulen:</u>	
Acquity UPLC BEH Amide; 1,7 µm; Van Guard	Waters Corporation, Milford, USA
LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 4 x 4 mm	Merck, Darmstadt, Deutschland
Synergi™ Aqua C18, 4 µm, Guard	Phenomenex, Torrance, USA
Objektträger, glatt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturschalen 100 mm	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1 mL)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 mL; 2 mL)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
<u>SPE-Säule:</u>	
Chromabond HR-XA, 200 mg, 3 mL	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Sterilfilter VacuCap 60 Filter Unit, 0,2 µm	Pall Life Science GmbH Co. KG, Dreieich, Deutschland
Superfrost Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
24-Well-Platte, steril	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
48-Well-Platte, steril	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm ² ; steril)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 mL; 50 mL)	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland

Tab. 27: Verwendete Geräte mit Herstellern/Lieferanten.

Geräte	Hersteller
<u>Brutschränke:</u>	
Binder	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Heraeus Cell 240	Heraeus, Hanau, Deutschland
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20	Zeiss, Jena, Deutschland
Fluoroscan Ascent FL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<u>HPLC-UV/Vis-Systeme:</u>	
<i>System I:</i>	
HPLC Serie 1200	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Pumpe G1329A	
TCC G1316A	
Fraktionensammler G1364B	
DAD (UV-Vis) G1315A	
<i>System II:</i>	
HPLC Serie 1290	
Pumpe G1316C	
DAD (UV-Vis) G4212A	
<u>Kernspinresonanzspektroskopie:</u>	
Avance 400	Bruker BioSpin, Rheinstetten, Deutschland
Avance 600	Bruker BioSpin, Rheinstetten, Deutschland
Magnetrührer: MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Mikroskop Axioskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop Primo Vert	Zeiss, Jena, Deutschland
Neubauerzählkammer (Roth)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH Co. KG, Eberstadt, Deutschland
<u>Präparative HPLC:</u>	
HPLC Serie 1200:	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Pumpen G1361A	
Fraktionensammler G1364B	
UV-Vis-Spektrometer: MWD G1315A	
Schlauchpumpe BVP	Ismatec, Glattburg-Zürich, Schweiz
SPE-Kammer: Visiprep™	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Sterilbank Biowizard Golden Line	Kojair, Vilppula, Finnland

Fortsetzung Tab.27: Verwendete Geräte mit Herstellern/Lieferanten.

Geräte	Hersteller
Thermostat T MA 6	Lauda, Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen
<u>(U)HPLC-MS/MS-Systeme:</u>	
<i>System (I)</i>	
HPLC Serie 1100:	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Degasser G1379A	
Quat Pump G1311A	
Autosampler G1313A	
TCC G1316A	
MS: API 2000	AB Sciex, Framingham, USA
<i>System (II)</i>	
HPLC Serie 1200:	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Degasser G1379B	
Bin Pump SL G1315C	
FC/ALS Therm G1330B	
TCC SL G1316B	
MS: API 3200	AB Sciex, Framingham, USA
<i>System (III)</i>	
HPLC Serie 1290:	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Degasser	
Bin Pump G4220A	
Thermostat G1330B	
Sampler G4226A	
TCC G1316C	
MS: API 5500	AB Sciex, Framingham, USA
Vortexer IUA VORTEX Genius 3	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
<u>Waagen:</u>	
Ultrafeinwaage: Excellence Plus	Mettler-Toledo LLC, Columbus, USA
Feinwaage: BP 210 S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasserbad Julabo PC	Julabo, Seelbach, Deutschland
<u>Zentrifugen:</u>	
5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Megafuge 1.0 R	Haraeus, Hanau, Deutschland
Multifuge 1 L-R	Haraeus, Hanau, Deutschland

Tab. 28: Verwendete Zellen/Tiere mit Herstellern/Lieferanten.

Zellen/-Spender	Lieferant
HepG2-Zelllinie	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
Männliche Wistar-Ratten	Janvier Labs, Saint Berthevin Cedex, Frankreich

Tab. 29: Verwendete Mikrosomen und Supersomes™ mit Herstellern/Lieferanten.

Mikrosomen/Supersomes™	Hersteller
Corning® Gentest™ Rat (Sprague-Dawley) pooled liver microsomes, Male (Ref.-Nr.: 452501)	Corning, Glendale, USA
Corning® UltraPool™ Human liver microsomes (HLM 150), Mixed Gender (Ref.-Nr.: 452117)	Corning, Glendale, USA
Supersomes® Human™ CYP1A2 + Oxidoreductase (Ref.-Nr.: 456203)	Corning, Glendale, USA
Supersomes® Human™ CYP3A4 + Oxidoreductase + b5 (Ref.-Nr.: 456202)	Corning, Glendale, USA
Supersomes® Human™ CYP2A6 + Oxidoreductase + b5 (Ref.-Nr.: 456254)	Corning, Glendale, USA
Supersomes® Human™ CYP2C9*1 (Arg144) + Oxidoreductase + b5 (Ref.-Nr.: 456258)	Corning, Glendale, USA
Supersomes® Human™ CYP2D6*1 (Val374)+ Oxidoreductase (Ref.-Nr.: 456217)	Corning, Glendale, USA
Supersomes® Human™ CYP2E1 + Oxidoreductase + b5 (Ref.-Nr.: 456206)	Corning, Glendale, USA

Tab. 30: Verwendete Software mit Herausgeber.

Software	Herausgeber
Analyst 1.6.3	AB Sciex, Framingham, USA
Ascent Software für Fluoroskan 2.6 FL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ChemDraw Ultra 10.0	Cambridgesoft, Massachusetts, USA
Gen5 1.02.8	Bio Tek, Bad Friedrichshall, Deutschland
MestReNova 12.0	Mestrelab Research SL, Santiago de Compostela, Spanien
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporations, Redmond, USA
MultiQuant 3.0.3	Software Agilent Technologies, Santa Clara, USA
OECD QSAR toolbox 4.4.1	Organisation for Economic Co-operation and Development & European Chemicals Agency
Origin 2019	OriginLab, Northampton, USA
ToxTree v2.6.13	Ideaconsult Ltd., Sofia, Bulgarien

6.3. *In silico* Betrachtung von 2-Methylfuran

MF wurde *in silico* mittels *ToxTree* und *QSAR toolbox* (der OECD) untersucht. Zu Beginn der *in silico* Untersuchungen wurden Parameter basierend auf den physikalischen, chemischen Eigenschaften der Substanz bestimmt. Der Verteilungskoeffizient der Substanz zwischen n-Oktanol und Wasser wird logarithmisch verrechnet als log P oder auch log K_{ow} bezeichnet. Er simuliert des Zweiphasensystems der lipophilen Biomembran und des hydrophilen Cytosols.

$$\log P = \log \frac{C_O^{S_i}}{C_W^{S_i}} \quad \text{mit } C_O^{S_i}: \text{Konzentration des Stoffes } S_i \text{ in n-Oktanol}$$

$$C_W^{S_i}: \text{Konzentration des Stoffes } S_i \text{ in Wasser}$$

Ein log P-Wert zwischen -0,4 und 5,6 spricht für eine *druglikeness*, die sich über die Bioverfügbarkeit und biologische Aktivität definiert. Für eine gute orale Bioverfügbarkeit werden folgende Strukturmerkmale als „*Rule of five*“ zusammengefasst (Ghose *et al.*, 1999; Lipinski *et al.*, 1997):

- Die Anzahl an Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen wie O, N ist kleiner als zehn.
- Die Anzahl an Donoren von Wasserstoffbrückenbindungen, wie Hydroxy- oder Amino-Gruppen, ist kleiner als zehn.
- Die Molekularmasse liegt zwischen 160 und 480 Da.
- 20 – 70 Atome sind enthalten.
- Eine Molekularrefraktion zwischen 40 und 139 wird erreicht.

6.3.1. *ToxTree*

Basierend auf der chemischen Struktur ermöglichte *ToxTree* eine Substanz in verschiedenen Modulen bezüglich ihrer Toxizität zu klassifizieren. Folgende Module standen hierfür zur Auswahl:

- | | |
|---|---|
| • Cramer Regeln | • DNA-Bindung |
| • Cramer Regeln, mit Erweiterung | • Protein-Bindung |
| • Cramer-Entscheidungsbaum überarbeitet | • Michael-Akzeptor |
| • Verhaar Schema für Toxizitäts-MOA | • <i>In vitro</i> Mutagenität (Ames-Test), Alters von ISS |
| • Verhaar Schema (modifiziert) | • Mikronukleus-Assay <i>in vivo</i> (Nagern) |
| • für Toxizitäts-MOA | • Benigni/Bossa-Regeln für Kanzerogenität und Mutagenität |
| • Hautirritation (und Korrosion) | • ILSI/Kroes Entscheidungsbaum für TTC |
| • Hautsensibilisierung (M. Cronin) | |
| • Augenirritation (und Korrosion) | |

Die Einstufung der Substanz erfolgte durch Abfrage von strukturellen Merkmalen entlang eines modul-spezifischen Entscheidungsbaums, was automatisch oder manuell erfolgen kann. Dabei werden für jede Entscheidung die ausschlaggebenden Strukturmerkmale, *structural alerts*, aufgelistet, was eine transparente Klassifizierung erlaubt. Die Stufen, bzw. Klassen variieren zwischen den Modulen, sind jedoch mit einer entsprechenden Erläuterung versehen.

Da hier nur Substanzen isoliert betrachtet werden können, wurden nicht nur MF, sondern auch Furan und DMF zum Vergleich, sowie FFA und AcA als mögliche Metabolite untersucht. BDA wurde als bekannter Metabolit von Furan eingesetzt und diente als Grundlage für die manuelle Durchführung von AcA, da die automatische Abfrage von AcA nicht möglich war. Jedoch stimmten die relevanten *structural alerts* mit denen von BDA überein.

6.3.2. QSAR toolbox (der OECD)

Die Untersuchung von MF *in silico* mittels *QSAR toolbox* wurde streng nach den Vorlagen und Fallbeispielen der ECHA durchgeführt. Diese sind im elektronischen Anhang (I) oder auf der offiziellen Website der OECD zur *QSAR toolbox* hinterlegt. Die grundlegenden Schritte sind im Folgenden aufgelistet und umfassen je nach Fragestellung verschiedene Optionen.

(1) Eingabe (*input*)

Die Eingabe der zu untersuchenden Substanz kann als einzelne Chemikalie oder Liste solcher erfolgen, wobei auch die Suche nach Subfragmenten möglich ist. Für die spätere Anwendung des RAAF-Konzepts war die explizite Definition des Endpunktes notwendig.

(2) Profilerstellung (*profiling*)

Zur Erstellung eines Profils wurden für den definierten Endpunkt geeigneter Datenbanken und Methoden ausgewählt unter ggf. Berücksichtigung des Metabolismus, bzw. anderweitiger Umsetzung („Transformation“ genannt). Zu Beginn wurde für einen ersten Überblick über die Eigenschaften der Testsubstanz alle *profiling*-Methoden sowie Metabolismus-/Transformations-Simulationen durchgeführt. Dieser allgemeine, unspezifische Schritt beeinflusste jedoch nicht die folgende Abschätzung.

(3) Datenimport (*data import*)

Für den Datenimport wurden nach Markierung des Endpunkts im *profiling*-Modul geeignete Datenbanken im Daten-Modul hervorgehoben, die solche Endpunkte bereitstellen. Generell wurden die Empfehlungen übernommen, bzw. alle Datenbanken ausgewählt, um alle zur Verfügung stehenden Daten zu nutzen. Dies wirkte sich lediglich auf die Rechenzeit, aber nicht auf das Ergebnis aus. In folgenden *workflows* wird das *profiling* und der Datenimport nicht explizit genannt, dennoch sind sie Ausgangspunkt jeder Analyse, woran die kritische erste Kategorisierung – die Selektion vergleichbarer Chemikalien mit bereits bekannten Datenpunkte – anschließt.

(4) Kategorisierung (*category*)

Unter Kategorisierung wurden Analoga auf Basis der strukturellen, mechanistischen und Endpunkt spezifischen Ähnlichkeiten gruppiert (*grouping methods*). Optimaler Weise sollten alle drei Kriterien erfüllt werden. Während die erste Gruppierung im *category definition*-Modul durchgeführt wurde, erfolgte die Subkategorisierung im *data gap filling*-Modul für eine

bessere Nachvollziehbarkeit. Der Schritt der Kategorisierung wurde mit oder ohne Einbezug der Metabolite getestet.

(5) Datenlücken füllen (*data gap filling*)

Mit Hilfe der bekannten Daten von Analoga wurden endpunktspezifische Abschätzungen der unbekannt Substanz möglich, das heißt deren Datenlücke „gefüllt“ (*data gap filling*). Hier wurden parallel zur Liste der Analoga die Datenpunkte im vorläufigen Diagramm gezeigt, in dem der Endpunkt gegen meist log K_{OW} oder dem Molekulargewicht aufgetragen wurde. Ausreißer waren so direkt ersichtlich. Bei der Wahl der Gruppierungsmethode wurden die bestimmten Subgruppen direkt hervorgehoben, was die Erkennung von Mustern und Zusammenhängen zwischen Struktur und Wirkung verdeutlichte. Die Selektion der folgenden Methode war abhängig von der Darstellung der Analoga.

- a) **Trend-Analyse:** Lagen quantitative Werte (wie LD₅₀-Werte) in ausreichendem Umfang vor, wurde eine Trend-Analyse vorgenommen. Hier wurde der explizite Werte gegen meist log K_{OW} aufgetragen, was eine kontinuierliche Auftragung ermöglicht. Voraussetzung war somit das Vorliegen der Ergebnisse als kontinuierliche Daten (ein beliebiger Zahlenwert innerhalb eines numerischen Intervalls kann angenommen werden).
- b) **Read across:** Lagen dagegen qualitative Daten mit einer geringen Anzahl an Möglichkeiten (wie „positiv“/„negativ“ im Ames-Test) vor, wurde ein *read across* durchgeführt. Hier wird von Datensätzen mit diskreten Werte (nur endlich viele Werte können angenommen werden) gesprochen. Dies war auch der Fall, wenn unterschiedliche Einheiten oder Endpunkte herangezogen wurden, deren Daten dann in Kategorien aufgeteilt dargestellt wurden. Zum Beispiel beim allgemeinen Endpunkt „chemische Reaktivität“ wurden die unterschiedlichen Reaktivitäten in die Kategorien „keine, niedrig, mittel, hoch“ gestaffelt.

Als allgemeine Einstellung wurde die maximale Datennutzung zur Anwendung des *worst case*-Szenario gewählt. Die weitere Eingrenzung der Analoga (Subkategorisierung) stellt somit wie die primäre Kategorisierung eine kritische Schlüsselrolle dar. Die wissenschaftliche Validität und Robustheit dessen kann über die Kategorie-Konsistenz-Prüfung (*consistency of category elements*) bewertet werden. Hier wurde im Rahmen der RAAF je nach Daten-Szenario ein angepasstes Set an Bewertungselementen (*assessment elements*, AE) durchgeführt.

Workflows

Für die Endpunkte Ökotoxikologie und Hautsensibilisierung bestand die Möglichkeit im Rahmen eines automatisierten oder standardisierten *workflows* nach der Eingabe (*input*, 1) direkt zur Annahme der Abschätzung zu springen. Hier übernahm das Programm die zwischenliegenden Schritte wie die Gruppierung und (Sub-)Kategorisierung von Analoga. Im Gegensatz zum automatisierten *workflow* bestand beim Standardisierten nach jeder (vom Programm ausgewählten) Subkategorisierung die Möglichkeit in den Prozess des *data gap filling* (5) einzugreifen.

RAAF (Read across assessment framework)

Zur Einhaltung der REACH-Regularien muss jedes *read across* auf struktureller Ähnlichkeit zwischen Ziel- und Quellsubstanz beruhen. Daher empfiehlt die ECHA die primäre Gruppierung mit strukturbezogenen Methoden vorzunehmen, wobei strukturelle Unterschiede keine Auswirkung auf die toxikologischen Eigenschaften haben dürfen (*consistency of category*). Somit müssen auch mechanistische und endpunktspezifische Überlegungen miteinbezogen werden, was als *read across*-Hypothese definiert wurde. Es galt die Hypothese „die Zielsubstanz ist mit den Quellsubstanzen vergleichbar“ zu beweisen. Das RAAF diene hier als Werkzeug zur wissenschaftlichen Beurteilung der Robustheit des *read across*, das heißt ob die Daten der Analoga auf die Testsubstanz übertragen werden können. Waren keine regulären Muster innerhalb einer Kategorie ersichtlich, wurde die Abschätzung auf dem *read across* eines Kategorie-Mitglieds in konservativer Weise (*worst case*-Szenario) basiert. Eine Unterschätzung von Effekten durch Varianz in der Toxikokinetik (ADME) und/oder einer gesteigerten Potenz zur Quellsubstanz sollte so vermieden werden.

Zur Identifikation des geeigneten Szenarios im RAAF wurde das Fließschema gemäß Abb. 62 wie folgt abgefragt (ECHA, 2017):

- Welcher Konzepttyp liegt vor? (*typ of approach*)
 - a) Analoge-Ansatz (*analogue approach*): Wenn die Anzahl der Analoga ≤ 3 .
 - b) Kategorie-Ansatz (*category approach*): Wenn die Anzahl der Analoga > 3 .
- Im Falle eines Kategorie-Ansatzes: Gibt es quantitative Abweichungen in den Eigenschaften zwischen Analoga innerhalb einer Kategorie?
 - a) Variation, falls der Unterschied $> 1 \log$ Einheit
 - b) Keine Variation, falls der Unterschied $\leq 1 \log$ Einheit

Dabei sollten die Unterschiede als regelmäßige Muster, z.B. als Abhängigkeit von der chemischen Struktur wie eine zunehmende Anzahl an der entscheidenden funktionellen Gruppe, erklärt werden können.
- Auf welcher Basis beruht die *read across*-Hypothese?
 - a) (Bio-)Transformation zu gleicher/n Substanz/en (Metabolite): Die verschiedenen Substanzen werden zu den/dem gleichen Metaboliten, bzw. Intermediaten, in bedeutendem Ausmaß umgesetzt. Im Falle des Metabolismus ist die ADME und Bioverfügbarkeit von entscheidender Bedeutung für die Exposition, Toxizität und folglich der Wahl der Szenarien hier.
 - b) Verschiedene Stoffe mit gleicher Art von Effekten (Wirkung): Die verschiedenen Substanzen haben gleiche oder ähnliche toxikologische Eigenschaften, die auf dem gleichen mechanistischen Prinzip beruhen. Diese *read across*-Hypothese kann auch für negative Effekte Vorhersagen liefern.

Das entsprechend geeignete Szenario wurde im Rahmen des RAAF bei Erstellung des Berichts ausgewählt.

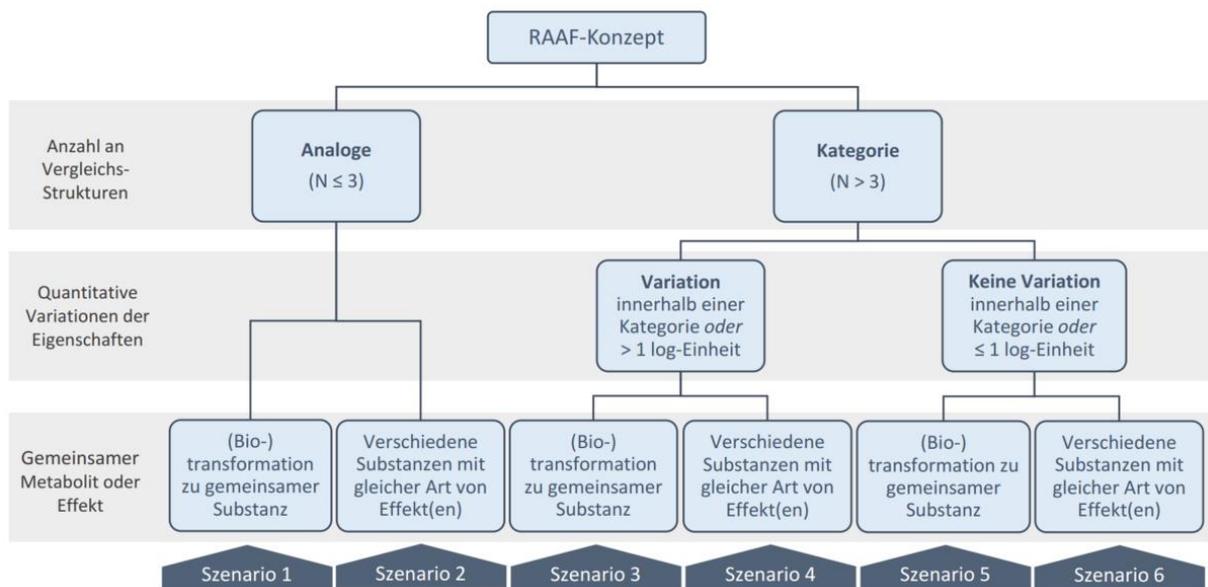


Abb. 62: Entscheidungsschema zur Wahl eines geeigneten Szenarios im RAAF (modifiziert nach Richtlinien der OECD). RAAF: (engl.) *read-across assessment framework*.

(6) Bericht erstellen (*report*)

Zum Schluss wurden die Ergebnisse mit ggf. RAAF als Bewertungstool des *read across* im Bericht (*report*) detailliert aufgeführt. Die original von *QSAR toolbox* generierten Berichte sind dem elektronischen Anhang (I) zu entnehmen.

6.4. Synthesen

Synthetisiert wurde AcA sowie dessen Reaktionsprodukte mit AcLys, AcCys, dA, dG und dC. Des Weiteren wurden AcLys-BDA, $^{15}\text{N}_5$ -dA-AcA und $^{15}\text{N}_5$ -dG-AcA als interne Standards hergestellt. AcLys-BDA wurden zudem als Vergleich für die Charakterisierung von AcLys-AcA herangezogen.

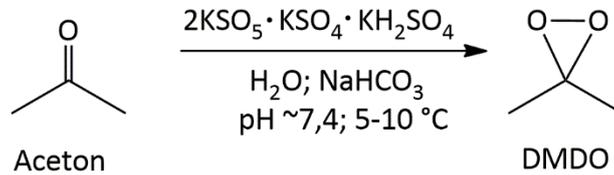
Während der Reaktion wurde der Fortschritt mittels Dünnschichtchromatografie (DC) verfolgt. Die Reinheit einer Synthese wurde primär über das ^1H -NMR-Spektrum bestimmt und zur weiteren Charakterisierung via ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie untersucht. Bei Bedarf wurde zur Aufklärung komplexere NMR-Messverfahren sowie massenspektrometrische *high resolution scans* durchgeführt.

Die Synthese von AcLys-BDA wurde nach der Methode von Chen *et al.* (1997) bereits von Jonathan I. Kremer (in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Richling, TU Kaiserslautern, unpublizierte Daten) durchgeführt und in dieser Arbeit angepasst. Im Gegensatz dazu wurde die Synthese von AcA und seinen Addukten hier erstmalig durchgeführt. Für die Adduktsynthesen wurde die saure Hydrolyse von DHDMFu nach Chen *et al.* (1997) zugrunde gelegt und auf das methylierte Derivat (DHDMMF) übertragen. Die Modifikation umfasste zudem die Wahl der Reaktionspartner (*N*-acetylierte Aminosäuren und Nukleoside) sowie volumen- und konzentrationsbezogene Optimierung. Die präparative Aufreinigung der Syntheseprodukte wurde selbstständig etabliert.

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Edukte kommerziell erworben. Die entsprechenden Hersteller bzw. Lieferanten und gegebenenfalls Reinheitsgrade sind in Kap. 6.2 zusammengefasst.

6.4.1. Synthese von Dimethyldioxiran (DMDO)

3,3-Dimethyldioxiran

Syntheschema:Synthesevorschrift: nach Adam et al. (1991)

Es wurde H₂O (254 mL), Aceton (192 mL) und NaHCO₃ (58 g) auf 5–10 °C kühlt und unter starkem Rühren Oxone® (120 g 2KHSO₅·KHSO₄·K₂SO₄) aufgeteilt in 5 Portionen im Abstand von 3–5 min zugeben. 5 min nach der letzten Zugabe wurde das Produkt durch Reduktion des Drucks auf 100–130 mbar sowie Erhöhung der Temperatur auf Raumtemperatur in eine auf –78 °C gekühlte Vorlage destilliert. Das Destillat wurde über K₂CO₃ getrocknet und im N₂-Gegenstrom filtriert. Gelagert wurde die DMDO-haltige Lösung unter Schutzgas (Argon) bei –20 °C.

Zur Bestimmung der DMDO-Konzentration mittels Iodometrie wurde DMDO (2 mL) in eine Lösung aus H₂O (20 mL), Kaliumiodid-Lösung (2,22 g KI ad 10 mL H₂O) und Eisessig (1 mL) gegeben. Titriert wurde die Probelösung gegen Natriumthiosulfat-Maßlösung (0,02 M; 0,4964 g Na₂S₂O₃·5 H₂O ad 100 mL H₂O) bis zur Farblosigkeit. Die Konzentration an DMDO wurde wie folgt berechnet.

$$c_{\text{DMDO}}[\text{M}] = \frac{c_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}[\text{M}] \cdot V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}[\text{mL}]}{V_{\text{DMDO}}[\text{mL}] \cdot 2}$$

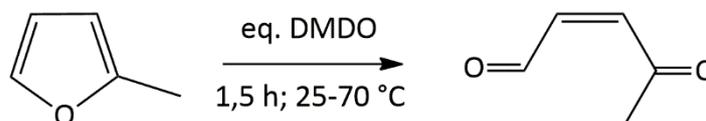
Ausbeute:

M(C₃H₆O₂) = 74,08 g/mol

94 mL; 0,095 M (8,88 mmol) leicht gelbe Lösung

6.4.2. Synthese von 3-Acetylacrolein

4-Oxopent-2-enal

Syntheschema:Synthesevorschrift:

2-Methylfuran (zur Synthese BHT-stabilisiert; 0,6752 mL; 7,275 mmol) wurde in über K_2CO_3 getrocknetem Aceton (6,623 mL) zu einer 1-molaren Lösung verdünnt und äquimolar mit DMDO-Lösung (Synthese siehe Kap. 6.4.1; 97 mL; 7,275 mmol) für 45 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Aceton bei 70–80 °C abdestilliert. Der Rückstand wurde über Flash-Kieselgel aufgereinigt, wobei als Lösungsmittel Pentan:Diethylether diente, dessen Verhältnis von 3:1 über 1:1 zu 1:3 variiert wurde. Die Abtrennung des Produkts von Nebenprodukten wurde stets mittels DC (Hexan:Ethylacetat, 1:3) verfolgt. Die Lösungsmittel wurden bei 40 °C entfernt und über Nacht bei Raumtemperatur restlos verdampft.

Ausbeute:

$M(C_5H_6O_2) = 98,10 \text{ g/mol}$

0,5960 g (5,670 mmol, 78 %; gelbe, viskose Flüssigkeit)

Reinheit (1H -NMR): 91 %

Charakterisierung:

R_f (DC) = 0,78

***cis*-AcA**

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] 10.09 (d, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 1H), 6.94 (d, $J = 11.8 \text{ Hz}$, 1H), 6.10 (dd, $J = 11.8, 7.1 \text{ Hz}$, 1H), 2.32 (s, 3H).

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ [ppm] 9.94 (d, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 1H), 7.20 (d, $J = 11.8 \text{ Hz}$, 1H), 6.22 (dd, $J = 11.8, 6.9 \text{ Hz}$, 1H), 2.34 (s, 3H).

^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO): δ [ppm] 199.40, 193.08, 142.51, 136.53, 30.31.

Stabilitätsuntersuchung:

cis-AcA Lagerung 1 Monat –20 °C:

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] 10.09 (d, $J = 7.1 \text{ Hz}$, 1H), 6.94 (d, $J = 11.8 \text{ Hz}$, 1H), 6.10 (dd, $J = 11.8, 7.1 \text{ Hz}$, 1H), 2.32 (s, 3H).

1H -NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$): δ [ppm] 9.94 (d, $J = 6.9 \text{ Hz}$, 1H), 7.20 (d, $J = 11.8 \text{ Hz}$, 1H), 6.22 (dd, $J = 11.8, 6.9 \text{ Hz}$, 1H), 2.34 (s, 3H).

^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO): δ [ppm] 199.40, 193.08, 142.51, 136.53, 30.31.

trans-AcA

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] 9.78 (dd, $J = 7.4, 1.1$ Hz, 1H), 7.01 (dd, $J = 16.2, 1.2$ Hz, 1H), 6.78 (ddd, $J = 16.2, 7.4, 1.6$ Hz, 2H), 2.38 (s, 3H).

Lagerung 4,5 Monat 4 °C: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] 9.78 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 6.78 (dd, $J = 16.2, 7.4$ Hz, 1H), 2.38 (s, 3H).

Lagerung 11 Monat, 4 °C: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] 9.78 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 6.78 (dd, $J = 16.2, 7.3$ Hz, 1H), 2.38 (s, 3H).

trans-AcA (I) + cis-AcA (II):

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] 9.93 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H_{II}), 9.77 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H_{I}), 7.19 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H_{I}), 7.00 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H_{II}), 6.77 (dd, $J = 16.2, 7.4$ Hz, 1H_{II}), 6.20 (dd, $J = 11.8, 6.9$ Hz, 1H_{I}), 2.37 (s, 3H_{I}), 2.33 (s, 3H_{II}). $\text{H}_{\text{I}}:\text{H}_{\text{II}} = 1:0,45$.

cis-AcA (I) + cis-AcA_I-OH₂ (II) + cis-AcA_{II}-OH₂ (III)

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ [ppm] 9.93 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H_{I}), 7.22 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H_{I}), 6.27 (dd, $J = 11.9, 7.1$ Hz, 1H_{I}), 6.16 (ddd, $J = 5.8, 2.8, 1.2$ Hz, $2\text{H}_{\text{II/III}}$), 6.07 (s, 1H_{III}), 6.01 (d, $J = 5.8$ Hz, $2\text{H}_{\text{III/II}}$), 5.86 (s, 1H_{II}), 2.41 (s, 3H_{I}), 1.57 (s, $3\text{H}_{\text{II/III}}$), 1.49 (s, $3\text{H}_{\text{III/II}}$). $\text{H}_{\text{I}}:\text{H}_{\text{II}}:\text{H}_{\text{III}} = 0,2:1:1$

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O): δ [ppm] 202.58, 195.76, 143.78, 137.77, 136.75, 136.66, 131.38, 131.09, 109.63, 108.71, 102.06, 101.12, 31.39, 28.25, 26.96.

trans-AcA (I) + trans-AcA-OH₂ (II):

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ [ppm] 9.63 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H_{I}), 6.97 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H_{I}), 6.76 (dd, $J = 16.2, 7.5$ Hz, 1H_{I}), 6.72 (dd, $J = 16.1, 4.6$ Hz, 1H_{II}), 6.22 (dd, $J = 16.1, 1.0$ Hz, 1H_{II}), 5.51 (dd, $J = 4.7, 1.1$ Hz, 1H_{II}), 2.38 (s, 3H_{I}), 2.27 (s, 3H_{II}). $\text{H}_{\text{I}}:\text{H}_{\text{II}} = 1:0,65$.

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, D_2O): δ [ppm] 204.20, 203.03, 197.49, 146.33, 145.81, 138.22, 130.36, 88.20, 27.55, 26.49.

In $\text{DMSO-}d_6$ nach determinierter D_2O -Zugabe:

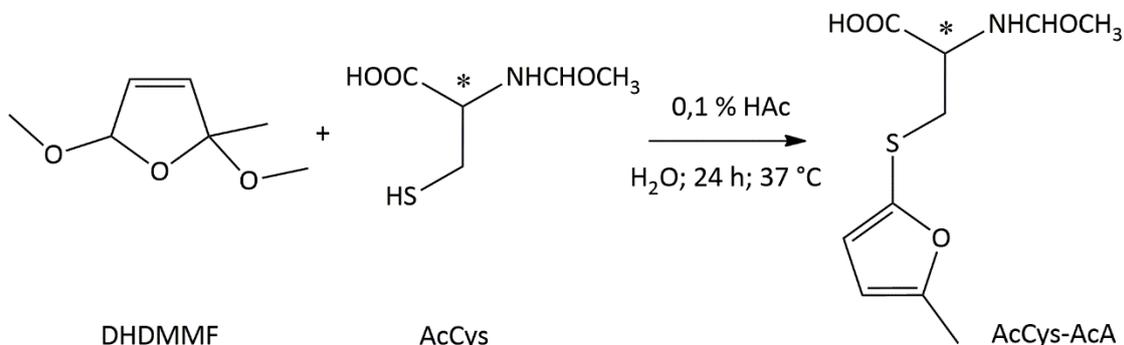
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] 9.67 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H_{I}), 6.94 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H_{I}), 6.68 (dd, $J = 16.2, 7.4$ Hz, 1H_{I}), 6.62 (dd, $J = 16.1, 4.8$ Hz, 1H_{II}), 6.10 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H_{II}), 5.31 (dd, $J = 4.7, 1.0$ Hz, 1H_{II}), 4.09 (s, H_{II}^*), 2.33 (s, 3H_{I}), 2.19 (s, 3H_{II}). $\text{H}_{\text{I}}:\text{H}_{\text{II}} = 1:0,43$. *) nicht integrierbar.

HPLC-ESI⁺-MS/MS (0,5 % HCOOH in H_2O): MS^2_{A} [m/z] 116,96/106,9; 99,1; 89,0; 79,0; 72,9; 68,9; 63,0; 61,0. MS^2_{B} [m/z] 84,99/72,0; 67,8; 57,0.

Spektren mit Auswertung der zeitabhängigen Messungen sind dem elektronischen Anhang (II) zu entnehmen.

6.4.3. Synthese von AcCys-AcA

2-Acetamido-3-((5-methylfuran-2-yl)thio)-propionsäure

Syntheschema:Synthesevorschrift: Saure Hydrolyse modifiziert nach Chen et al. (1997)

2,5-Dihydro-2,5-dimethoxy-2-methylfuran (14,16 μL ; 100 μmol ; DHDMMF) wurde in 0,1 %iger, wässriger Essigsäure (986 μL) 1 h bei 37 $^\circ\text{C}$ gerührt (500 rpm), bevor N_α -Acetyl-L-cystein (8,160 mg; 50 μmol) gelöst in 1 mL Wasser zugeben wurde. Die Lösung wurde 24 h bei 37 $^\circ\text{C}$ gerührt und weitere 10 h nach Zugabe von 5 μL Essigsäure (100 %). Das Reaktionsgemisch wurde semipräparativ (Kap. 6.5.1) in zwei Schritten getrennt, wobei die massenspektrometrisch überprüften Fraktionen vereinigt wurden. Deren Volumen wurden unter reduziertem Druck (20 mbar; 1400 rpm; 30 $^\circ\text{C}$) auf ~ 10 mL reduziert und der Rückstand lyophilisiert (0,47 mbar; 15 $^\circ\text{C}$).

Ausbeute:

$M(\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}) = 243,28 \text{ g/mol}$

4,356 mg (17,9 μmol , 36 %; weißer Feststoff)

Reinheit ($^1\text{H-NMR}$): 97 %

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O): δ [ppm] 6.54 (d, $J = 3.1 \text{ Hz}$, 1H), 6.09 (m, 1H), 4.48 (dd, $J = 8.2, 4.1 \text{ Hz}$, 1H), 3.25 (dd, $J = 14.3, 4.1 \text{ Hz}$, 1H), 3.07 (dd, $J = 14.3, 8.3 \text{ Hz}$, 1H), 2.27 (s, 3H), 2.00 (s, 3H).

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] 8.26 (d, $J = 7.9 \text{ Hz}$, 1H), 6.53 (d, $J = 2.8 \text{ Hz}$, 1H), 6.13 (m, 1H), 4.30 (td, $J = 8.4, 4.7 \text{ Hz}$, 1H), 3.08 (dd, $J = 13.6, 4.6 \text{ Hz}$, 1H), 2.89 (dd, $J = 13.4, 8.8 \text{ Hz}$, 1H), 2.27 (s, 3H), 1.85 (s, 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, D_2O): δ [ppm] 173.99, 173.86, 156.81, 140.46, 120.10, 107.91, 53.07, 36.17, 21.60, 12.92.

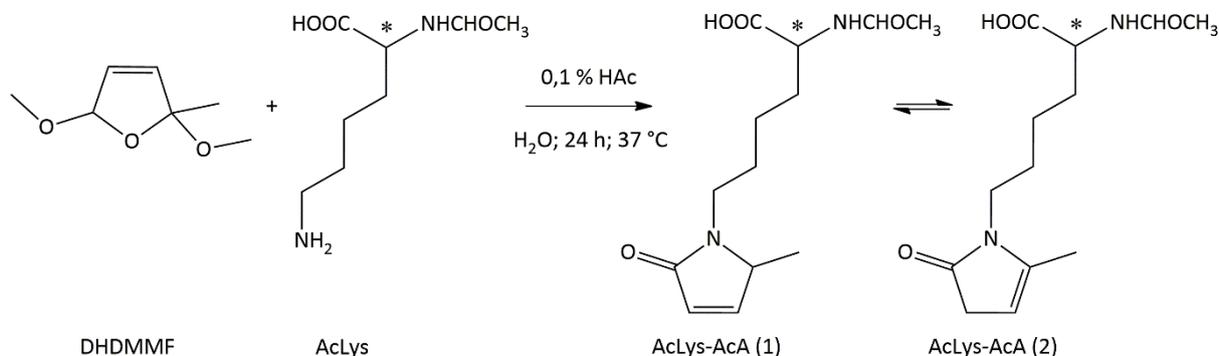
HPLC-ESI-MS/MS: MS^2 [m/z] 241,9/113,0; 85,0; 70,0.

UV-Vis (H_2O): $\lambda_{\text{max}} = 250 \text{ nm}$; 223 nm.

6.4.4. Synthese von AcLys-AcA

2-Acetamido-6-(2-methyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-hexansäure

Syntheschema:



Synthesevorschrift: Saure Hydrolyse modifiziert nach Chen et al. (1997)

2,5-Dihydro-2,5-dimethoxy-2-methylfuran (39,5 μ L; 273 μ mol; DHDMMF) wurde in 0,1 %iger, wässriger Essigsäure (1,961 mL) 1 h bei 37 °C gerührt (500 rpm), bevor *N*_α-Acetyl-L-lysin (51,39 mg; 273 μ mol) gelöst in 2 mL Wasser zugeben wurde. Die Lösung wurde 24 h bei 37 °C gerührt und weitere 10 h nach Zugabe von 6,13 μ L Essigsäure (100 %). Das Reaktionsgemisch wurde semipräparativ (Kap. 6.5.1) in zwei Schritten getrennt, wobei die massenspektrometrisch überprüften Fraktionen vereinigt wurden. Deren Volumen wurden unter reduziertem Druck (20 mbar; 1400 rpm; 30 °C) auf ~10 mL reduziert und der Rückstand lyophilisiert (0,47 mbar; 15 °C).

Ausbeute:

$M(C_{13}H_{20}N_2O_4) = 268,31 \text{ g/mol}$

29,067 mg (108,3 μ mol; 40 %; weißer Feststoff)

Reinheit (¹H-NMR): In D₂O konnten keine Nebenprodukte identifiziert werden, unter der Voraussetzung, dass die nicht strikt zugeordneten Multipletts keine Verunreinigungen darstellen oder beinhalten. In DMSO-*d*₆ oder MECN-*d*₃ wurden vielfach Nebenprodukte gebildet, die jedoch auch aufgrund der mangelhaften Differenzierbarkeit keine Reinheitsbestimmung zulassen.

Charakterisierung:

¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ [ppm] 4.29 (dd, $J = 8,7, 4,8$, 1H) 3.26 – 3.17 (m, 2H), 3.15 (t, $J = 6.7$ Hz, 0H), 2.83 (t, $J = 6.6$ Hz, 0H), 2.56 – 2.48 (m, 1H), 2.45 – 2.36 (m, 1H), 2.26 – 2.20 (m, 1H), 2.19 (s, 0H), 2.12 – 2.04 (m, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.91 – 1.81 (m, 1H), 1.78 – 1.69 (m, 1H), 1.63 – 1.54 (m, 2H), 1.50 (d, $J = 10.0$ Hz, 2H), 1.44 – 1.31 (m, 2H).

^{13}C -NMR (101 MHz, D_2O): δ [ppm] 177.53, 176.07, 174.97*, 174.21, 91.18 (d, $J = 3.9$ Hz), 52.76 (d, $J = 5.6$ Hz), 38.85, 38.70 (d, $J = 2.5$ Hz), 30.03 (d, $J = 2.3$ Hz), 29.28*, 28.59 (d, $J = 8.8$ Hz), 27.76 (d, $J = 8.1$ Hz), 22.59 (d, $J = 1.5$ Hz), 22.23, 21.48. *) geringerer Intensität (0,5-0,05)

^1H -NMR (600 MHz, $\text{MeCN-}d_3$): δ [ppm] 7.02 – 6.93 (m, 0,48H), 6.89 (d, $J = 8.6$ Hz, 0,23H), 6.80 (d, $J = 8.3$ Hz, 0,22H), 4.17 (s, 0,35H), 4.16 – 4.11 (m, 1H), 4.05 (s, 0,31H), 3.42 – 3.29 (m, 0,61H), 3.22 – 2.97 (m, 1,39H), 2.66 – 2.55 (m, 1H), 2.44 – 2.13 (m, 3H), 2.03 (s, 1,22H), 1.86 – 1.83 (m, 3H), 1.76 – 1.54 (m, 2H), 1.55 – 1.38 (m, 2H), 1.35 (d, $J = 3.1$ Hz, 2H), 1.31 – 1.22 (m, 2,15H).

^{13}C -NMR (151 MHz, $\text{MeCN-}d_3$): δ [ppm] 208.62, 177.03, 175.47, 173.97, 171.67, 148.16, 142.36, 90.92, 83.99, 53.29 (d, $J = 20.7$ Hz), 39.72, 39.21, 38.92, 37.27, 35.54, 35.47, 30.28, 29.91, 29.66, 29.51, 26.71, 26.49, 24.34, 23.57, 23.41, 23.30, 22.59, 13.66.

^1H -NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; 313 K): δ [ppm] 12,32 (s), 7.96 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 5,60 (s), 4.14 (q, $J = 7.7$ Hz, 1H), 3.04 (m, 2H), 2.62 (t, $J = 6.9$ Hz, 0,4H), 2.41 – 2.24 (m, 1,2H), 2.21 – 2.10 (m, 0,7H), 2.08 (s, 0,4H), 2.04 – 1.88 (m, 1,4H), 1.85 (s, 3H), 1.75 – 1.63 (m, 1H), 1.62 – 1.41 (m, 3H), 1.36 (s, 2,6H), 1.30 (m, 2H).

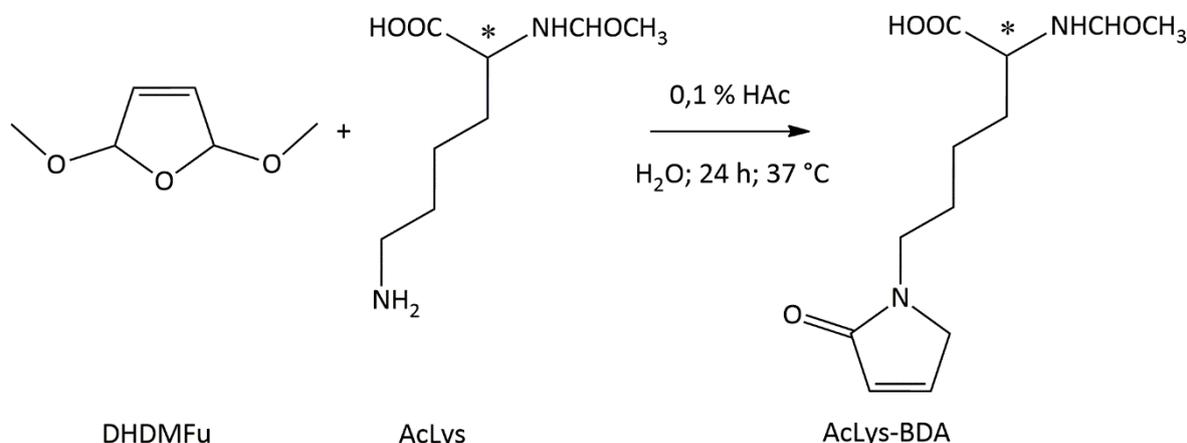
^{13}C -NMR (151 MHz, DMSO): δ [ppm] 207.51, 176.92, 175.20, 173.87, 173.32, 170.98, 169.35, 146.71, 141.06, 98.73, 88.90, 83.47, 51.84, 51.71, 38.80, 38.29, 38.06, 37.94, 37.94, 36.19, 34.48, 30.74, 30.74, 29.71, 29.11, 28.81, 28.69, 28.38, 26.62, 25.64, 23.35, 23.23, 22.91, 22.85, 22.36, 13.24.

HPLC-ESI⁺-MS/MS: MS² [m/z] 269,15/251,14; 227,14; 223,14; 181,13; 164,11; 132,10; 126,09; 98,06; 84,06; 82,07

UV/Vis (H_2O): $\lambda_{\text{max}} = 250$ nm

6.4.5. Synthese von AcLys-BDA

2-Acetamido-6-(2-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-hexansäure

Syntheschema:Synthesevorschrift: Saure Hydrolyse modifiziert nach Chen et al. (1997)

2,5-Dihydro-2,5-dimethoxy-furan (33,2 μL ; 273 μmol ; DHDMFu) wurde in 0,1 %-iger, wässriger Essigsäure (1,961 mL) 1 h bei 37 $^\circ\text{C}$ gerührt (500 rpm), bevor N_α -Acetyl-L-lysin (51,39 mg; 273 μmol) gelöst in 2 mL Wasser zugeben wurde. Die Lösung wurde 24 h bei 37 $^\circ\text{C}$ gerührt und weitere 10 h nach Zugabe von 6,13 μL Essigsäure (100 %). Das Reaktionsgemisch wurde semipräparativ (Kap. 6.5.1) in zwei Schritten getrennt, wobei die massenspektrometrisch überprüften Fraktionen vereinigt wurden. Deren Volumen wurden unter reduziertem Druck (20 mbar; 1400 rpm; 30 $^\circ\text{C}$) auf \sim 10 mL reduziert und der Rückstand lyophilisiert (0,47 mbar; 15 $^\circ\text{C}$).

Ausbeute:

$M(\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4) = 254,28 \text{ g/mol}$

11,097 mg (43,6 μmol ; 16 %; weißer Feststoff)

Reinheit ($^1\text{H-NMR}$): 96 %

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] 8.12 (d, $J = 7.7 \text{ Hz}$, 1H), 7.31 (d, $J = 5.9 \text{ Hz}$, 1H), 6.12 (d, $J = 5.9 \text{ Hz}$, 1H), 4.16 (dq, $J = 8.3, 5.3 \text{ Hz}$, 1H), 4.05 (s, 2H), 3.35 (td, $J = 7.1, 2.9 \text{ Hz}$, 2H), 1.87 (s, 3H), 1.76 – 1.68 (m, 1H), 1.64 – 1.57 (m, 1H), 1.57 – 1.46 (m, 2H), 1.28 (p, $J = 7.3, 6.8 \text{ Hz}$, 3H).

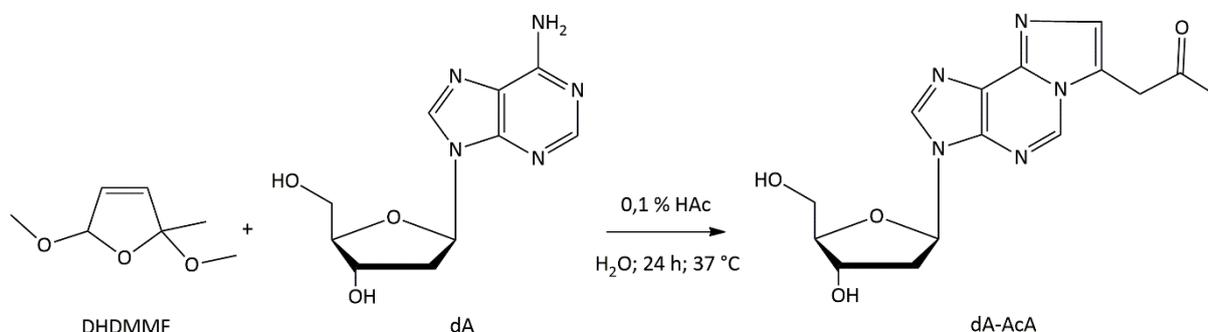
$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO): δ [ppm] 173.85, 170.50, 169.36, 144.58, 126.87, 52.34, 51.71, 40.84, 30.63, 27.66, 22.67, 22.35.

HPLC-ESI⁺-MS/MS: MS^2 [m/z] 255,13/237,12; 213,12; 209,13; 167,12; 150,09; 132,10; 126,09; 124,08; 84,04.

UV/Vis (H_2O): $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$

6.4.6. Synthese von dA-AcA

1-(3-((2*R*,4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-3*H*-imidazo[2,1-*i*]purin-7-yl)propan-2-on

Syntheschema:Synthesevorschrift: Saure Hydrolyse modifiziert nach Chen et al. (1997)

2,5-Dihydro-2,5-dimethoxy-2-methylfuran (354 μ L; 500 μ mol; DHDMMF) wurden mit 3 %-iger Essigsäure (833 μ L) in 23,81 mL Wasser 1 h bei 37 °C gerührt (500 rpm). 2'-Desoxyadenosin-Monohydrat (71 mg; 264 μ mol) wurde in 25 mL Wasser gelöst und dem sauren Reaktionsgemisch zugegeben. Die Lösung wurde 24 h bei 37 °C gerührt und weitere 10 h nach Zugabe von 125 μ L Essigsäure (100 %). Das Reaktionsgemisch wurde präparativ (Kap. 6.5.1) in zwei Schritten getrennt, wobei die massenspektrometrisch überprüften Fraktionen vereinigt wurden. Deren Volumen wurden unter reduziertem Druck (20 mbar; 1400 rpm; 30 °C) auf \sim 10 mL reduziert und der Rückstand lyophilisiert (0,47 mbar; 15 °C).

Ausbeute:

$M(\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_4) = 331,33 \text{ g/mol}$

27,003 mg (81,50 μ mol, 31 %; weißer Feststoff)

Reinheit (¹H-NMR): 93 %

Charakterisierung:

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] 9.00 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.48 (t, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 1H), 5.37 (d, $J = 4.1 \text{ Hz}$, 1H), 4.98 (t, $J = 5.5 \text{ Hz}$, 1H), 4.48 – 4.40 (m, 1H), 4.36 (s, 2H), 3.90 (q, $J = 4.6 \text{ Hz}$, 1H), 3.66 – 3.49 (m, 2H), 2.75 (q, $J = 13.2, 6.1 \text{ Hz}$, 1H), 2.37 (ddd, $J = 13.2, 6.2, 3.3 \text{ Hz}$, 1H), 2.27 (s, 3H).

¹³C-NMR (101 MHz, DMSO): δ [ppm] 204.45, 140.77, 139.91, 137.90, 135.88, 131.98, 123.11, 118.62, 88.03, 84.06, 70.78, 61.73, 37.97, 29.46.

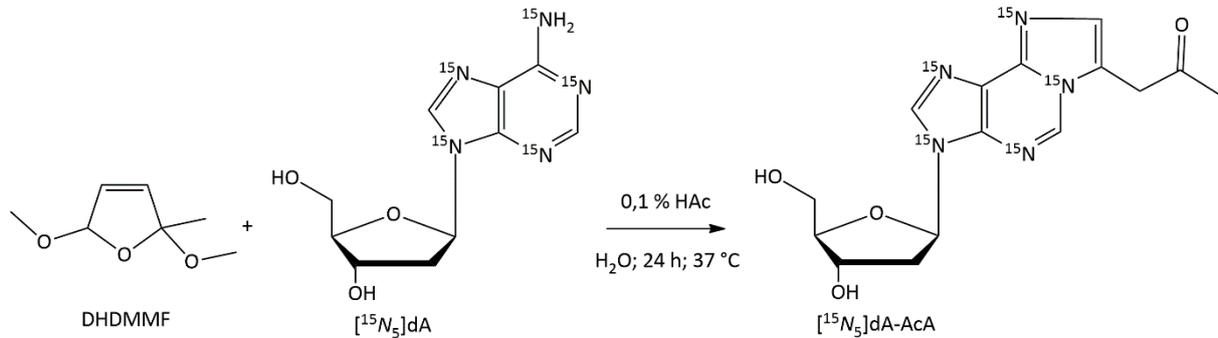
HPLC-ESI⁺-MS/MS: MS² [m/z] 332,0/314,0; 216,2; 186,0; 173,0; 136,2.

UV/Vis (H₂O): $\lambda_{\text{max}} = 225 \text{ nm}$ (schmal); 275 nm (breit)

6.4.7. Synthese von [¹⁵N₅]-dA-AcA

[¹⁵N₅]-1-(3-((2*R*,4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-3*H*-imidazo[2,1-*i*]purin-7-yl)propan-2-on

Syntheschema:



Synthesevorschrift: Saure Hydrolyse modifiziert nach Chen et al. (1997)

[¹⁵N₅]-2'-Desoxyadenosin-Monohydrat (0,828 mg; 2,997 μmol) wurde in 600 μL Wasser gelöst und 2,5-Dihydro-2,5-dimethoxy-2-methylfuran (5,19 μL; 35,87 μmol; DHDMMF) sowie 3 %-ige, wässrige Essigsäure (12,22 μL) zugegeben. Die Lösung wurde 24 h bei 37 °C gerührt und weitere 10 h nach Zugabe von 25 %-iger, wässriger Essigsäure (5,9 μL). Das Reaktionsgemisch wurde präparativ (Kap. 6.5.1) in zwei Schritten getrennt, wobei die massenspektrometrisch überprüften Fraktionen vereinigt wurden. Deren Volumen wurden unter reduziertem Druck (20 mbar; 1400 rpm; 30 °C) auf ~10 mL reduziert.

Ausbeute:

$M(\text{C}_{15}\text{H}_{17}^{15}\text{N}_5\text{O}_4) = 336,29 \text{ g/mol}$

3,2 μg (9 pmol; 0,33 %), bestimmt über Kalibrierung (UV/Vis, MS) des nicht isotopenmarkierten Addukts, da die eingesetzte Menge isotopenmarkierten Edukts zu gering für die gravimetrische Bestimmung des Produkts war.

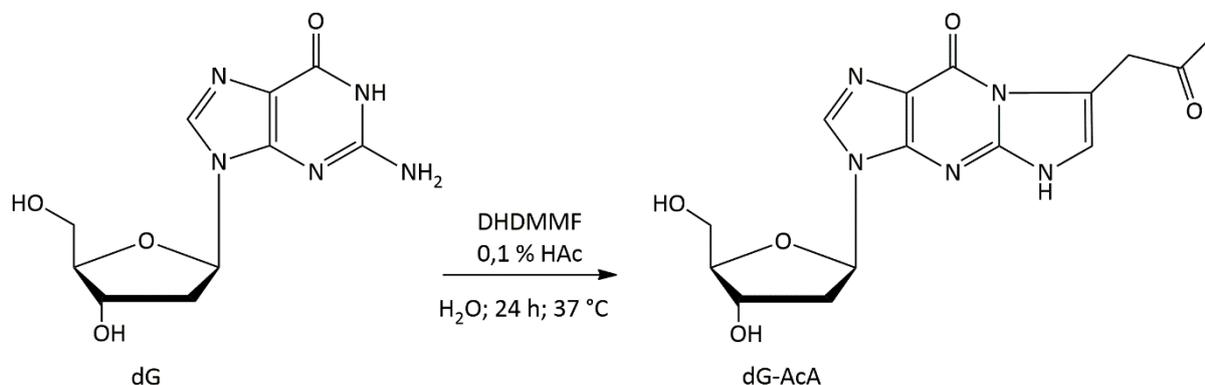
Charakterisierung:

HPLC-ESI⁺-MS/MS: MS² [*m/z*] 337,2/319,2; 221,0; 191,0; 179,2; 141,0.

UV/Vis (H₂O): λ_{max} = 225 nm (schmal); 275 nm (breit).

6.4.8. Synthese von dG-AcA

3-((2R,4S,5R)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-7-(2-oxopropyl)-3H-imidazo[1,2-a]purin-9(5H)-one

Syntheschema:Synthesevorschrift: Saure Hydrolyse modifiziert nach Chen et al. (1997)

2,5-Dihydro-2,5-dimethoxy-2-methylfuran (354 μL ; 500 μmol ; DHDMMF) wurden mit 3 %-iger Essigsäure (833 μL) in 23,81 mL Wasser 1 h bei 40 $^\circ\text{C}$ gerührt (500 rpm). 2'-Desoxyguanosin-Hydrat [6 m-% H_2O] (76 mg; 267 μmol) wurde in 25 mL Wasser suspendiert und im sauren Reaktionsgemisch vollständig gelöst. Die Lösung wurde 24 h bei 37 $^\circ\text{C}$ gerührt und weitere 10 h nach Zugabe von 125 μL Essigsäure (100 %). Das Reaktionsgemisch wurde präparativ (Kap. 6.5.1) in zwei Schritten getrennt, wobei die massenspektrometrisch überprüften Fraktionen vereinigt wurden. Deren Volumen wurden unter reduziertem Druck (20 mbar; 1400 rpm; 30 $^\circ\text{C}$) auf ~ 10 mL reduziert und der Rückstand lyophilisiert (0,47 mbar; 15 $^\circ\text{C}$).

Ausbeute:

$M(\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_5) = 347,33 \text{ g/mol}$

25,885 mg (74,53 μmol , 28 %; weißer Feststoff)

Reinheit ($^1\text{H-NMR}$): 91 %

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] 9.69 (s*), 8.07 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.27 – 6.17 (m, 1H), 5.30 (d, $J = 4.0 \text{ Hz}$, 1H), 4.96 (t, $J = 5.5 \text{ Hz}$, 1H), 4.42 – 4.33 (m, 1H), 4.13 (s, 2H), 3.83 (q, $J = 4.5 \text{ Hz}$, 1H), 3.65 – 3.44 (m, 2H), 2.63 – 2.55 (m, 1H), 2.28 – 2.15 (m+s, 4H).

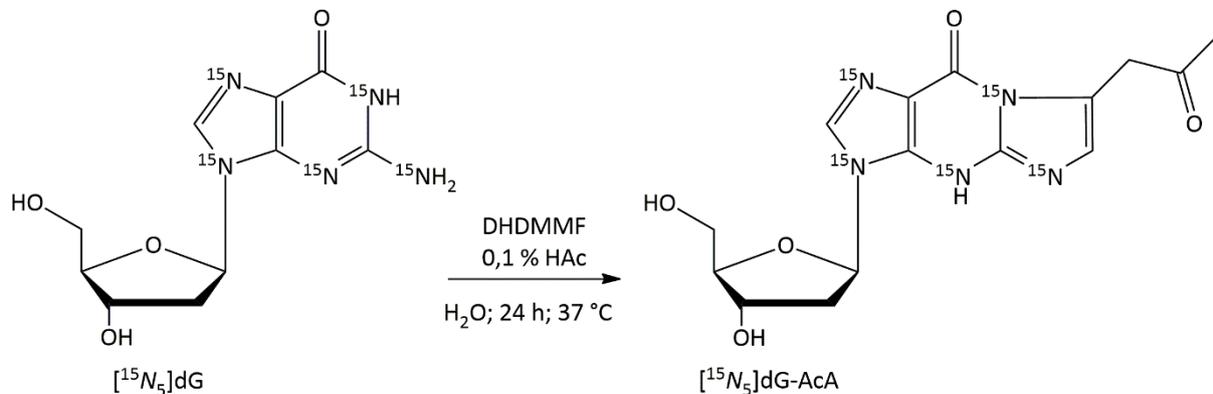
HPLC-ESI⁺-MS/MS: MS^2 [m/z] 348,0/330,2; 232,2; 190,0; 162,0; 152,0; 135,0.

UV/Vis (H_2O): $\lambda_{\text{max}} = 231 \text{ nm}$ (schmal); 286 nm (breit).

6.4.9. Synthese von [¹⁵N₅]-dG-AcA

[¹⁵N₅]-3-((2*R*,4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-7-(2-oxopropyl)-3*H*-imidazo[1,2-*a*]purin-9(4*H*)-on

Syntheschema:



Synthesevorschrift: Saure Hydrolyse modifiziert nach Chen et al. (1997)

[¹⁵N₅]-2'-Desoxyguanosin-Monohydrat (0,726 mg; 2,502 μmol) wurde in 600 μL Wasser gelöst und 2,5-Dihydro-2,5-dimethoxy-2-methylfuran (5,19 μL; 35,87 μmol; DHDMMF) sowie 3 %-ige, wässrige Essigsäure (12,22 μL) zugegeben. Die Lösung wurde 24 h bei 37 °C gerührt und weitere 10 h nach Zugabe von 25 %-iger, wässriger Essigsäure (1,2 μL). Das Reaktionsgemisch wurde präparativ (Kap. 6.5.1) in zwei Schritten getrennt, wobei die massenspektrometrisch überprüften Fraktionen vereinigt wurden. Deren Volumen wurden unter reduziertem Druck (20 mbar; 1400 rpm; 30 °C) auf ~10 mL reduziert.

Ausbeute:

$M(\text{C}_{15}\text{H}_{17}^{15}\text{N}_5\text{O}_5) = 352,29 \text{ g/mol}$

20,8 μg (59 pmol; 2 %), bestimmt über Kalibrierung des nicht isopenmarkierten Addukts, da die eingesetzte Menge isopenmarkierten Edukts zu gering für die gravimetrische Bestimmung des Produkts war.

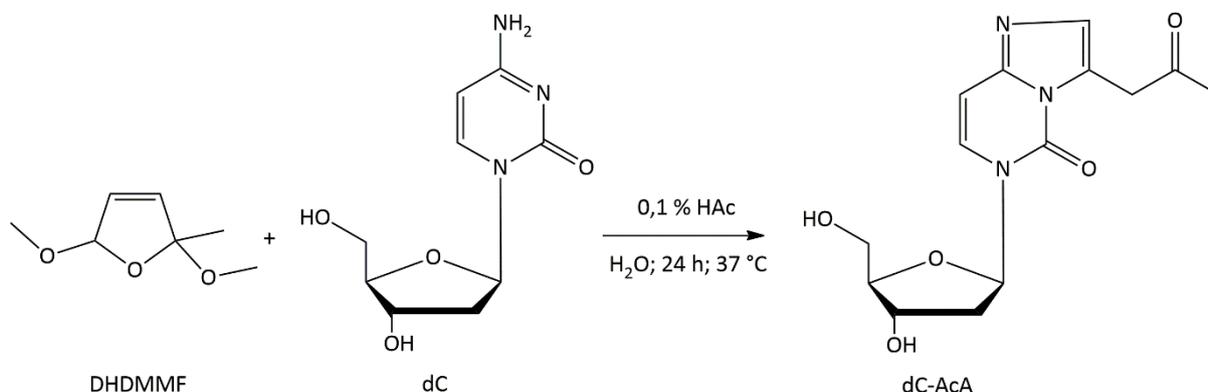
Charakterisierung:

HPLC-ESI⁺-MS/MS: MS² [*m/z*] 353,2/335,0; 237,0; 195,0; 167,0; 139,0.

UV/Vis (H₂O): λ_{max} = 231 nm (schmal); 286 nm (breit).

6.4.10. Synthese von dC-AcA

6-((2*R*,4*S*,5*R*)-4-hydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-3-(2-oxopropyl)imidazo[1,2-*c*]pyrimidin-5(6*H*)-on

Syntheschema:Synthesevorschrift: Saure Hydrolyse modifiziert nach Chen et al. (1997)

2,5-Dihydro-2,5-dimethoxy-2-methylfuran (354 μL ; 500 μmol ; DHDMMF) wurden mit 3 %-iger Essigsäure (833 μL) in 23,81 mL Wasser 1 h bei 37 $^\circ\text{C}$ gerührt (500 rpm). 2'-Desoxycytosin-Monohydrat (81 mg; 330 μmol) wurde in 25 mL Wasser gelöst und dem sauren Reaktionsgemisch zugegeben. Die Lösung wurde 24 h bei 40 $^\circ\text{C}$ gerührt und weitere 10 h nach Zugabe von 125 μL Essigsäure (100 %). Das Reaktionsgemisch wurde präparativ (Kap. 6.5.1) in zwei Schritten getrennt, wobei die massenspektrometrisch überprüften Fraktionen vereinigt wurden. Deren Volumen wurden unter reduziertem Druck (20 mbar; 1400 rpm; 30 $^\circ\text{C}$) auf \sim 10 mL reduziert und der Rückstand lyophilisiert (0,47 mbar; 15 $^\circ\text{C}$).

Ausbeute:

$M(\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5) = 307,30 \text{ g/mol}$

32,294 mg (105,09 μmol , 32 %; weißer Feststoff)

Reinheit ($^1\text{H-NMR}$): 99 %

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] 7.63 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.64 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H), 6.32 (t, $J = 6.8 \text{ Hz}$, 1H), 5.29 (d, $J = 4.2 \text{ Hz}$, 1H), 5.07 (t, $J = 5.1 \text{ Hz}$, 1H), 4.31 – 4.24 (m, 1H), 4.15 (s, 2H), 3.82 (q, $J = 3.5 \text{ Hz}$, 2H), 3.62 – 3.57 (m, 2H) 2.18 (s, 3H), 2.17 – 2.12 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO): δ [ppm] 204.46, 146.88, 145.22, 132.68, 127.92, 123.09, 98.94, 87.71, 84.80, 70.45, 61.31, 40.14, 39.83, 29.37.

HPLC-ESI⁺-MS/MS: MS^2 [m/z] 308,2/192,0; 179,8; 150,0; 135,8; 121,0.

UV/Vis (H_2O): $\lambda_{\text{max}} = 276 \text{ nm}$; (217 nm geringer Intensität).

6.5. Präparative und analytische (U)HPLC-Methoden

Semi-/Präparative Methoden wurden zur Aufreinigung von Synthesegemischen etabliert, während die analytischen Methoden der Quantifizierung der Testsubstanz dienen.

6.5.1. Präparative Methoden

Die präparative Aufarbeitung stellte einen essentiellen Schritt in der Synthese der Reinsubstanzen (Kap. 6.4) dar und wurde für jede Substanz wie folgt angepasst.

Präparative Auftrennung von AcCys-AcA

Das Reaktionsgemisch der Synthese von AcCys-AcA (Kap. 6.4.3) wurde semipräparativ wie folgt aufgearbeitet (Tab. 31) und massenspektrometrisch im Q1-Scan (HPLC-MS/MS-System II, Säule und Fließmittel gemäß Kap. 6.5.2.2) überprüft.

Tab. 31: Parameter der semipräparativen Aufreinigung von AcCys-AcA. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: *N*-Acetyl-L-Cystein.

Geräte-Parameter										
Gerät	HPLC-UV/Vis System I gekoppelt mit Fraktionensammler der präparativen HPLC									
Säule	Synergi-Polar-RP 80 Å, 4 µm, 250 x 10 mm									
Säulenofen	T = 30 °C									
Fließmittel A	H ₂ O									
Fließmittel B	MeCN									
Flussrate	4,5 mL/min									
Injektionsvolumen	100 µL									
MWD	λ [nm] = 230, Bw 16 ± Ref 360, Bw 100 λ [nm] = 260, Bw 16 ± Ref 360, Bw 100									
Fraktionen	Min 20-24; Δ _t = 4 min									
Fließmittelgradient										
t [min]	0	9	9,1	17	17,1	27	27,1	35	35,1	40
Fließmittel A [%]	95	95	90	90	50	50	10	10	95	95
Fließmittel B [%]	5	5	10	10	50	50	90	90	5	5
Retentionszeit R_t										
AcCys-AcA	22 min									

Präparative Auftrennung von AcLys-AcA und AcLys-BDA

Die präparative Aufreinigung des Reaktionsgemischs von AcLys-AcA (Kap. 6.4.4) und AcLys-BDA (Kap. 6.4.5) wurden jeweils in zwei Läufen absolviert. Zunächst wurde mit saurem Fließmittel A aufgetrennt und die massenspektrometrisch überprüften Fraktionen entsprechend vereinigt. Diese wurden im zweiten Lauf mit Wasser als Fließmittel A von der Säure befreit. Die entsprechenden Parameter sind Tab. 32 zu entnehmen.

Tab. 32: Parameter der präparativen Aufreinigung von AcLys-AcA und AcLys-BDA. Nach Trennung des Synthesegemischs in Lauf 1 wurden die entsprechend vereinigten Fraktion in Lauf 2 erneut fraktioniert. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_{α} -Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial.

Geräte-Parameter							
Gerät	Präparative HPLC						
Säule	Synergi-Polar-RP 80 Å, 4 µm, 250 x 10 mm						
Fließmittel A	Lauf 1: 0,1 %ige wässrige Ameisensäure			Lauf 2: H ₂ O			
Fließmittel B	Lauf 1: MeCN			Lauf 2: MeCN			
Flussrate	8 mL/min						
Injektionsvolumen	2 mL						
MWD	λ [nm] = 230, Bw 16 ± Ref 360, Bw 100						
	λ [nm] = 254, Bw 16 ± Ref 360, Bw 100						
Fraktionen	Min 4-10; Δ _t = 0,5 min						
Fließmittelgradient							
t [min]	0	2	15	15,5	18	18,5	22
Fließmittel A [%]	95	95	80	50	50	95	95
Fließmittel B [%]	5	5	20	50	50	5	5
Retentionszeit R_t							
AcLys-AcA	Lauf 1: 5–7,5 min			Lauf 2: 6–8 min			
AcLys-BDA	Lauf 1: 7–8,5 min			Lauf 2: 8–12 min			

Beide AcLys-Addukte lagen nach der Reaktion als Isomere vor, wobei jeweils eines bei λ = 254 nm nicht UV-aktiv war, weshalb alle Fraktionen massenspektrometrisch im Q1-Scan (HPLC-MS/MS-System II, Säule und Fließmittel gemäß Kap. 6.5.2.2) vermessen wurden. Folgende Retentionszeiten und Trennmöglichkeiten (Tab. 33) waren Grundlage weiteren Vorgehens.

Tab. 33: Retentionszeiten der Isomere von AcLys-AcA und AcLys-BDA im Q1-Scan. *) verschiedene Fraktionen durch gelungene präparative Trennung und Basislinientrennung von Misch-/Fraktionen im analytischen Lauf. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_{α} -Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial.

R _t [min]	Hauptisomer	Nebenisomer	Trennung ^{*)}
AcLys-AcA	6,5	6,3	Nein
AcLys-BDA	6,5	5,8	Ja

Während die Hauptisomere mit der größeren Peakfläche den UV-Signalen des präparativen Laufs entsprachen, waren die Nebenisomere nicht UV-aktiv bei $\lambda = 254$ nm und daher nicht mittels Multiwellenlängendetektors (MWD) des präparativen Systems detektierbar.

Präparative Auftrennung von DNA-Addukte

Die Reaktionsgemische der drei DNA-Addukt-Synthesen sowie deren isotope markierten Analoga (Kap. 6.4.6–6.4.10) wurden mit der gleichen Methode aufgearbeitet. Nach präparativer Auftrennung (Tab. 34) wurden die Fraktionen am HPLC-MS/MS-System II (Säule und Fließmittel entsprechend Kap. 6.5.2.4) im Q1-Scan auf ihre Reinheit überprüft.

Tab. 34: Parameter der präparativen Aufreinigung von AcLys-AcA und AcLys-BDA. *) auch entsprechender isotope markierter Standard. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial.

Geräte-Parameter							
Gerät	Präparative HPLC						
Säule	VDSpher PUR C18-SE, 5 μ M, 250 x 20 mm						
Fließmittel A	H ₂ O						
Fließmittel B	MeCN						
Flussrate	10 mL/min						
Injektionsvolumen	10 mL						
MWD	λ [nm] = 254, Bw 8 \pm Ref 360, Bw 100						
	λ [nm] = 270, Bw 8 \pm Ref off						
	λ [nm] = 300, Bw 8 \pm Ref off						
Fraktionen	Min 5-15; $\Delta_t = 1$ min						
Fließmittelgradient							
t [min]	0	2	15	15,5	18	18,5	22
Fließmittel A [%]	95	95	80	50	50	95	95
Fließmittel B [%]	5	5	20	50	50	5	5
Retentionszeit R_t							
dA-AcA	9 min		¹⁵ N ₅ -dA-AcA		9 min		
dG-AcA	9 min		¹⁵ N ₅ -dG-AcA		9 min		
dC-AcA	8 min						

6.5.2. Analytische Methoden

Die Substanzen wurden zunächst substanz- als auch gerätespezifisch getunt, um eine sensitive Methode im MRM-Modus zu entwickeln. Kalibriergeraden wurden als lineare Funktion aus Mittelwerten verschiedener Ansätze an Standardkonzentrationen erstellt. Dafür wurden die Mittelwerte aus dem Verhältnis der Integralfläche (engl.: *area under the curve*, AUC) des Analyten zur AUC des internen Standards berechnet. Die Standardabweichung der Messwerte vom Mittelwert wurden als Fehlerbalken im Diagramm angegeben. Zur weiteren Bestimmung der Robustheit wurden die Residuen und deren Quadrat berechnet, um systematische Fehler über den Konzentrationsbereich zu prüfen. Sie dienten zudem der Bestimmung von Verfahrenskoeffizienten. Zur Validierung der Methoden wurde die Lauf-zu-Lauf- sowie Tag-zu-Tag-Variabilität als prozentuale Abweichung vom Mittelwert angegeben. Es wurde eine Variabilität < 5 % als valide angesehen.

Über die Peakhöhe wurde als Detektionslimit (LOD) ein Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) von 3:1 festgelegt. Währenddessen wurde als Quantifizierungsgrenze (LOQ) ein S/N von 6/1, bzw. 10/1 abhängig vom *Noise*-Profil und kleinstem gemessenen Standard der Kalibriergerade gewählt. Als Parameter der Reproduzierbarkeit wurde eine prozentuale Abweichung von $\leq 5\%$ der Einzelwerte vom Mittelwert herangezogen (Wenzl *et al.*, 2016).

Geradengleichung wurden bewertet über das Bestimmtheitsmaß R^2 , die Residuenverteilung, die Verfahrensstandardabweichung sowie des daraus resultierenden Verfahrensvariationskoeffizienten (Kap. 6.9)

Ebenso wurde die Wiederfindung einer von durchschnittlich zu erwartenden Konzentrationen der Proben (80 %, 100 %, 120 %) sowie im Grenzbereich (höchste/niedrigste zu erwartende Konzentration der Testsubstanz in den Proben) bestimmt.

6.5.2.1. Massenspektrometrische Untersuchung von AcA

Zur Charakterisierung von AcA wurde ein Produktionenscan via ESI⁺-MS/MS-System 2 (API 3200) durchgeführt. Als Fließmittel wurde 0,5%ige Ameisensäure in Wasser genutzt, während über eine Spritzenpumpe AcA (1 und 5 μM) mit einer Flußrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ injiziert wurde. Die Probe wurde aus *trans*-AcA (SL 1 mM in DMSO) hergestellt, welches mit 0,5%iger Ameisensäure in Wasser auf 1 bzw. 5 μM AcA verdünnt wurde. Die massenspektrometrischen Parameter sind in Tab. 35 gezeigt. Als Prekursion wurde das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis m/z 117 vermessen.

Tab. 35: MS-Parameter zur Charakterisierung von AcA via Produktionenscan am ESI⁺-MS/MS-System 2 (API 3200). CAD: *collisionally activated dissociation*, CE: *collision energy*, CEP: *collision cell entrance potential*, CUR: *curtain gas*, CXP: *cell exit potential*, DP: *declustering potential*, dtime: *dwel time*, EP: *entrance potential*, GS1: *nebulizer gas*, GS2: *heater gas*, IS: *ion spray voltage*. AcA: 3-Acetylacrolein.

Gerätespezifische Parameter							
CUR	CAD	IS	GS1	GS2	DP	EP	CEP
[psi]	[psi]	[V]	[psi]	[psi]	[psi]	[V]	[V]
10	5	5500	10	0	66	8	12

6.5.2.2. Quantifizierung von AcCys-AcA

Die Methode zur Quantifizierung von AcCys-AcA wurde zunächst im Rahmen der Etablierung einer geeigneten Abfangreaktion für die Mikrosomeninkubationen entwickelt. Hierzu wurde die Reaktivität *in chemico* als auch bei spezifischen Bedingungen der Inkubation getestet. Im Laufe der *in vitro*-Untersuchungen wurde in Zellüberständen inkubierter pRH nach AcCys-AcA als hypothetischer Biomarker untersucht. Die Parameter der HPLC-ESI-MS/MS-Methode sind in Tab. 36 und Tab. 37 zusammengefasst.

Tab. 36: HPLC-Parameter zur Quantifizierung von AcCys-AcA. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: *N*-Acetyl-L-Cystein.

HPLC-Parameter								
Gerät	HPLC-MS/MS-System II							
Säule	Synergi TM Hydro-RP, 4 µm, 3 x 150 mm Synergi TM Aqua C18, 4 µm, Guard (Vorsäule)							
Säulenofen	T = 25 °C							
Fließmittel A	0,1 %-ige Ameisensäure in H ₂ O							
Fließmittel B	MeCN							
Flussrate	600 µL/min							
Injektionsvolumen	10 µL							
Fließmittelgradient								
t [min]	0	4	4,1	11	11,05	13,5	13,55	15
Fließmittel A [%]	95	95	75	33	5	5	95	95
Fließmittel B [%]	5	5	25	67	95	95	1	1
Retentionszeit R_t								
AcCys-AcA	9,0 min							

Der Massenübergang bei m/z 241,9/112,9 diene als *Quantifier*, während m/z 241,9/69,9 und m/z 241,9/84,9 als *Qualifier* herangezogen wurden.

Tab. 37: MS-Parameter zur Quantifizierung von AcCys-AcA. Unterstrichene Massenübergänge dienten als Quantifier, während die übrigen als Qualifier herangezogen wurden. CAD: *collisionally activated dissociation*, CE: *collision energy*, CEP: *collision cell entrance potential*, CUR: *curtain gas*, CXP: *cell exit potential*, DP: *declustering potential*, dtime: *dwell time*, EP: *entrance potential*, GS1: *nebulizer gas*, GS2: *heater gas*, IS: *ion spray voltage*, Q1: *quadrupol 1*, Q3: *quadrupol 3*, TEMP: *ion source temperatur*. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: *N*-Acetyl-L-Cystein, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Substanzspezifische Parameter								
Substanz	Q1	Q3	dtime	DP	EP	CEP	CE	CXP
	[m/z]	[m/z]	[msec]	[V]	[V]	[V]	[eV]	[V]
AcCys-AcA	<u>241,9</u>	<u>112,9</u>	150	-40	-10,5	-16	-14	-5
	241,9	69,9	150	-40	-10,5	-16	-64	-5
	241,9	84,9	150	-40	-10,5	-16	-48	-5
Gerätespezifische Parameter								
CUR	CAD	IS	TEMP	GS1	GS2			
[psi]	[psi]	[V]	[°C]	[psi]	[psi]			
50	2	-4500	550	35	50			

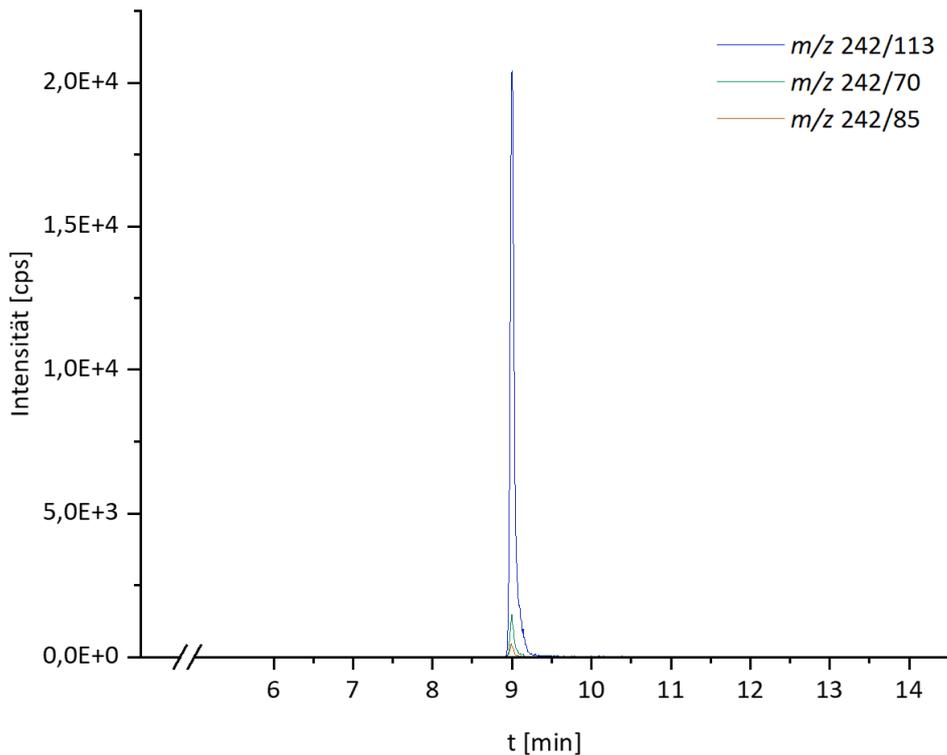


Abb. 63: HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm von AcCys-AcA (1 µM) im MRM-Modus. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: *N*-Acetyl-L-Cystein, *m/z*: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Für die Kalibrierung von AcCys-AcA wurde eine Konzentrationsreihe von 0,001–50 µM in der Startzusammensetzung des Fließmittels (5 % MeCN; 95 % Wasser mit 0,1 % Ameisensäure) hergestellt (Schema Tab. 38). Zunächst wurden drei SL angesetzt mit Konzentrationen von 1 mM (1 mg plus 4,11 mL H₂O), 10 µM (10 µL SL_{1 mM} *ad* 1 mL H₂O) und 1 µM (50 µL SL_{10 µM} *ad* 500 µL H₂O), aus denen ZV hergestellt wurden. Diese entsprachen der jeweils 20-fachen Konzentration der Endlösung und wurden ebenfalls in Wasser angesetzt. Im letzten Schritt wurde die Endlösung erreicht durch Verdünnung von 10 µL ZV mit 90 µL LM, dessen Zusammensetzung (500 µL MeCN + 9,5 µL Ameisensäure + 8,49 mL H₂O) den wässrigen Anteil der ZV berücksichtigte.

Tab. 38: Ansatz der Zwischenverdünnung und Endlösung der Konzentrationsreihe von AcCys-AcA. LM: Fließmittelzusammensetzung unter Berücksichtigung des wässrigen Anteils der ZV. EL: Endlösung, LM: Lösungsmittel, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: *N*-Acetyl-L-Cystein.

Endlösung		Zwischenverdünnung							
c(EL) [nM]	VF aus ZV	V(ZV) [µl]	V(LM*) [µL]	c(ZV) [µM]	VF aus SL	c(SL) [µM]	V(SL) [µl]	V(H ₂ O) [µL]	V _{gesamt} [µL]
1	0,1	10	90	0,01	0,01	1	10	990	1000
2,5	0,1	10	90	0,025	0,025	1	25	975	1000
5	0,1	10	90	0,05	0,05	1	5	95	100
7,5	0,1	10	90	0,075	0,075	1	7,5	92,5	100
10	0,1	10	90	0,1	0,1	1	10	90	100
100	0,1	10	90	1	1	1	100	0	100
1000	0,1	10	90	10	0,01	1000	10	990	1000
10000	0,1	10	90	100	0,1	1000	10	90	100
50000	0,1	10	90	500	0,5	1000	50	50	100

Basierend auf der Kalibrierreihe (Tab. 38, Tab. 44) wurde die Regressionsgerade mit zugehörigen Validierungsparametern in Tab. 39 erhalten. Sie wurde im relevanten Bereich auch in Abb. 64 dargestellt. Die Validierungsparameter beschreiben eine valide sowie robuste Methode zur Detektion von AcCys-AcA im relevanten Konzentrationsbereich von 2,5–100 nM AcCys-AcA. Die Verteilung der Residuen war unauffällig. Der berechnete LOD von 1 nM wurde messtechnisch bestätigt.

Tab. 39: Kalibrierung von AcCys-AcA mit Validierungsparametern für den Bereich 2,5–100 nM. Analyt: AcCys-AcA, AUC: *area under the curve*, m: Mittelwert, LOD: Detektionsgrenze, LOQ: Quantifizierungsgrenze, Übergang: Massenübergang, Stabw.: Standardabweichung, VarK: Varianzkoeffizient. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: *N*-Acetyl-L-Cystein.

c(Analyt)			AUC(Analyt)			
[nM]	m	stabw	Achsenabschnitt			
2,5	2,08E+02	3,28E+01	31,3			
5	4,09E+02	3,35E+01	Steigung	72,9		
7,5	5,73E+02	1,84E+01	R ²	0,9999		
10	7,97E+02	7,27E+01	Verfahrens-Stabw.	0,33 nM		
100	7,32E+03	3,59E+02	Verfahrens-VarK	1,56 %		
1000	8,54E+04	7,24E+03	Lauf-zu-Lauf-Variabilität	3,2%		
10000	7,36E+05	2,69E+04	Tag-zu-Tag-Variabilität	3,4%		
			LOD _{theoretisch}	1 nM		
			LOQ	2,5 nM		
			Übergang 2/Übergang 1	7,3%		
			Übergang 3/Übergang 1	2,3%		

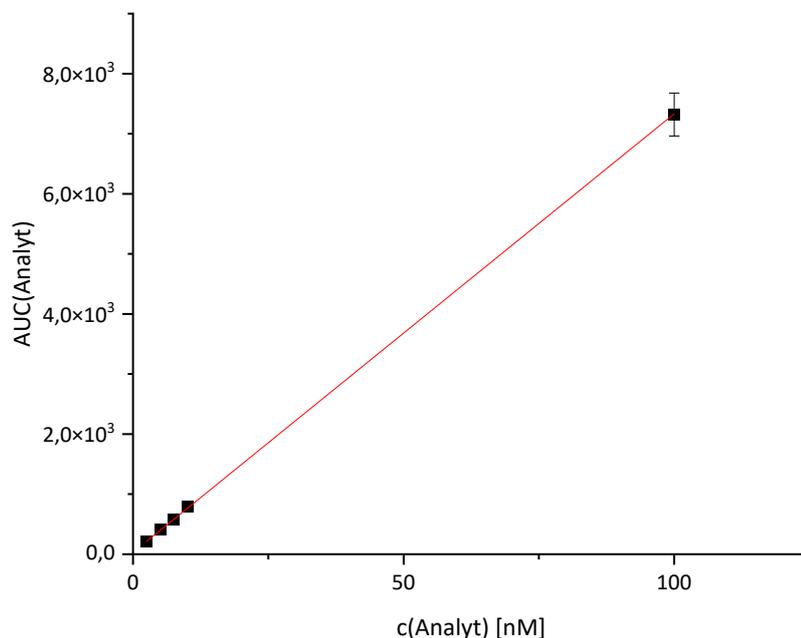


Abb. 64: Regressionsgerade der Kalibrierreihe von AcCys-AcA (2,5–100 nM). AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: *N*-Acetyl-L-Cystein.

6.5.2.3. Quantifizierung von AcLys-AcA

Methode I

Die Methode I wurde zur Quantifizierung von AcLys-AcA mit AcLys-BDA als internem Standard für die Reaktivitätsstudie *in chemico* und der daraus entwickelten Abfangreaktion für Mikrosomeninkubationen etabliert. Zudem wurde sie für die Vorversuche der *in vitro*-Untersuchungen verwendet, um AcLys-AcA in Zellüberständen inkubierter pRH zu erfassen. Die chromatographischen als auch massenspektrometrischen Parameter der HPLC-ESI⁺-MS/MS-Methode sind Tab. 40, bzw. Tab. 41 zu nehmen.

Tab. 40: HPLC-Parameter zur Quantifizierung von AcLys-AcA mit AcLys-BDA in Methode I. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: *N*_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial.

HPLC-Parameter							
Gerät	HPLC-MS/MS-System II						
Säule	Synergi™ Hydro-RP, 4 μm, 3 x 150 mm Synergi™ Aqua C18, 4 μm, Guard (Vorsäule)						
Säulenofen	T = 30 °C						
Fließmittel A	0,1 %-ige Ameisensäure in H ₂ O						
Fließmittel B	MeCN						
Flussrate	600 μL/min						
Injektionsvolumen	10 μL						
Fließmittelgradient							
t [min]	0	5	11	11,05	12,5	12,55	15
Fließmittel A [%]	95	95	38	5	5	95	95
Fließmittel B [%]	5	5	62	95	95	5	5
Retentionszeiten R_t							
AcLys-AcA	9,2 min						
AcLys-BDA	9,2 min						

Die MRM-Methode im positiven Modus dient der Detektion von AcLys-AcA als Analyten mit dem Massenübergang m/z 269,2/164,1 als *Quantifier*, wonach m/z 269,2/841 und m/z 269,2/82,2 als *Qualifier* herangezogen wurden. Im Falle des internen Standards AcLys-BDA wurde der Massenübergang m/z 255/84 zur Quantifizierung genutzt, während m/z 255/167 als auch m/z 255/209 zur Qualifizierung des Peaks dienten. Die Intensitäts-Verhältnisse der Massenübergänge (bestimmt über deren AUC) sind in Tab. 45 angegeben und Abb. 65 dargestellt.

Tab. 41: MS-Parameter zur Quantifizierung von AcLys-AcA mit AcLys-BDA in Methode I. Unterstrichene Massenübergänge dienten als Quantifier, während die übrigen als Qualifier herangezogen wurden. CAD: *collisionally activated dissociation*, CE: *collision energy*, CEP: *collision cell entrance potential*, CUR: *curtain gas*, CXP: *cell exit potential*, DP: *declustering potential*, dtime: *dwel time*, EP: *entrance potential*, GS1: *nebulizer gas*, GS2: *heater gas*, IS: *ion spray voltage*, Q1: *quadrupol 1*, Q3: *quadrupol 3*, TEMP: *ion source temperatur*. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: *N*_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial, *m/z*: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Substanzspezifische Parameter								
Substanz	Q1	Q3	dtime	DP	EP	CEP	CE	CXP
	[<i>m/z</i>]	[<i>m/z</i>]	[msec]	[V]	[V]	[V]	[eV]	[V]
AcLys-AcA	<u>269,2</u>	<u>164,2</u>	150	66	12	16	25	4
	269,2	84,1	150	66	12	16	39	4
	269,2	82,2	150	66	12	16	31	4
AcLys-BDA	<u>255,1</u>	<u>84,1</u>	150	41	10,5	18	43	4
	255,1	167,1	150	41	10,5	18	21	4
	255,1	209,2	150	41	10,5	18	17	18

Gerätespezifische Parameter						
CUR	CAD	IS	TEMP	GS1	GS2	
[psi]	[psi]	[V]	[°C]	[psi]	[psi]	
25	2	3000	550	50	45	

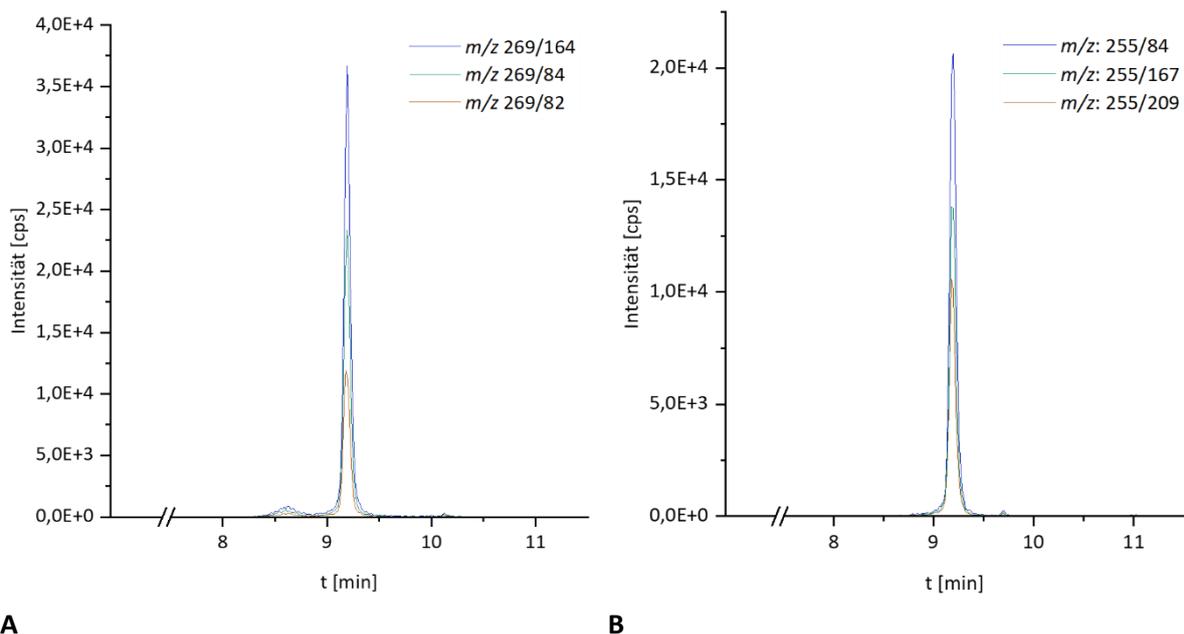


Abb. 65: HPLC-ESI⁺-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Modus) von (A) AcLys-AcA (1 μM) und (B) AcLys-BDA (1 μM) mit Methode I. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: *N*_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial, *m/z*: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Zur Bestimmung des Gehalts an AcLys-AcA mit Methode I wurden Konzentrationen von 0,001–50 μM als Kalibrierlösungen vermessen. AcLys-BDA wurde in einer Endkonzentration von stets 1 μM als interner Standard mitgeführt. Alle SL und ZV wurden in Wasser angesetzt, während die EL der Fließmittelzusammensetzung zu Beginn der Methode entsprach. Die erste SL beider Substanzen betrug 1 mM, derweilen es für AcLys-AcA zwei weitere SL mit Konzentrationen von 10 μM (10 μL SL_{1 mM} *ad* 1 mL H₂O) und 0,1 μM (10 μL SL_{10 μM} *ad* 1 mL H₂O) bedurfte

(Tab. 42). Aus den SL wurden ZV mit entsprechend 10-facher Konzentration zur EL hergestellt (Tab. 43). Durch Verdünnung von 10 μL ZV-Analyt und 10 μL ZV des internen Standards mit 80 μL Lösungsmittelmix (500 μL MeCN + 9,5 μL Ameisensäure + 7,491 mL H₂O) wurde die EL mit der Startzusammensetzung des Fließmittels erhalten.

Tab. 42: Ansatz der Stammlösungen von AcLys-AcA für die Kalibrierreihe mit AcLys-BDA als internem Standard. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: *N*_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor.

Ansatz der Stammlösungen					
SL X	c [M]	M [g/mol]	m [g]	N [mol]	V(H ₂ O) [mL]
SL 0 (AcLys-AcA)	0,001	268,31	0,001	3,73E-06	3,727
SL 0 (AcLys-BDA)	0,001	254,28	0,001	3,93E-06	3,933
	c(SL X) [μM]	c(SL X-1) [mM]	VF aus SL X-1	V(SL _{X-1}) [μL]	V(H ₂ O) [μL]
SL 1 (AcLys-AcA)	10	1000	0,01	10	990
SL 2 (AcLys-AcA)	0,1	10	0,1	10	990

Tab. 43: Ansatz der Stammlösungen von AcLys-AcA für die Kalibrierreihe mit AcLys-BDA als internem Standard. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: *N*_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial, EL: Endlösung, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung.

Ansatz der Zwischenverdünnung							
	c(EL) [nM]	c(ZV) [μM]	c(SL) [μM]	VF aus SL	V(SL) [μL]	V(H ₂ O) [μL]	V _{gesamt} [μL]
AcLys-AcA	0,5	0,005	0,1	0,05	5	95	100
	1	0,01	0,1	0,1	10	90	100
	2,5	0,025	0,1	0,25	25	75	100
	5	0,05	10	0,005	5	995	1000
	7,5	0,075	10	0,0075	6	794	800
	10	0,1	10	0,01	5	495	500
	25	0,25	10	0,025	5	195	200
	50	0,5	10	0,05	5	95	100
	75	0,75	10	0,075	7,5	92,5	100
	100	1	10	0,1	10	90	100
	1000	10	1000	0,01	10	990	1000
	10000	100	1000	0,1	10	90	100
50000	500	1000	0,5	50	50	100	
AcLys-BDA	1	10	1000	0,01	50	4950	5000

Tab. 44: Ansatz der Endlösungen von AcLys-AcA für die Kalibrierreihe mit AcLys-BDA als internem Standard. LM: Fließmittelzusammensetzung unter Berücksichtigung des wässrigen Anteils der ZV. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_{α} -Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial, EL: Endlösung, LM: Lösungsmittel, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung.

Ansatz der Endlösung AcLys-AcA				AcLys-BDA				LM*
c(EL) [nM]	c(ZV) [μM]	VF aus ZV	V(ZV) [μL]	c(EL) [μM]	c(ZV) [μM]	VF aus ZV	V(ZV) [μL]	V(LM) [μL]
0,5	0,005	0,1	10	1	10	0,1	10	80
1	0,01	0,1	10	1	10	0,1	10	80
2,5	0,025	0,1	10	1	10	0,1	10	80
5	0,05	0,1	10	1	10	0,1	10	80
7,5	0,075	0,1	10	1	10	0,1	10	80
10	0,1	0,1	10	1	10	0,1	10	80
25	0,25	0,1	10	1	10	0,1	10	80
50	0,5	0,1	10	1	10	0,1	10	80
75	0,75	0,1	10	1	10	0,1	10	80
100	1	0,1	10	1	10	0,1	10	80
1000	10	0,1	10	1	10	0,1	10	80
10000	100	0,1	10	1	10	0,1	10	80
50000	500	0,1	10	1	10	0,1	10	80

Basierend auf der Kalibrierreihe (Tab. 44) wurde die Regressionsgerade mit zugehörigen Validierungsparametern in Tab. 45 erhalten. Sie wurde im relevanten Bereich auch in Abb. 66 dargestellt. Die Validierungsparameter beschreiben eine valide sowie robuste Methode zur Detektion von AcLys-AcA im Konzentrationsbereich von 2,5–50 000 nM AcLys-AcA. Die Verteilung der Residuen war unauffällig.

Tab. 45: Kalibrierung von AcLys-AcA mit Validierungsparametern der Methode I. Analyt: AcLys-AcA, IS: AcLys-BDA. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_{α} -Acetyl-L-Lysin, AUC: *area under the curve*, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial, m: Mittelwert, LOD: Detektionsgrenze, LOQ: Quantifizierungsgrenze, Übergang: Massenübergang, IS: interner Standard, Stabw.: Standardabweichung, VarK: Varianzkoeffizient.

c(Analyt) [nM]	c(IS) [nM]	c(Analyt)/c(IS)	AUC(Analyt)/AUC(IS)		Achsenabschnitt	0,003
			m	Stabw.	Steigung	1,06
2,5	1000	0,0025	3,73E-03	6,88E-04	R ²	0,9999
5	1000	0,005	6,62E-03	4,00E-04	Verfahrens-Stabw.	0,004 nM
7,5	1000	0,0075	7,50E-03	3,91E-04	Verfahrens-VarK	2,9%
10	1000	0,01	1,39E-02	2,98E-03	Lauf-zu-Lauf-Variabilität	0,9%
25	1000	0,025	2,82E-02	1,63E-03	Tag-zu-Tag-Variabilität	2,9%
50	1000	0,05	5,44E-02	3,18E-04	LOD _{theoretisch}	1,6 nM
75	1000	0,075	8,52E-02	2,30E-04	LOQ	2,5 nM
100	1000	0,1	1,19E-01	8,05E-03	Analyt: Übergang 2/Übergang 1	66 %
1000	1000	1	1,07E+00	1,17E-01	Analyt: Übergang 3/Übergang 1	35 %
10 000	1000	10	5,69E+00	2,93E-01	IS: Übergang 2/Übergang 1	67 %
50 000	1000	50	3,58E+01	4,88E+00	IS: Übergang 3/Übergang 1	50 %

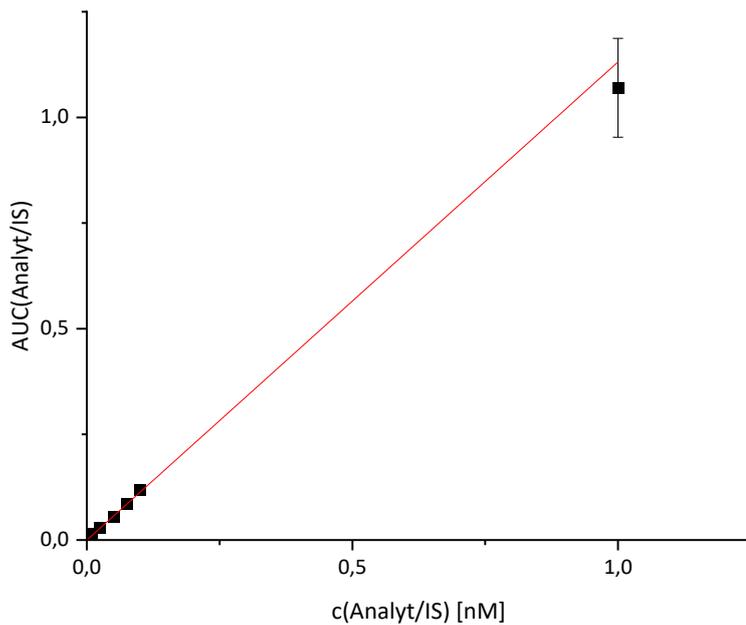


Abb. 66: Regressionsgerade der Kalibrierreihe von AcLys-AcA (2,5–1000 nM) mit Methode I. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_{α} -Acetyl-L-Lysin, Analyt: AcLys-AcA, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial, IS: interner Standard (AcLys-BDA, 1 μ M).

Methode II

Basierend auf Methode I wurde Methode II am UHPLC-MS/MS-System III zur sensitiveren Detektion von AcLys-AcA mit AcLys-BDA als interner Standard in *in vitro*-Proben eingesetzt. Die Parameter der neuen UHPLC-ESI⁺-MS/MS-Methode sind in Tab. 46 sowie Tab. 47 aufgelistet. Für Ansätze wurden Chemikalien der Reinheit *LC-MS grade* genutzt.

Tab. 46: HPLC-Parameter zur Quantifizierung von AcLys-AcA mit AcLys-BDA in Methode II.

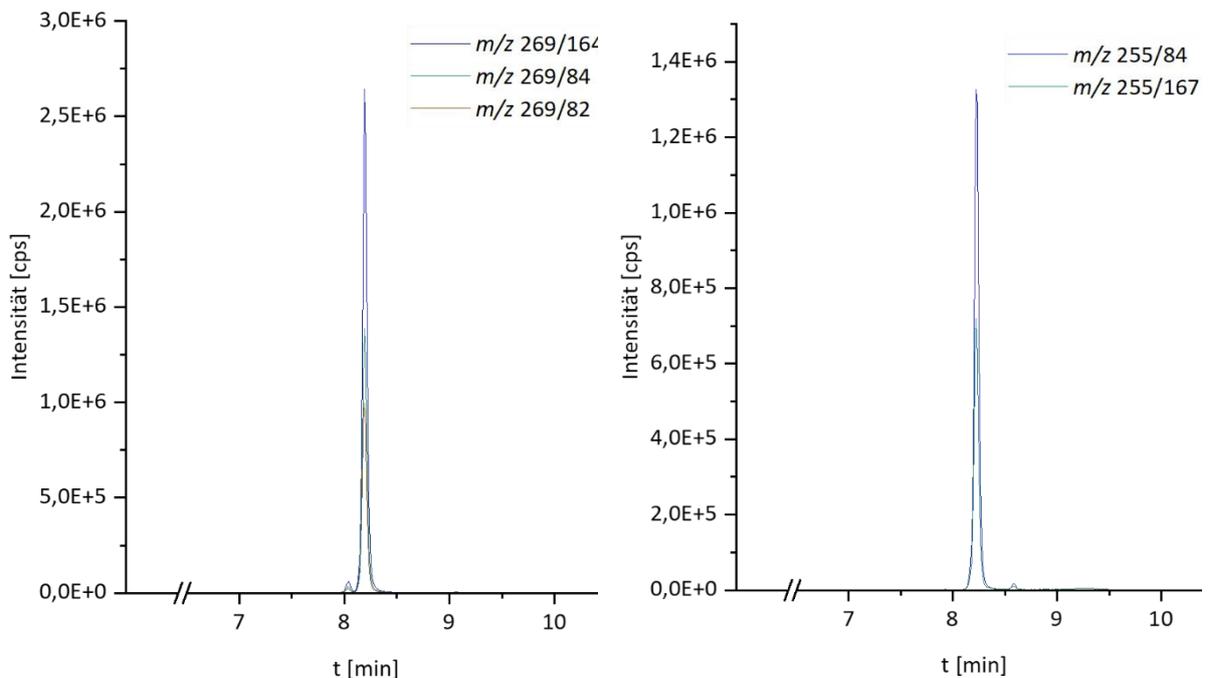
HPLC-Parameter	
Gerät	HPLC-MS/MS-System III
Säule	Synergi TM Hydro-RP, 4 μ m, 3 x 150 mm Synergi TM Aqua C18, 4 μ m, Guard (Vorsäule)
Säulenofen	T = 30 °C
Fließmittel A	0,1 %-ige Ameisensäure in H ₂ O
Fließmittel B	MeCN
Flussrate	600 μ L/min
Injektionsvolumen	1 μ L
Fließmittelgradient	
t [min]	0 5 11 11,05 12 12,05 13 13,55 15
Fließmittel A [%]	95 95 38 20 20 68 68 95 95
Fließmittel B [%]	5 5 62 80 80 32 32 5 5
Retentionszeiten R_t	
AcLys-AcA	7,8 min
AcLys-BDA	7,8 min

Die massenspektrometrischen Eigenschaften von AcLys-AcA und AcLys-BDA waren nach erneutem Tuning am anderen Gerät vergleichbar. So blieb die Auswahl für *Quantifier* und *Qualifier* unberührt. Der Übergang m/z 269,2/164,2 wurde zur Quantifizierung von AcLys-AcA verwendet, während m/z 255,1/84,1 für AcLys-BDA gewählt wurde. Die anderen Übergänge aus Tab. 47 waren dementsprechend *Qualifier*. Die Verhältnisse der Massenübergänge (Tab. 48) einer Substanz veränderten sich nicht entscheidend im Vergleich zu Methode I.

Tab. 47: MS-Parameter zur Quantifizierung von AcLys-AcA mit AcLys-BDA in Methode II. Unterstrichene Massenübergänge dienten als Quantifier, während die übrigen als Qualifier herangezogen wurden. CAD: *collisionally activated dissociation*, CE: *collision energy*, CEP: *collision cell entrance potential*, CUR: *curtain gas*, CXP: *cell exit potential*, DP: *declustering potential*, dtime: *dwell time*, EP: *entrance potential*, GS1: *nebulizer gas*, GS2: *heater gas*, IS: *ion spray voltage*, Q1: *quadrupol 1*, Q3: *quadrupol 3*, TEMP: *ion source temperatur*. . AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Substanzspezifische Parameter							
Substanz	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	dtime [msec]	DP [V]	EP [V]	CE [eV]	CXP [V]
AcLys-AcA	<u>269,2</u>	<u>164,2</u>	125	60	12	25	8
	269,2	84,1	125	40	10	35	6
	269,2	82,2	125	60	10	30	6
AcLys-BDA	<u>255,1</u>	<u>84,1</u>	125	60	10	35	6
	255,1	167,1	125	60	10	25	8

Gerätespezifische Parameter						
CUR [psi]	CAD [psi]	IS [V]	TEMP [°C]	GS1 [psi]	GS2 [psi]	
20	medium	3000	550	50	60	



A

B

Abb. 67: HPLC-ESI⁺-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Modus) von AcLys-AcA (A) und AcLys-BDA (B) mit Methode II. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Die Vermessung der Kalibrierreihe von AcLys-AcA mit Methode II umfasste Analyt-Konzentrationen von 0,5–1000 nM und 1 μ M AcLys-BDA als interner Standard. Die Ansätze entsprachen denen von Methode I (Tab. 42-Tab. 44). Die Regressionsgerade mit Validierungsparameter ist in Abb. 68 und Tab. 48 zu finden. Die Parameter beschreiben eine valide, robuste Methode zur Detektion von AcLys-AcA im Konzentrationsbereich von 0,5–1000 nM AcLys-AcA. Die Verteilung der Residuen war unauffällig.

Tab. 48: Kalibrierung von AcLys-AcA mit Validierungsparametern der Methode II. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_{α} -Acetyl-L-Lysin, Analyt: AcLys-AcA, AUC: *area under the curve*, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial, IS: interner Standard (AcLys-BDA), m: Mittelwert, LOD: Detektionsgrenze, LOQ: Quantifizierungsgrenze, Übergang: Massenübergang, Stabw.: Standardabweichung, VarK: Varianzkoeffizient.

c(Analyt) [nM]	c(IS) [nM]	c(Analyt)/c(IS)	AUC(Analyt)/AUC(IS)			
			m	Stabw.	Achsenabschnitt	–0,007
0,5	1000	0,0005	1,59E-03	1,86E-04	Steigung	2,40
1,00	1000	0,001	2,96E-03	6,32E-04	R ²	0,9997
2,5	1000	0,0025	6,25E-03	3,63E-04	Verfahrens-Stabw.	0,005 nM
5	1000	0,005	1,12E-02	4,79E-04	Verfahrens-VarK	4,25 %
7,5	1000	0,0075	1,46E-02	8,46E-04	Lauf-zu-Lauf-Variabilität	0,8 %
10	1000	0,01	2,26E-02	1,21E-03	Tag-zu-Tag-Variabilität	1,8 %
25	1000	0,025	4,88E-02	1,41E-03	LOD _{theoretisch}	0,4 nM
50	1000	0,05	9,87E-02	3,45E-03	LOQ	0,5 nM
75	1000	0,075	1,46E-01	7,47E-03	Analyt: Übergang 2/Übergang 1	57 %
100	1000	0,1	2,39E-01	1,26E-02	Analyt: Übergang 3/Übergang 1	42 %
1000	1000	1	2,40E+00	6,10E-02	IS: Übergang 2/Übergang 1	55 %

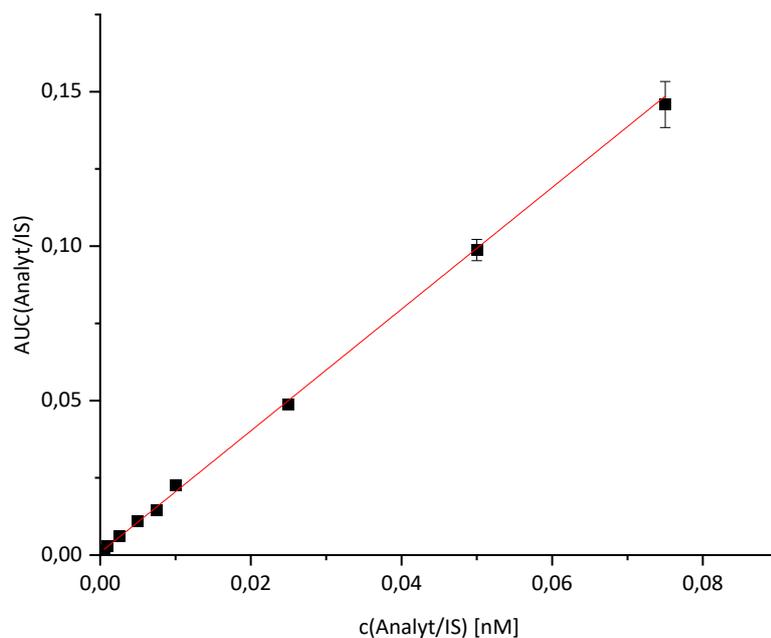


Abb. 68: Regressionsgerade der Kalibrierreihe von AcLys-AcA (0,5–1000 nM) für Methode II. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_{α} -Acetyl-L-Lysin, Analyt: AcLys-AcA, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial, IS: interner Standard (AcLys-BDA, 1 μ M).

6.5.2.4. Quantifizierung von DNA-Addukten

Nachdem AcA einzeln mit den vier Nucleosiden inkubiert wurden, sollten die Reaktionsprodukte von AcA mit isolierter DNA quantifiziert werden. Dazu wurde die isolierte DNA nach Inkubation enzymatisch hydrolysiert (Kap. 6.8.6). Für die Quantifizierung von *in vitro*-Proben wurden pRH gemäß Kap. 6.8.6 aufgearbeitet, bevor sie mit nachfolgender Methode quantifiziert werden konnten. Deren chromatographische und massenspektrometrischen Parameter sind in Tab. 49 und Tab. 50 abgebildet. Für Ansätze wurden Chemikalien der Reinheit *LC-MS grade* genutzt.

Tab. 49: HPLC-Parameter zur Quantifizierung der DNA-Addukte dA-AcA, dG-AcA und dC-AcA mit $^{15}\text{N}_5$ -dA-AcA sowie $^{15}\text{N}_5$ -dG-AcA. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, dC: 2'-Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin.

HPLC-Parameter								
Gerät	HPLC-MS/MS-System III							
Säule	Acquity UPLC BEH Amide; 1,7 μm ; 2,1 x 50mm Acquity UPLC BEH Amide; 1,7 μm ; Van Guard (Vorsäule)							
Säulenofen	T = 30 °C							
Fließmittel A	0,1 %-ige Ameisensäure in H ₂ O							
Fließmittel B	0,1 %-ige Ameisensäure in MeCN							
Injektionsvolumen	2 μL							
Fließmittelgradient								
t [min]	0	1,5	1,55	2	5	5,5	6	10
Fließmittel A [%]	10	10	10	80	80	10	10	10
Fließmittel B [%]	90	90	90	20	20	90	90	90
Flussrate [$\mu\text{L}/\text{min}$]	400	400	200	200	200	200	400	400
Retentionszeiten R_t								
dA-AcA	0,9 min		$^{15}\text{N}_5$ -dA-AcA		0,9 min			
dG-AcA	1,0 min		$^{15}\text{N}_5$ -dG-AcA		1,0 min			
dC-AcA	0,7 min							

Tab. 50 listet die Parameter der MRM-Methoden zur Detektion von dA-AcA, dG-AcA und dC-AcA, sowie deren internen Standards auf. Der erstgenannte Massenübergang entspricht jeweils dem *Quantifier*, während anschließend genannte als *Qualifier* dienen. Die Verhältnisse der Massenübergänge sind in Tab. 54 (dA-AcA), Tab. 55 (dG-AcA) sowie Tab. 56 (dC-AcA) aufgelistet.

Tab. 50: MS-Parameter zur Quantifizierung der DNA-Addukte dA-AcA, dG-AcA und dC-AcA mit [¹⁵N₅]-dA-AcA sowie [¹⁵N₅]-dG-AcA. Unterstrichene Massenübergänge wurden als *Quantifier* genutzt, während die anderen als *Qualifier* dienen. CAD: *collisionally activated dissociation*, CE: *collision energy*, CEP: *collision cell entrance potential*, CUR: *curtain gas*, CXP: *cell exit potential*, DP: *declustering potential*, dtime: *dwelt time*, EP: *entrance potential*, GS1: *nebulizer gas*, GS2: *heater gas*, IS: *ion spray voltage*, Q1: *quadrupol 1*, Q3: *quadrupol 3*, TEMP: *ion source temperatur*. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, dC: 2'-Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Substanzspezifische Parameter							
Substanz	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	dtime [msec]	DP [V]	EP [V]	CE [eV]	CXP [V]
dA-AcA	<u>332,026</u>	<u>216,0</u>	70	31	10	31	14
	332,026	173,0	70	31	10	53	14
dG-AcA	<u>348,031</u>	<u>232,1</u>	70	51	10	31	26
	348,031	190,0	70	51	10	45	12
dC-AcA	<u>308,043</u>	<u>192,0</u>	70	76	10	19	14
	308,043	150,1	70	76	10	45	14
	308,043	121,1	70	76	10	63	14
¹⁵ N ₅ -dG-AcA	<u>353,024</u>	<u>237,0</u>	70	131	10	31	16
	353,024	195,0	70	131	10	45	18
¹⁵ N ₅ -dA-AcA	<u>336,917</u>	<u>221,0</u>	70	46	10	37	16
	336,917	179,1	70	46	10	51	16
Gerätespezifische Parameter							
CUR [psi]	CAD [psi]	IS [V]	TEMP [°C]	GS1 [psi]	GS2 [psi]		
25	Medium	4500	450	55	60		

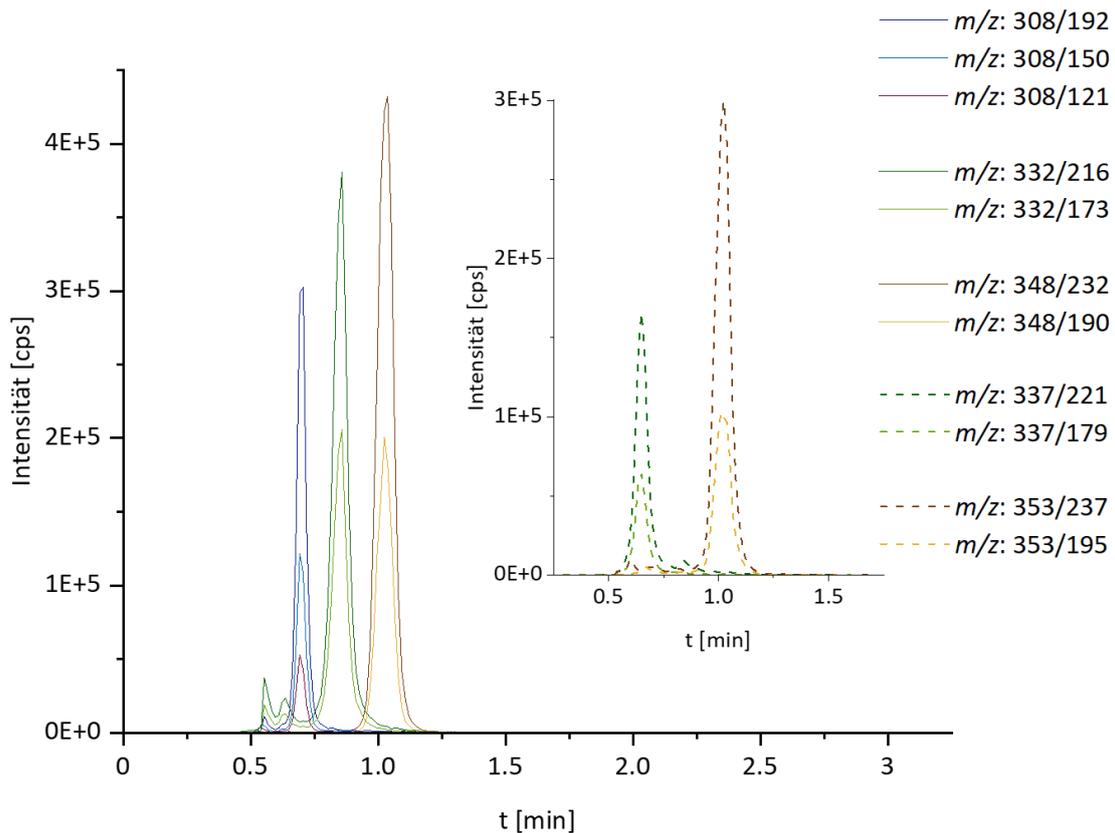


Abb. 69: HPLC-ESI⁺MS/MS-Chromatogramm (MRM-Modus) von dA-AcA (grün), dG-AcA (gelb) und dC-AcA (blau) sowie den internen Standards ¹⁵N₅-dA-AcA (gestrichelt, grün) und ¹⁵N₅-dG-AcA (gestrichelt, gelb). Vermessen wurde je 10 nM Substanz nach der Methode aus Kap. 6.5.2.4. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, dC: 2'-Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Abb. 69 zeigt das HPLC-ESI⁺-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Modus) von dA-AcA, dG-AcA und dC-AcA, sowie den internen Standards ¹⁵N₅-dA-AcA und ¹⁵N₅-dG-AcA (gestrichelte Linien) mit jeweils 10 nM Substanz.

Zur Bestimmung des Gehalts der drei DNA-Addukte dA-AcA, dG-AcA sowie dC-AcA wurden Kalibrierreihen im Konzentrationsbereich von 0,01–20 nM erstellt. Als interne Standards dienten ¹⁵N₅-dA-AcA (IS_A) und ¹⁵N₅-dG-AcA (IS_G) mit Endkonzentrationen von 0,6 nM bzw. 4,7 nM. Die Analyten wurden gemeinsam mit den internen Standards in einer EL vermessen, deren Lösungsmittel der anfänglichen Fließmittelzusammensetzung (90 % MeCN; 10 % Wasser mit 0,1 % Ameisensäure; siehe Tab. 49) entsprach. Es wurden alle SL und ZV in Wasser angesetzt, wobei letztere der 20-fachen Konzentration der EL entsprachen. Durch Zugabe von 5 µL Standard-ZV und 5 µL Internem-Standard-ZV in 90 µL Methanol mit 0,11 % Ameisensäure wurde ein Gesamtvolumen von 100 µL Endlösung erreicht.

Tab. 51: Ansatz der Stamm- und Zwischenverdünnungen von dA-AcA, dG-AcA und dC-AcA zur Kalibrierung der DNA-Addukte. Als dN-AcA ist die Kombination aus dA-AcA, dG-AcA, dC-AcA zusammengefasst. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, dC: 2'-Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, EL: Endlösung, LM: Lösungsmittel, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung.

Ansatz der Stammlösungen der Standards							
SL X	Analyt	c [M]	M [g/mol]	m [g]	n [mol]	V(H ₂ O) [mL]	
SL 0	dA-AcA	0,005	331,33	0,001	3,02E-06	0,604	
	dG-AcA	0,005	347,33	0,001	2,88E-06	0,576	
	dC-AcA	0,005	307,30	0,001	3,25E-06	0,651	
		c(SL X) [μM]	c(SL X-1) [mM]	VF aus SL X-1	V(SL _{X-1}) [μL]	V(H ₂ O) [μL]	V _{gesamt} [μL]
SL 1	dA-AcA	100	5	0,02	5	235	250
	dG-AcA	100	5	0,02	5		
	dC-AcA	100	5	0,02	5		
SL 2	dN-AcA	1	0,1	0,01	5	495	500
SL 3	dN-AcA	0,01	0,001	0,01	5	495	500

Ansatz der Zwischenverdünnungen der Standards							
c(EL) [nM]	c(ZV) [nM]	c(SL)	VF	V(SL) [μL]	V(H ₂ O) [μL]	V _{gesamt} [μL]	
0,01	0,2	SL 3 (10 nM)	0,02	10	490	500	
0,05	1	SL 3 (10 nM)	0,1	10	90	100	
0,1	2	SL 3 (10 nM)	0,2	20	80	100	
0,2	4	SL 3 (10 nM)	0,4	40	60	100	
0,3	6	SL 3 (10 nM)	0,6	60	40	100	
0,5	10	SL 3 (10 nM)	1	100	0	100	
1	20	SL 2 (1 μM)	0,02	10	490	500	
5	100	SL 2 (1 μM)	0,1	10	90	100	
10	200	SL 2 (1 μM)	0,2	20	80	100	
15	300	SL 2 (1 μM)	0,3	30	70	100	
20	400	SL 2 (1 μM)	0,4	40	60	100	

Tab. 52: Ansatz der Stamm- und Zwischenverdünnung der internen Standards ¹⁵N₅-dA-AcA (IS_A) und ¹⁵N₅-dG-AcA (IS_G) zur Kalibrierung der DNA-Addukte. *) Bestimmt mittels externer Kalibrierung. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, dC: 2'-Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, EL: Endlösung, LM: Lösungsmittel, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung.

Ansatz der Stammlösungen des internen Standards							
IS _{A G} -SL	Interner Standard	c(SL 1) [μM]	c(SL 0)* [μM]	VF	V(SL 0) [μL]	V(H ₂ O) [μL]	V _{gesamt} [μL]
IS _{A G} -SL 1	IS-A	1,2	462	0,0026	12,99	4928	5000
	IS-G	9,4	795	0,0118	59,12		

Ansatz der Zwischenverdünnungen des internen Standards							
IS _{A G} -ZV	c(EL) [nM]	c(ZV) [nM]	c(SL 1) [μM]	VF	V(SL) [μL]	V(H ₂ O) [μL]	V _{gesamt} [μL]
IS-A	0,6	12	1,2	0,01	5	495	500
IS-G	4,7	94	9,4				

Tab. 53: Ansatz der Endlösung zur Kalibrierung der DNA-Addukte von AcA. Mit dN-AcA: dA-AcA + dG-AcA + dC-AcA; IS_{A|G}: ¹⁵N₅-dA-AcA (IS_A) + ¹⁵N₅-dG-AcA (IS_G). *) LM: 0,11 % Ameisensäure (*LC-MS grade*) in Methanol (*LC-MS grade*). AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, dC: 2'-Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, EL: Endlösung, LM: Lösungsmittel, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung.

Ansatz der Endlösungen									
dN-AcA			IS _{A G}				LM*		Σ
c(EL) [nM]	c(ZV) [nM]	VF	V(ZV) [μL]	c(EL) [nM]	c(ZV) [nM]	VF	V(ZV) [μL]	V(LM) [μL]	V _{gesamt} [μL]
0,01	0,2	0,05	5	0,6 4,7	12 94	0,05	5	90	100
0,05	1	0,05	5	0,6 4,7	12 94	0,05	5	90	100
0,1	2	0,05	5	0,6 4,7	12 94	0,05	5	90	100
0,2	4	0,05	5	0,6 4,7	12 94	0,05	5	90	100
0,3	6	0,05	5	0,6 4,7	12 94	0,05	5	90	100
0,5	10	0,05	5	0,6 4,7	12 94	0,05	5	90	100
1	20	0,05	5	0,6 4,7	12 94	0,05	5	90	100
5	100	0,05	5	0,6 4,7	12 94	0,05	5	90	100
10	200	0,05	5	0,6 4,7	12 94	0,05	5	90	100
15	300	0,05	5	0,6 4,7	12 94	0,05	5	90	100
20	400	0,05	5	0,6 4,7	12 94	0,05	5	90	100

Basierend auf der Kalibrierreihe (Tab. 53) wurden die Regressionsgeraden mit zugehörigen Validierungsparametern in Tab. 54 (dA-AcA), Tab. 55 (dG-AcA) und Tab. 56 (dC-AcA) erhalten. Sie wurde im relevanten Bereich in Abb. 70 (dA-AcA), Abb. 71 (dG-AcA) und Abb. 72 (dC-AcA) dargestellt. Die Validierungsparameter beschreiben eine valide sowie robuste Methode zur Detektion von dA-AcA und dG-AcA im relevanten Konzentrationsbereich von 0,05–20 nM. Die Verteilung der Residuen war unauffällig. dC-AcA wurde aufgrund von Interferenz in allen drei Massenübergängen semiquantitativ bestimmt. Die Diskussion hierzu ist in Kap. 4.2.3.4 zu finden.

Tab. 54: Kalibrierung von dA-AcA mit Validierungsparametern. AcA: 3-Acetylacrolein, Analyt: dA-AcA, AUC: *area under the curve*, dA: 2'-Desoxyadenosin, IS: internen Standard ($^{15}\text{N}_5$ -dA-AcA), m: Mittelwert, LOD: Detektionsgrenze, LOQ: Quantifizierungsgrenze, Übergang: Massenübergang, Stabw.: Standardabweichung, VarK: Varianzkoeffizient.

c(Analyt) [nM]	c(IS) [nM]	c(Analyt) /c(IS)	AUC(Analyt)/AUC(IS)			
			m	Stabw.	Achsenabschnitt	-0,163
0,05	0,6	0,08	5,97E-02	9,36E-03	Steigung	1,046
0,1	0,6	0,17	9,57E-02	2,17E-02	R ²	0,994
0,2	0,6	0,33	2,71E-01	3,36E-02	Verfahrens-Stabw.	1,03 nM
0,3	0,6	0,50	4,14E-01	2,73E-02	Verfahrens-VarK	12 %
0,5	0,6	0,83	7,35E-01	1,29E-01	Lauf-zu-Lauf-Variabilität	2,3 %
1	0,6	1,67	1,11E+00	4,99E-02	Tag-zu-Tag-Variabilität	4,8 %
5	0,6	8,33	8,64E+00	9,01E-01	LOD _{theoretisch}	0,01 nM
10	0,6	16,67	2,40E+01	3,33E+00	LOQ	0,05 nM
15	0,6	25,00	3,65E+01	1,96E+00	Analyt: Übergang 2/Übergang 1	55 %
20	0,6	33,33	4,43E+01	3,09E+00	IS: Übergang 2/Übergang 1	26 %

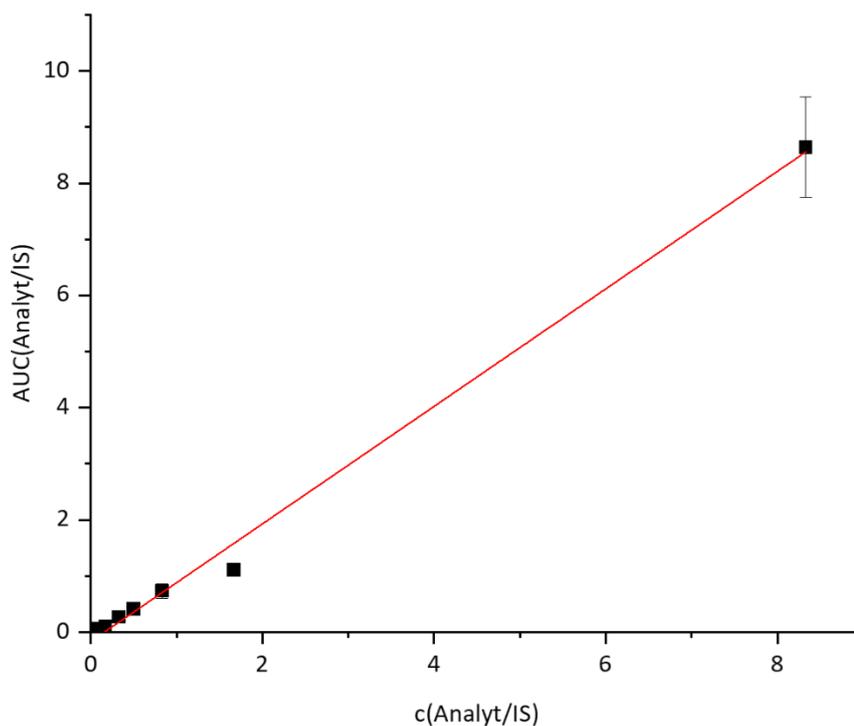


Abb. 70: Regressionsgerade zur Quantifizierung von dA-AcA (0,05–5 nM) mit $^{15}\text{N}_5$ -dA-AcA (0,6 nM) als internem Standard. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin.

Tab. 55: Kalibrierung von dG-AcA mit Validierungsparametern. AcA: 3-Acetylacrolein, Analyt: dG-AcA, AUC: *area under the curve*, dG: 2'-Desoxyguanosin, IS: internen Standard ($^{15}\text{N}_5$ -dG-AcA), m: Mittelwert, LOD: Detektionsgrenze, LOQ: Quantifizierungsgrenze, Übergang: Massenübergang, Stabw.: Standardabweichung, VarK: Varianzkoeffizient.

c(Analyt) [nM]	c(IS) [nM]	c(Analyt) /c(IS)	AUC(Analyt)/AUC(IS) m	AUC(Analyt)/AUC(IS) Stabw.	Achsenabschnitt	Steigung	R ²	Verfahrens-Stabw.	Verfahrens-VarK	Lauf-zu-Lauf-Variabilität	Tag-zu-Tag-Variabilität	LOD _{theoretisch}	LOQ	Analyt: Übergang 2/Übergang 1	IS: Übergang 2/Übergang 1
0,05	4,7	0,0106	1,01E-02	2,58E-03	-0,015	1,121	0,997	0,13 nM	11,3 %	2,7 %	4,4 %	0,01	0,05	47 %	38 %
0,1	4,7	0,0213	1,50E-02	3,82E-03											
0,2	4,7	0,0426	4,10E-02	8,53E-03											
0,3	4,7	0,0638	6,39E-02	1,00E-02											
0,5	4,7	0,1064	1,13E-01	2,25E-02											
1	4,7	0,2128	1,67E-01	4,67E-03											
5	4,7	1,0638	1,19E+00	1,19E-01											
10	4,7	2,1277	2,81E+00	3,02E-01											
15	4,7	3,1915	4,08E+00	2,76E-01											
20	4,7	4,2553	4,90E+00	3,25E-01											

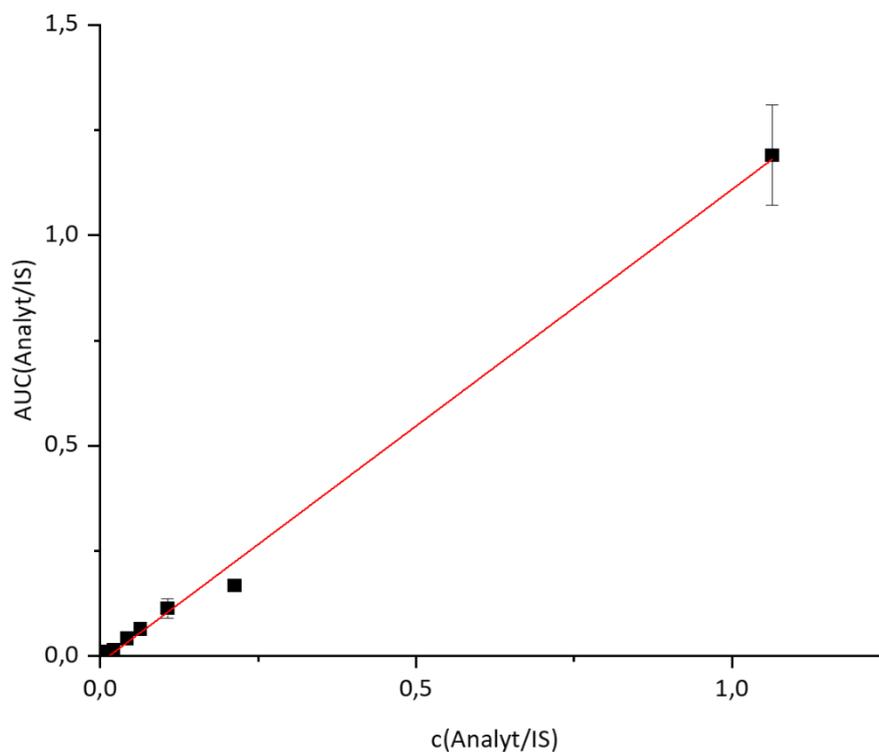


Abb. 71: Regressionsgerade zur Quantifizierung von dG-AcA (0,05–5 nM) mit $^{15}\text{N}_5$ -dG-AcA (4,7 nM) als internem Standard. AcA: 3-Acetylacrolein, dG: 2'-Desoxyguanosin.

Tab. 56: Kalibrierung von dC-AcA mit Validierungsparametern. *) *Noise* entspricht Peakhöhe bei 0,001 nM dC-AcA. AcA: 3-Acetylacrolein, Analyt: dC-AcA, AUC: *area under the curve*, dC: 2'-Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, IS: internen Standard (dG-AcA), m: Mittelwert, LOD (S/N = 3/1): Detektionsgrenze, LOQ (S/N = 6/1): Quantifizierungsgrenze, Übergang: Massenübergang, Stabw.: Standardabweichung, VarK: Varianzkoeffizient.

c(Analyt) [nM]	c(IS) [nM]	c(Analyt) /c(IS)	AUC(Analyt)/AUC(IS) m	AUC(Analyt)/AUC(IS) Stabw.		
1	5	0,2	8,13E-02	9,42E-04	Achsenabschnitt	-0,003
5	5	1	4,54E-01	3,47E-02	Steigung	0,492
10	5	2	1,07E+00	1,19E-01	R ²	0,996
15	5	3	1,51E+00	4,81E-02	Verfahrens-Stabw.	0,08 nM
20	5	4	1,94E+00	1,49E-01	Verfahrens-VarK	3,74 %
					Lauf-zu-Lauf-Variabilität	2,2 %
					Tag-zu-Tag-Variabilität	3,4 %
					LOD _{theoretisch} *	0,2 nM
					LOQ _{theoretisch} *	0,7 nM
					Analyt: Übergang 2/Übergang 1	40 %
					Analyt: Übergang 3/Übergang 1	17 %
					IS: Übergang 2/Übergang 1	38 %

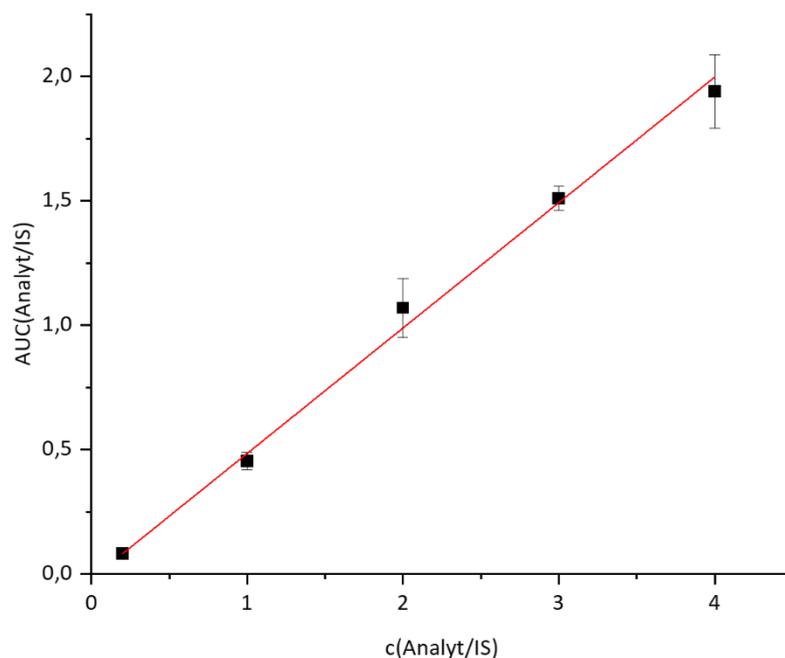


Abb. 72: Regressionsgerade zur Semi-Quantifizierung von dC-AcA (1–20 nM) mit ¹⁵N₅-dG-AcA (5 nM) als internem Standard. 3-Acetylacrolein, dC: 2'-Desoxycytosin.

Die Kalibrierung ermöglichte über Regressionsgeraden basierend auf dem Verhältnis der AUC des Analyten zu internem Standard die Bestimmung des Gehalts der DNA-Addukte als Stoffmengenkonzentration. Um den Gehalt in Anzahl Addukte pro 10⁸ Nucleosiden anzugeben wurde die eingesetzte Menge DNA, bzw. Hydrolyserate herangezogen. Für die Berechnung der Hydrolyserate wurde der dG-Gehalt gemäß Kap. 6.5.2.5 bestimmt, wobei ein Guanosin-Cytosin-Anteil von 44 % in pRH-DNA und 41 % in Lachs-DNA angenommen wurde.

6.5.2.5. Quantifizierung von 2'-Desoxyguanosin

Zur Bestimmung der Hydrolyserate von isolierter DNA über die Quantifizierung von dG wurde die Methode nach Stegmüller *et al.* (2018) genutzt. Die HPLC-ESI⁺-MS/MS-Methode wird durch die Parameter in Tab. 57 und Tab. 58 definiert.

Tab. 57: HPLC-Parameter zur Quantifizierung von dG mit ¹⁵N₅-dG als interner Standard, nach Stegmüller *et al.* (2018). dG: 2'-Desoxyguanosin.

HPLC-Parameter						
Gerät	HPLC-MS/MS-System I					
Säule	LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 125 x 4 mm LiChrospher® 100 RP-18, 5 µm, 4 x 4 mm (Vorsäule)					
Säulenofen	T = 20 °C					
Fließmittel A	0,1%ige Essigsäure in H ₂ O					
Fließmittel B	Methanol					
Flussrate	750 µL/min					
Injektionsvolumen	5 µL					
Fließmittelgradient						
t [min]	0	6	6,1	13	13,1	18
Fließmittel A [%]	90	20	5	5	90	90
Fließmittel B [%]	10	80	95	95	10	10
Retentionszeiten R_t [min]						
dG	4,2 min					
¹⁵ N ₅ -dG	4,2 min					

Im optimierten MRM-Modus (Tab. 58) wurde für den Analyten dG des Massenübergangs m/z 268/152 als *Quantifier* und m/z 268/138 als *Qualifier* verwendet. Im Falle des internen Standards ¹⁵N₅-dG entsprachen die Massenübergänge für *Quantifier* und *Qualifier* m/z 273/157, bzw. m/z 273/139. Das Verhältnis der Massenübergänge wurden in Tab. 60 aufgelistet. Abb. 73 zeigt die Massenübergänge des Analyten und seines internen Standards.

Tab. 58: MS-Parameter zur Quantifizierung von dG mit $^{15}\text{N}_5$ -dG als interner Standard. CAD: *collisionally activated dissociation*, CE: *collision energy*, CEP: *collision cell entrance potential*, CUR: *curtain gas*, CXP: *cell exit potential*, DP: *declustering potential*, dtime: *dwel time*, EP: *entrance potential*, FP: *focusing potential*, GS1: *nebulizer gas*, GS2: *heater gas*, IS: *ion spray voltage*, Q1: *quadrupol 1*, Q3: *quadrupol 3*, TEMP: *ion source temperature*. dG: 2'-Desoxyguanosin, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Substanzspezifische Parameter									
Substanz	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	dtime [msec]	DP [V]	FP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [eV]	CXP [V]
dG	268,175	151,9	350	6	350	4,5	12	15	18
	268,175	134,9	350	6	350	4,5	12	47	20
$^{15}\text{N}_5$ -dG	273,083	157,3	350	26	370	4	20	17	4
	273,083	138,9	350	26	370	4	20	49	4

Gerätespezifische Parameter						
CUR [psi]	CAD [psi]	IS [V]	TEMP [°C]	GS1 [psi]	GS2 [psi]	
20	2	4200	400	30	35	

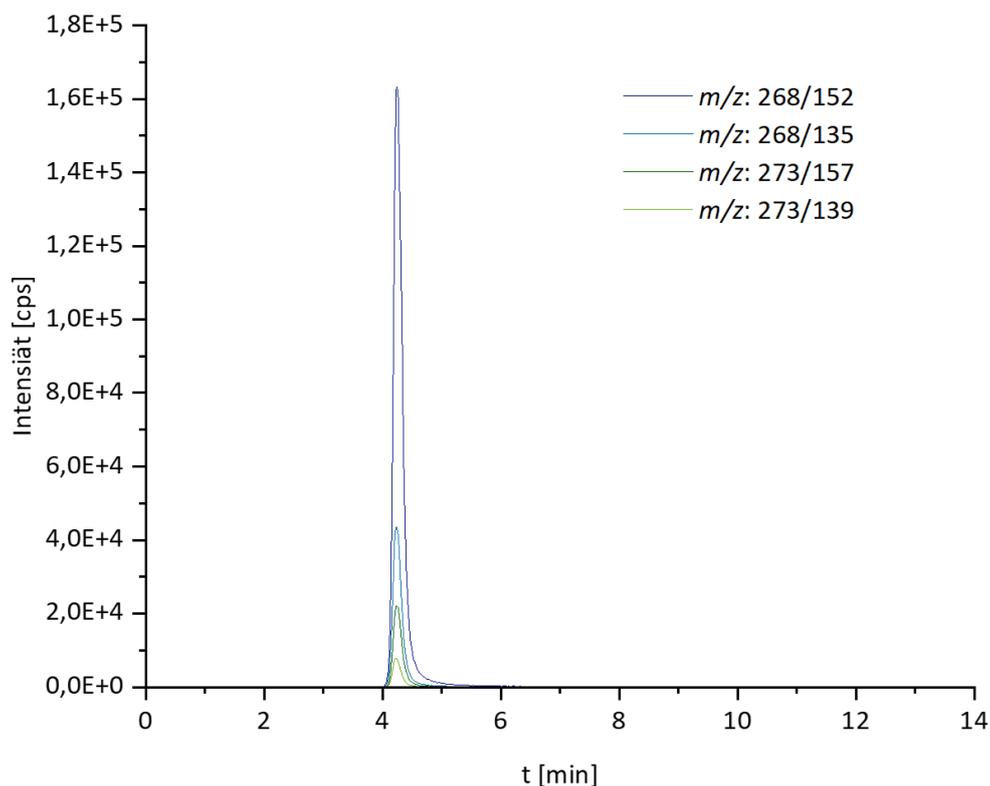


Abb. 73: HPLC-ESI⁺-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Modus) von dG (50 µM) und $^{15}\text{N}_5$ -dG (20 µM). Die Massenübergänge entsprechen den m/z in Tab. 58. dG: 2'-Desoxyguanosin, m/z : Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.

Zur Bestimmung des dG-Gehalts wurde eine Kalibriergerade im Konzentrationsbereich von 1–500 µM dG mit je 20 µM $^{15}\text{N}_5$ -dG als internem Standard erstellt. Hierfür wurden alle SL, ZV und Endlösungen in Wasser angesetzt. Für den Analyten dG wurde eine ZV von 20 µM (20 µL ZV₁ mM *ad* 1 mL H₂O) und 1000 µM (100 µL SL₁₀ mM *ad* 1 mL H₂O) hergestellt, für den internen Standard $^{15}\text{N}_5$ -dG 200 µM. In Tab. 59 ist das Pipettierschema für die Konzentrationsreihe zu finden.

Die Ergebnisse der Kalibriergerade sind in Tab. 60 aufgeführt und Abb. 74 gezeigt.

Tab. 59: Pipettierschema der Konzentrationsreihe von dG mit internen Standard $^{15}\text{N}_5\text{-dG}$. Die Endkonzentrationen wurden für ein Gesamtvolumen von 200 μL /Konzentration angesetzt. dG: 2'-Desoxyguanosin, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung.

dG				$^{15}\text{N}_5\text{-dG}$				H ₂ O
c(EL) [μM]	c(ZV) [μM]	VF aus ZV	V(ZV) [μL]	c(EL) [μM]	c(ZV) [μM]	VF aus ZV	V(ZV) [μL]	V(H ₂ O) [μL]
1	20	0,05	10	20	200	0,1	20	170
10	20	0,5	100	20	200	0,1	20	80
50	1000	0,05	10	20	200	0,1	20	170
100	1000	0,1	20	20	200	0,1	20	160
250	1000	0,25	50	20	200	0,1	20	130
500	1000	0,5	100	20	200	0,1	20	80

Basierend auf der Kalibrierreihe aus Tab. 59 wurde die Regressionsgerade mit den Validierungsparametern in Tab. 60 erhalten und in Abb. 74 abgebildet. Die Lauf-zu-Lauf- und Tag-zu-Tag-Variabilität wurde mit 100 μM dG (und 20 μM IS) bestimmt. Die Validierungsparameter beschreiben eine valide, robuste Methode zur Detektion von dG im relevanten Konzentrationsbereich von 1–500 μM . Die Verteilung der Residuen war unauffällig.

Tab. 60: Kalibrierung von dG mit Validierungsparametern und $^{15}\text{N}_5\text{-dG}$ als internem Standard. Analyt: dG, AUC: *area under the curve*, dG: 2'-Desoxyguanosin, IS: internen Standard ($^{15}\text{N}_5\text{-dG}$), m: Mittelwert, LOD: Detektionsgrenze, LOQ: Quantifizierungsgrenze, Übergang: Massenübergang, Stabw.: Standardabweichung, VarK: Varianzkoeffizient.

c(Analyt) [μM]	c(IS) [μM]	c(Analyt)/c(IS)	AUC(Analyt)/AUC(IS)			
			m	Stabw.		
1	20	0,05	7,75E-02	1,39E-02	Achsenabschnitt	0,0017
10	20	0,5	6,17E-01	5,06E-02	Steigung	1,518
50	20	2,5	3,82E+00	1,94E-01	R ²	0,9997
100	20	5	7,46E+00	4,58E-01	Lauf-zu-Lauf-Variabilität	1,0 %
250	20	12,5	1,94E+01	1,22E+00	Tag-zu-Tag-Variabilität	3,0 %
500	20	25	3,78E+01	3,77E+00	LOD _{theoretisch}	0,02 μM
					LOQ _{theoretisch} (S/N=10/1)	0,05 μM
					dG: Übergang 2/Übergang 1	14%
					IS: Übergang 2/Übergang 1	18%

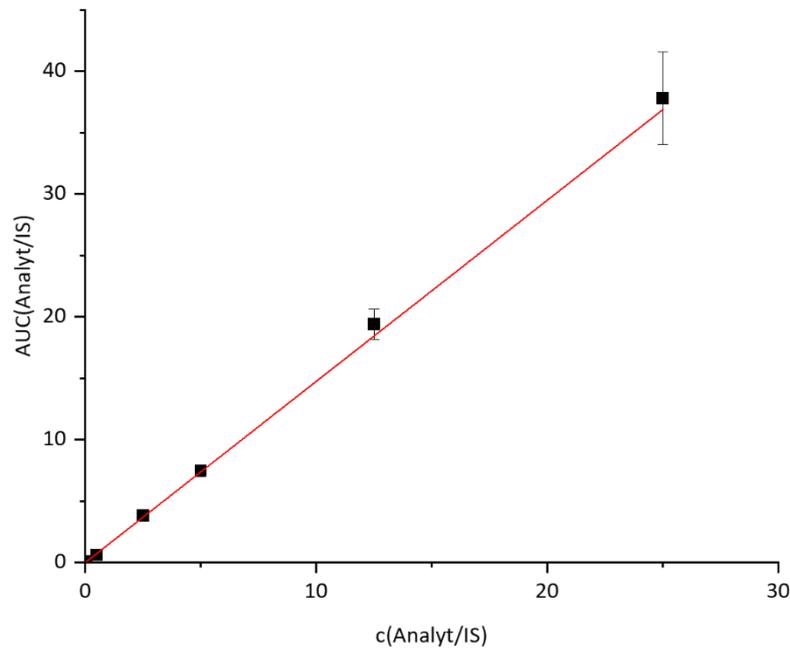


Abb. 74: Regressionsgerade zur Quantifizierung von dG (1–500 μM) mit $^{15}\text{N}_5\text{-dGI}$ (20 μM) als internem Standard. dG: 2'-Desoxyguanosin.

Für die Kalibriergerade mit der Gleichung $y = 1,5182x + 0,0017$ wurde ein $R^2 = 0,9997$ berechnet. Da die Proben stets Messwerte im mittleren bis oberen Bereich der Kalibrierreihe aufwiesen wurde die kleinste gemessenen Kalibrierkonzentration von 1 μM als LOD und LOQ angegeben. Über die Peakhöhe wurde als theoretischer LOD ($S/N = 3:1$) 0,02 μM dG sowie ein theoretischer LOQ ($S/N = 10:1$) von 0,05 μM dG berechnet.

Die relative Wiederfindung von 80, 100, 120 und 400 μM dG betrug $103 \pm 2\%$ betrug. Dafür durchliefen aufdotierte Probenmatrix die Durchführung ab der DNA-Hydrolyse gemäß Kap. 6.8.6.

Zur Berechnung der Hydrolyserate DNA aus der dG-Bestimmung wurde die Annahme getroffen, dass der Anteil am Basenpaar Guanodin-Cytosin in der DNA von pRH 44 % und der von Lachs 41 % beträgt. Die Hydrolyserate betrug durchschnittlich $90 \pm 4\%$.

6.6. Reaktivität von 3-Acetylacrolein *in chemico*

In Vorversuchen wurden mittels saurer Hydrolyse potentielle Reaktionsprodukte von AcA mit AcCys, AcLys, dA, dG, dC und dT untersucht. Die Addukte wurden gegebenenfalls synthetisiert, charakterisiert und entsprechende Quantifizierungsmethoden etabliert. Nach Synthese von AcA mittels DMDO-Oxidation wurde die Reaktivität von isoliertem AcA mit den Reaktanten erneut in verschiedenen Puffer-Systemen mit variierenden pH-Werten getestet, wobei vor allem die Bedingungen folgender Mikrosomeninkubationen und *in vitro*-Untersuchungen im Vordergrund standen. In Tab. 61 sind dafür grundlegenden Ansätze zu finden.

Tab. 61: Lösungen und Suspensionen für Untersuchungen der Reaktivität. *) Vorliegen als Suspension; erst vollständige Lösung im Reaktionsansatz.

Lösung	Ansatz	
K ₂ HPO ₄ -Puffer, 0,5 M	8,71 g/100 mL H ₂ O, auf pH 5 / 7,4 / 9 titriert	
(NH ₄) ₂ CO ₃ -Puffer, 0,1 M	0,961 g/100 mL H ₂ O, auf pH 5 / 7,4 / 9 titriert	
Tris-HCl-Puffer, 0,5 M	7,83 g/100 H ₂ O, auf pH 7,4 titriert	
N _α -Acetyl-L-cystein (AcCys), 10 mM	M [g/mol] = 163,20	16,3 mg/10 mL H ₂ O
N _α -Acetyl-L-lysin (AcLys), 10 mM	M [g/mol] = 188,23	18,8 mg/10 mL H ₂ O
2'-Desoxyadenosin-Monohydrat (dA), 10 mM	M [g/mol] = 269,26	26,9 mg/10 mL H ₂ O
2'-Desoxyguanosin-6 m-% H ₂ O (dG), 10 mM*	M [g/mol] = 285,26	28,5 mg/10 mL H ₂ O
2'-Desoxycytosin-Monohydrat (dC), 10 mM	M [g/mol] = 245,24	24,5 mg/10 mL H ₂ O
2'-Desoxythymidin-Monohydrat (dT), 10 mM	M [g/mol] = 260,25	26,0 mg/10 mL H ₂ O

Reaktivität von AcA aus saurer Hydrolyse von DHDMMF

In Vorversuchen wurde die Reaktivität von AcA mittels saurer Hydrolyse von DHDMMF untersucht und bildeten die Grundlage der Addukt-Synthesen von AcA. Der Ansatz ist in Tab. 62 beschrieben.

Tab. 62: Reaktionsansatz mit AcA aus saurer Hydrolyse. *) Reaktant: N-Acetyl-L-cystein (AcCys), N_α-Acetyl-lysin (AcLys), 2'-Desoxyadenosin (dA), 2'-Desoxycytosin (dC), 2'-Desoxyguanosin (dG) oder 2'-Desoxythymidin (dT). DHDMMF: 2,5-Dihydro-2,5-dimethoxy-2-methylfuran, SL: Stammlösung.

Substanzen	c(SL)	c(Reaktion)	n(Reaktion)	V(SL) [μL] / 5 mL Reaktionsansatz
H ₂ O				2381
Essigsäure	3 %	0,05 %		83,3
DHDMMF	7,068 M	50 mM	250 μmol	35,4
Reaktant*)	10 mM	5 mM	25 μmol	2500

Der Reaktionsansatz wurde für 24 h bei 37 °C inkubiert (550 rpm) und anschließend mittels HPLC-UV/Vis, bzw. HPLC-ESI[±]-MS/MS (Kap. 6.5.2) gegebenenfalls verdünnt vermessen. Die genaue Messmethodik wurde abhängig von der Fragestellung an entsprechender Stelle im Ergebnisteil vermerkt.

Reaktivität von AcA mit Aminosäure-Derivaten

Die Verwendung von isoliertem AcA, welches mittels DMDO-Oxidation von MF gewonnen wurde (Synthese siehe Kap. 6.4.2), ermöglicht die Untersuchung in verschiedenen Puffersystemen bei definiertem pH-Wert. Die pH-Werte 5, 7,4 oder 9 wurden in Puffersysteme basierend auf K_2HPO_4 , $(NH_4)_2CO_3$ oder Tris-HCl eingestellt. Alle Versuche wurden zudem ohne Puffer durchgeführt, an dessen Stelle Wasser eingesetzt wurde. Neben AcA wurde auch MF auf Reaktivität gegenüber der sechs Reaktanten getestet. Die SL der Testsubstanzen AcA und MF wurden aus Stabilität- und Löslichkeitsgründen in DMSO angesetzt und betrug 10 mM. Dazu wurde 9,92 μ L AcA ($c_{Std} = 10,08$ M), bzw. 8,96 μ L MF ($c_{Std} = 11,156$ M) pro mL SL gelöst. Hier wurde sich vor allem auf Bedingungen der folgenden Mikrosomeninkubation und *in vitro*-Untersuchungen fokussiert. Ein Ansatz einer Reaktionslösung ist in Tab. 63 beispielhaft aufgeführt. Zur Festlegung eines Abfangreagenz für die Mikrosomeninkubation wurde die Reaktion unter entsprechenden Bedingungen (Tab. 70) mit hitzeinaktivierten Mikrosomen durchgeführt.

Tab. 63: Ansatz für Reaktion *in chemico* mit AcA aus Synthese mit DMDO. *) Puffer: K_2HPO_4 (SL 500 mM), Tris-HCl (SL 500 mM) oder $(NH_4)_2CO_3$ (SL 100 mM) mit pH 5, 7,4 oder 9. **) Testsubstanz: 3-Acetylacrolein (AcA) oder 2-Methylfuran (MF). ***) Reaktant: *N*-Acetyl-L-cystein (AcCys), *N* $_{\alpha}$ -Acetyl-L-lysin (AcLys), 2'-Desoxyadenosin (dA), 2'-Desoxycytosin (dC), 2'-Desoxyguanosin (dG) oder 2'-Desoxythymidin (dT). DMDO: Dimethyldioxiran, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor.

Substanzen	c(SL) [mM]	c(Reaktion) [mM]	n(Reaktion) [μ mol]	VF aus SL	V(SL)/500 μ L Reaktionsansatz [μ L]
H ₂ O					150
Puffer*	100 500	10 50		0,1	50
Testsubstanz**	100	10	5	0,1	50
Reaktant***	10	5	2,5	0,5	250

Der Reaktionsansatz wurde je nach Fragestellung 1 min, 1 h, 6 h oder 24 h inkubiert (37 °C, 550 rpm) und anschließend mittels HPLC-UV/Vis, bzw. HPLC-MS/MS (Kap. 6.5.2) gegebenenfalls verdünnt vermessen. Die genaue Messmethodik wurde abhängig von der Fragestellung an entsprechender Stelle im Ergebnisteil vermerkt.

Reaktivität von AcA mit isolierter DNA

Es wurde die Reaktivität von isoliertem AcA (gewonnen aus der DMDO-Oxidation von MF, siehe Kap. 6.4.2) gegenüber isolierter DNA untersucht. Dazu wurde isolierte DNA zeit- und dosisabhängig mit 0,1–1000 μ M AcA inkubiert. Verwendet wurde DNA aus unbehandelter pRH, die gemäß Kap. 6.8.6 isoliert wurde.

Während die SL aufgrund der Löslichkeit und Stabilität von AcA in DMSO angesetzt wurden, musste eine ZV in Wasser erfolgen, um auf eine konstante DMSO-Konzentration von 0,1 % DMSO in der Reaktionslösung zu kommen. Die Endkonzentration durfte nicht überschritten werden, da sonst das notwendige Fällen der DNA zur Entfernung von AcA verhindert wurde.

Tab. 64: Ansatz der Stammlösungen von AcA für entsprechende Zwischenverdünnungen und Endlösungen. *) Standard. AcA: 3-Acetylacrolein, DMSO: Dimethylsulfoxid, RL: Reaktionslösung, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung.

Ansatz der Zwischenverdünnungen					Ansatz der Stammlösungen				
c(RL) [μ M]	c(ZV) [μ M]	VF aus SL _x	V(SL _x) [μ L]	V(H ₂ O) [μ L]	c(SL _x) [mM]	VF aus SL _{x-1}	c(SL _{x-1}) [mM]	V(SL _{x-1}) [μ L]	V(DMSO) [μ L]
1000	10000	0,01	10	990	1000			8,8 *	91,2
100	1000	0,01	10	990	100	0,1	1000	10	90
10	100	0,01	10	990	10	0,1	100	10	90
1	10	0,01	10	990	1	0,1	10	10	90
0,1	1	0,01	10	990	0,1	0,1	1	10	90
0,01	0,1	0,01	10	990	0,01	0,1	0,1	10	90

Die Inkubation wurde in Wasser oder mit K₂HPO₄-Puffer (0,05 M in Reaktionslösung) durchgeführt. Die Endkonzentration des Puffers wurde durch Zugabe von 10 μ L SL (0,5 M; pH 7,4) pro 100 μ L Reaktionslösung erreicht. Die Zugabe an Wasser wurde entsprechend reduziert.

Tab. 65: Ansatz zur Untersuchung der Reaktivität von AcA mit isolierter DNA. *) Puffer: K₂HPO₄. AcA: 3-Acetylacrolein, RL: Reaktionslösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung.

Substanz	c(RL)	c(ZV)	VF aus ZV	V(ZV) [μ L]/100 μ L RL
DNA	370 μ g/mL	925 μ g/mL	0,4	54
AcA	0,1-1000 μ M	10·c(RL)	0,1	10
Puffer*	0,05 M	0,5 M	0,1	10
H ₂ O, ohne Puffer				36
mit Puffer				26

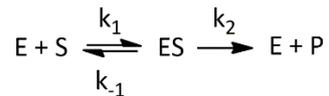
Zusätzlich wurden 2, 10 oder 20 μ g Lachs-DNA gelöst in 100 μ L Wasser ohne Zugabe von AcA wie folgt inkubiert und aufgearbeitet.

Der Reaktionsansatz (Tab. 65) wurde für 1, 6, 18, 24 oder 48 h (37 °C, 650 rpm) im 2 mL-Reaktionsgefäß inkubiert und durch Fällung mit 1,8 mL Ethanol (100 %) gestoppt. Gemäß Kap. 6.8.6 wurde die DNA aufgereinigt (ab Fällung der DNA), enzymatisch hydrolysiert und vermessen.

6.7. Metabolische Aktivierung von 2-Methylfuran

Enzymkinetische Parameter

Zur Charakterisierung der enzymatischen Kinetik wurden Parameter basierend auf der Metabolitenbildung bei variierender Substratkonzentration nach konstanter Inkubationszeit bestimmt. Grundlage ist die Reaktion des Substrates S mit dem Enzym E, dem Enzym-Substrat-Komplex ES, aus dem das Produkt, bzw. die Produkte P hervorgehen. Sie wird bestimmt durch die Reaktionskonstanten k_1 , k_{-1} und k_2 gemäß dem Schema:



Die **Michaelis-Menten-Konstante** K_M korreliert antiproportional mit der Bindungsaffinität zwischen Enzym und Substrat zur Ausbildung des Enzymsubstratkomplexes. Basierend auf dem Massenwirkungsgesetz ist sie definiert als:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Über die Auftragung der Substratkonzentration c_S gegen die **Reaktionsgeschwindigkeit** v lässt sich mittels der Michaelis-Menten-Gleichung die Konstante K_M kalkulieren. K_M beschreibt dabei die benötigte Substratkonzentration zum Erreichen der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit ($v_{max}/2$). Die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit wird als v_0 bezeichnet.

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot c_S}{K_M + c_S}$$

Ist die molare Masse des Enzyms bekannt kann die **Wechselzahl** k_{cat} angegeben werden. Sie gibt den Umsatz an Substratmolekülen (n_S) pro Enzymmoleküle (n_E) je Zeit t an, woraus sich die Einheit [s^{-1}] ergibt. Sie wurde daher bei SupersomesTM anstelle von v_{max} angegeben.

$$k_{cat} = \frac{n_S}{n_E \cdot t}$$

Die **katalytische Effizienz** E_{cat} beschreibt als der Quotienten aus k_{cat} und K_M das Zusammenspiel zwischen Enzymaktivität und Bindungsaffinität. Sie ist demnach umso höher, je größer der Umsatz pro Zeit (k_{cat}) und kleiner K_M (als Maß hoher Affinität). Anstelle von k_{cat} wird v_{max} für die Berechnung der **in vitro-intrinsische Clearance** CL_{int} in Mikrosomeninkubationen genutzt (Yang *et al.*, 2012).

$$E_{cat} = \frac{k_{cat}}{K_M} \quad CL_{int} = \frac{v_{max}}{K_M}$$

Verschiedene **Modelle** ermöglichen durch unterschiedliche Auftragung der Substratkonzentration gegen die Reaktionsgeschwindigkeit die Berechnung der Parameter v_{max} und K_M . Hier wurden die Messdaten im Michaelis-Menten-, Hill- sowie Eadie-Hofstee-Diagramm aufgetragen und auf Übereinstimmung mit dem ermittelten Modell geprüft (Nelson und Cox, 2005).

Für die Wahl des repräsentativsten Modells wurden folgende **Kriterien** herangezogen:

1. Konvergierende Kurve (Hyperbel als Sättigungskurve)
2. Zufällige Verteilung der Residuen
3. Kleine Fehlersumme der Quadrate/Residuenquadratsumme (RQS)
4. Kleine Standardfehler von K_M und v_{max}
5. R^2 (korr.) nahe 1
6. Höchste mögliche Inklusion an Datenpunkten zur Analyse

Charakteristika der verwendeten Mikrosomen und Supersomes™

Die Lebermikrosomen von Ratten und Menschen wurden wie auch die rekombinant exprimierten, humanen Cytochrom P450-Enzyme (Supersomes™) kommerziell erworben. Die Übersicht der ausgewählten Enzymgehalte und -aktivitäten in Tab. 66 wurde aus mitgelieferten Zertifikaten zusammengestellt, deren ergänzende Informationen dem elektronischen Anhang (III) entnommen werden können.

Die **RLM** sind gepoolte Proben aus ~79 männlichen Sprague-Dawley-Ratten und werden üblicherweise nach Zellisolierung und -aufschluss mit anschließender differenzieller Dichtezentrifugation sowie Homogenisierung gewonnen. Die so erhaltenen ca. 100 nm großen Membranfragmente des endoplasmatischen Reticulums enthalten membrangebundene CYPs mit metabolischer Aktivität.

Die **HLM** stammen aus einem breiten Pool von 150 Spendern beider Geschlechter, um eine möglichst durchschnittliche Enzymausstattung zu repräsentieren. Dabei wurden bekannte Polymorphismen inkludiert. Gleichzeitig erlaubte die Lot-zu-Lot-Variabilität mit einem Variationskoeffizienten < 5 % (Median) für CYP 1A2, CYP 2C9, CYP 2D6 und CYP 3A4 den Vergleich verschiedener Probensätze.

Tab. 66: Enzymgehalte und -aktivitäten der RLM und HLM (Herstellerangaben). Unterschiedliche Testverfahren wurden in separaten Spalten aufgeführt. HLM: humane Lebermikrosome, RLM: Rattenlebermikrosome.

Enzymaktivität/-gehalt in	RLM	HLM	
Proteingehalt	20	20	mg/mL
CYP total	850	400	pmol/mg
Oxidoreduktase	290	340	nmol/(mg·min)
Cytochrom b ₅	630	590	pmol/mg
CYP 1A	5 400		pmol/(mg·min)
CYP 1A2		590	pmol/(mg·min)
CYP 2A6		860	pmol/(mg·min)
CYP 3A4	4 500	6 200	pmol/(mg·min)
CYP 2C	89		pmol/(mg·min)
CYP 2C9		2 300	pmol/(mg·min)
CYP 2D6		83	pmol/(mg·min)
CYP 2E1		2 900	pmol/(mg·min)

Supersomes™ sind humane CYPs, welche aus Baculovirus-transfizierten SF-9 Insektenzellen rekombinat exprimiert wurden. Dabei ist die katalytische Aktivität ungefähr 6-fach höher als bei durchschnittlichen HLM (Herstellerangabe). Die ebenfalls über den Vektor exprimierten Oxidoreduktasen (Cytochrom-c-Reduktase ; NADPH-Cytochrom-P 450-Oxidoreduktase) werden für die Übertragung der Reduktionsäquivalente 2 H^+ und 2 e^- von NADPH/ H^+ auf das CYP für die folgende Monooxygenierung des Substrates benötigt. Zusätzlich wird Cytochrom b_5 als allosterischer Effektor zur Steigerung der katalytischen Aktivität in die heterologe Expression einiger CYPs integriert (Eisenbrand *et al.*, 2005).

Tab. 67: Rekombinant exprimierte humane Cytochrom P450-Enzyme (Supersomes™). Alle Supersomes enthalten Oxidoreduktase und tw. Cytochrome b_5 . Die CYP-Aktivität wurde mittels spezifischer Assays bestimmt, die den spezifischen Zertifikaten und Tab. 1 zu entnehmen sind. Prot.: Protein. CYP: Cytochrom P450.

Supersome	Protein-Gehalt [mg/mL]	CYP-Gehalt [pmol/mL]	Spezifische CYP-Aktivität [pmol Produkt/ (min*pmol CYP)]	Oxidoreduktase-Aktivität [nmol/ (min*mg Prot.)]	Cytochrom b_5 -Gehalt [pmol/mg Prot.]
CYP 1A2	14	1000	52	1100	
CYP 2A6	4,4	1000	46	350	410
CYP 3A4	8,5	1000	290	2400	840
CYP2C9*1	4,1	1000	81	540	190
CYP2D6*1	18	1000	110	1800	
CYP2E1	6,5	2000	35	2500	530

Die angegebenen Gehalte und CYP-Aktivitäten wurde mittels spezifischer Assays bestimmt, die in Tab. 1 zusammengefasst sind. Da alle Mikrosomen und Supersomes von der gleichen Firma mit den gleichen Assays erworben wurden, ist von einer guten Vergleichbarkeit der Messergebnisse untereinander auszugehen.

Chemikalien und Lösungen

Tab. 68: Lösungen für die Enzyminkubationen. Lagerung der Mikrosomen und Supersomes bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, alle anderen Ansätze bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. IS: Interner Standard. AcLys: *N* $_{\alpha}$ -Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial, CYP: Cytochrom P450.

Lösung	Zusammensetzung	CYP	Puffer
K ₂ HPO ₄ -Puffer, 0,5 M	8,71 g/100 mL H ₂ O, auf pH 7,4 titriert	1A2	
Tris-HCl, 0,5 M	7,83 g/100 mL H ₂ O, auf pH 7,5 titriert	3A4	K ₂ HPO ₄
Sucrose, 0,25 M	8,557 g/100 mL H ₂ O	2D6	
Mikrosome, 2 mg/mL	2 mg Protein/mL Sucrose 0,25 M	2E1	
Supersomes, 240 nM	0,5 mL Std (1 o. 2 μM) + 1,583 o. 3,667 mL H ₂ O*	2A6	Tris
MgCl ₂ *6 H ₂ O, 0,3 M	6,1 g/100 mL H ₂ O	2C9	
NADPH*4Na ⁺ , 50 mM	100 mg NADPH*4Na ⁺ /2,4 mL H ₂ O		
AcLys, 100 mM	18,823 mg/mL H ₂ O		
AcLys-BDA, 200 μM (IS)	5,083 mg/mL H ₂ O		
MeCN + IS (AcLys-BDA 2 μM)	100 μL AcLys-BDA 200 μM + 9,9 mL MeCN		
25 %-ige Ameisensäure	250 μL Ameisensäure + 750 μL H ₂ O		

Die Wahl der Puffer zur Einstellung des pHs, der Konzentrationen an Mikrosomen/SupersomesTM, Substrat und weiterer Zusätze basierte auf Empfehlungen des Herstellers und wurde im Rahmen derer auf die eigenen Bedingungen angepasst.

NADPH wurde direkt als solches zugesetzt, nachdem der Vergleich mit NADPH-generierendem System, klassisch bestehend aus NADP⁺ (1 mM), Glucose-6-phosphat (5 mM) und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (0,5 units), keinen signifikanten Unterschied zeigte. Photometrisch (NanoDropTM) wurde vor Versuchsbeginn das Vorliegen der reduzierten Form NADPH in 50-fach verdünnter Lösung (1 μL NADPH, 50 mM *ad* 50 μL) stets sichergestellt. Das Absorptionsmaxima der oxidierten Form liegt bei λ_{max} (NADP⁺) = 260 nm, während die reduzierte Form mit λ_{max} (NADPH) = 260 und 340 nm zwei Maxima aufweist.

Für die Konzentrationsreihe von MF wurde DMSO als Lösungsvermittler genutzt. Aus einer zweimolaren Stammlösung in DMSO wurden ZV hergestellt, die 1 % DMSO enthielten und der jeweiligen 20-fachen Inkubationskonzentration von MF entsprachen. Durch die Zugabe zum Inkubationsansatz wurde mit einer Verdünnung von 1:20 die Endkonzentration erreicht sowie die DMSO-Konzentration auf 0,05 % reduziert. Die konstante, niedrige Lösungsmittelkonzentration erwies sich als unerlässlich für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, da DMSO in höheren Konzentrationen inhibierend auf die Enzyme wirkte. Es wurden Inkubationskonzentrationen von 10, 100, 250, 500 und 750 μM MF getestet. Zwar wurden auch Ansätze mit 1000 μM MF-Endkonzentration hergestellt, jedoch war die Wasserlöslichkeit bei 0,05 % DMSO zu gering, um eine stabile Lösung zu erhalten. Probemessungen mit Mikrosomen bestätigen die unzureichende Reproduzierbarkeit von Inkubationen mit 1000 μM MF.

Als Negativkontrolle wurden hitzeinaktivierte Mikrosomen oder SupersomesTM (30 min, 90 $^{\circ}\text{C}$, 600 rpm) mit 100 μM , bzw. 500 μM MF zur entsprechen Inkubationszeit (37 $^{\circ}\text{C}$) inkubiert.

Auch wurde der Ausschluss von NADPH als Negativkontrolle getestet. Reaktionskontrollen mit 1 μM AcA stellten die konstant ablaufende Abfangreaktion sicher. Spezifische CYP-Aktivitäten wurden standardisiert vom Hersteller von jeder individuellen Lot-Charge bestimmt und in Tab. 67 aufgelistet.

Tab. 69: Konzentrationsreihe von MF für die enzymatische Inkubation. LM: Lösungsmittel, MF: 2-Methylfuran, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung.

c(Inkubation) [μM]	Ansatz der Zwischenverdünnungen					
	c(ZV) [mM]	VF aus SL	c(SL) [mM]	V(ZV) [μL]	V(LM) [μL]	LM
	2000	0,18	<i>Standard</i>	10	45,78	DMSO
	20	0,01	2000	10	990	H ₂ O
750	15	0,75	20	75	25	1 % DMSO
500	10	0,5	20	250	250	1 % DMSO
250	5	0,25	20	25	75	1 % DMSO
100	2	0,1	20	50	450	1 % DMSO
10	0,2	0,01	20	10	990	1 % DMSO

Für die Inkubationsätze wurde der Puffer zur Einstellung des pH-Werts auf die verwendeten Mikrosomen, bzw. SupersomesTM angepasst. Für die Inkubationen mit CYP 2A6 und CYP 2C9 wurde Tris-Puffer (50 mM) wendet, da die Aktivität dieser Enzyme durch Phosphat gehemmt werden kann. Alle anderen SupersomesTM wurden wie auch die Mikrosomen in K₂HPO₄-Puffer (50 mM) inkubiert.

Tab. 70: Inkubationsansatz der Mikrosomen oder SupersomesTM. IS: Interner Standard, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung. *) Tris-Puffer für CYP 2A6 und CYP 2C9; K₂HPO₄-Puffer für alle anderen Supersomes und Mikrosomen. **) Wird nicht zum Inkubationsvolumen gezählt. CYP: Cytochrom P450, MF: 2-Methylfuran, IS: interner Standard (AcLys-BDA, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: *cis*-2-Buten-1,4-dial).

Substanz	c(Inkubation)	c(SL o. ZV)	VF	V(SL o. ZV) /100 μL [μL]
1. Vorinkubation				
K ₂ HPO ₄ /Tris ^{*)} -Puffer	0,05 M	0,5 M	0,1	10
MgCl ₂ *6 H ₂ O	0,003 M	0,3 M	0,01	1
AcLys	4 mM	100 mM	0,04	4
H ₂ O				26
Mikrosome <i>oder</i> Supersome	1 mg /mL 120 nM	2 mg/mL 240 nM	0,5	50
MF	μM in 0,05 % DMSO	20·c(Inkubation)	0,05	5
2. Inkubationsstart				
NADPH	2 mM	50 mM	0,04	4
3. Inkubationsstop ^{**)}				
MeCN + IS	c(gefällte Probe) = 1 μM IS	2 μM IS	0,5	100

Inkubation der Mikrosomen und Supersomes™

Die Mikrosomen, bzw. Supersomes™ wurden möglichst schnell aufgetaut (37 °C, 300 rpm) und zum restlichen, vorbereiteten Ansatz der Vorinkubation (siehe Tab. 70) gegeben. Im Anschluss an die Vorinkubation (5 min, 37 °C, 300 rpm) wurde die eigentliche Inkubation mit Zugabe von NADPH gestartet (siehe Tab. 70). Abhängig von der Fragestellung wurden die Proben 1, 5, 10, 15, 30, 60 oder 120 min bei 37 °C und 300 rpm leicht rotiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Fällung der Proteine mittels eiskaltem MeCN (100 %, -20 °C) in äquivalentem Volumen zur Probe mit zugemischtem IS (1 µM in gefällter Probe) und weiterer Kühlung bei -20 °C für 30 min. Nach Zentrifugation der Proben (4 °C, 17 000 g, 10 min) wurde der Überstand membranfiltriert. Für eine verbesserte chromatographische Auftrennung und Ionisierung erwies sich eine Ansäuerung mit 2 µL 25 %-iger Ameisensäure pro 48 µL Probe kurz vor der Messung als geeignet. Die Vermessung der gebildeten AcLys-AcA-Gehalte in den Proben erfolgte mit Methode (I) (Kap. 6.5.2.3) via HPLC-ESI⁺-MS/MS.

Methodenvalidierung

Die Wiederfindungsrate von 10, 800, 1000, 1200 nM AcLys-AcA in Probenmatrix betrug nach Aufarbeitung der mikrosomalen Ansätze 101±3 %. Daten zur messtechnischen Validierung sind in Kap. 6.5.2.3 zu finden.

6.8. Adduktbildung und Toxizität von 2-Methylfuran und 3-Acetylacrolein *in vitro*

6.8.1. Zellkultur permanenter Zelllinien

Als Modell für humane Leber wurde die immortalisierte Zelllinie HepG2 genutzt, welche dem hepatozellulären Karzinoms eines 15-jährigen argentinischen Jungens (1975) entstammt. Die adhärennten Zellen wachsen als epithelähnlicher Monolayer in kleineren Aggregaten mit einer Verdopplungszeit von 50–60 Stunden. Sie sind zwar in der Lage eine Vielfalt an Proteinen zu exprimieren (DMSZ, 2017), jedoch zeigen sie ein deutlich verminderte metabolische Kapazität (Wilkening *et al.*, 2003; Hart *et al.*, 2010).

Chemikalien und Lösungen

Tab. 71: Lösungen für die Zellkultur permanenter Zelllinien. Lagerung aller Lösungen bei 4 °C. SL: Stammlösung, GL: Gebrauchslösung.

Lösung	Zusammensetzung
PBS-SL (10x)	100 g NaCl 14 g Na ₂ HPO ₄ 2,5 g KH ₂ PO ₄ 2,5 g KCl <i>ad</i> 1 L H ₂ O, mit NaOH auf pH 7,4 titriert
PBS-GL (1x)	PBS-SL (10x) 1:2 mit H ₂ O verdünnt, steril autoklaviert
Pen/Strep-Lösung	5000 Units/mL Penicillin 5000 µg/mL Streptomycin
Trypsin/EDTA	Serva, Heidelberg, Deutschland
Auftaumedium	500 mL RPMI-Medium 127 mL FKS 6,3 mL Pen/Strep in RPMI-Medium
Nährmedium	500 mL RPMI-Medium 56 mL FKS 5,6 mL Pen/Strep
DAPI/SR 101-Lösung	200 mM Tris 200 mM NaCl 8 µM DAPI 50 µM SR 101 in H ₂ O, auf pH 7,6 titriert
Trypanblau-Lösung	0,4 %ig in 0,9 % NaCl-Lösung (Fertiglösung)

Alle Lösungen wurden steril hergestellt und die Arbeiten unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Einfrieren und Auftauen von Zellaliquoten

Die Kryokonservierung ermöglicht die theoretisch unbefristete Lagerung lebender Zellen durch nahezu vollständige Reduktion zellulärer Prozesse unterhalb -130 °C . Um zellschädigenden Effekte wie Dehydrierung der Zelle, Steigerung der Elektrolytkonzentration und Eiskristallbildung möglichst gering zu halten, müssen besondere Vorkehrungen während des Einfrier-, aber auch Auftauprozesses getroffen werden. Osmotischer Dehydrierung, welcher ein letaler Ionengradienten folgt, wurde mittels penetrierendem Kryoprotektivum, hier 10%igem DMSO, entgegengewirkt. Mit einer Einfriereschwindigkeit von 1 °C/min im Kryocontainer wurde ein Mittelweg zwischen zu hohen Kühlraten, die Bildung von Eiskristallen fördernd, und zu langsamen Einfrieren, welches zu lange hohe Elektrolytkonzentrationen erzeugt, ermöglicht (Schmitz, 2009).

Ausgegangen wurde von Zellen in einer 175 cm^2 -Kulturflasche mit nahezu konfluentem Bewuchs (Abweichungen siehe Tab. 72). Nach Entfernung des Nährmediums und waschen mit PBS wurden die Zellen mit 5 mL vortemperiertem Trypsin/EDTA 5 min im Brutschrank (37 °C , 5 % CO_2 , 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 10 mL Auftaumedium resuspendiert, sodass nach Zellzahlbestimmung (s. u.) Aliquots von 1,5 mL Zellsuspension mit 3 Mio. Zellen und Zugabe von $167\text{ }\mu\text{L}$ DMSO in Kryoröhrchen vorbereitet werden konnten. Die zytotoxische Konzentration des Kryoprotektivums DMSO bei Raumtemperatur bedurfte einer sofortigen Kühlung auf Eis. Nach zunächst 24 h im Kryocontainer bei -20 °C wurden die Zellen entweder bei -80 °C mit einer begrenzten Lagerzeit oder bei -196 °C in flüssigem Stickstoff für deutlich längere Zeit aufbewahrt.

Das Auftauen der Zellen bedurfte eines schnellen Mediumwechsels, um die Zellen möglichst kurz der zytotoxischen DMSO-Konzentration von 10 % bei Raumtemperatur auszusetzen (Gstraunthaler und Lindl, 2021). Die im Wasserbad (37 °C) angetaute Zellsuspension von 1,5 mL wurde in 10 mL Nährmedium vollständig aufgetaut, um mittels Zentrifugation (25 °C , 1500 rpm, 4 min) die Zellen vom Medium zu trennen. Das Zellpellet wurde in 6 mL Auftaumedium resuspendiert, um ein Anwachsen der Zellen in einer 25 cm^2 -Kulturflasche im Brutschrank (37 °C , 5 % CO_2 , 95 % Luftfeuchtigkeit) zu starten. War eine Zellrasendichte von ca. 80 % erreicht, wurden die Zellen passagiert. Für die nächsten 2–3 Mediumwechsel als auch Subkultivierungen wurde Auftaumedium zur Unterstützung des Wachstums und der Vitalität genutzt. Mit dem Übergang zu größeren Zellkulturflaschen wurde die benötigten Mengen an Nährmedium gemäß Tab. 72 angepasst.

Tab. 72: Benötigte Mengen an Medium und Trypsin/EDTA für unterschiedliche Kulturflaschengrößen.

Größe der Kulturflasche [cm^2]	V(Medium) [mL]	V(Trypsin/EDTA) [mL]
25	6	1,5
75	20	3
175	40	5

Subkultivierung und Mediumwechsel

Um differenzierten Stoffwechsel und Wachstum der Zellen zu gewährleisten, wurde das Medium alle drei Tage gewechselt, sofern keine Subkultivierung stattfand. So wurde eine konstante Nährstoffzufuhr und Entfernen von schädlichen Stoffwechselendprodukten sichergestellt. Der Umschlag von rot auf orange des Phenolrots im Medium war ein sicherer Indikator für die Notwendigkeit eines Mediumwechsels. Erreichte der Zellrasen eine Dicht von etwa 80 % war eine Subkultivierung erforderlich, um Wachstumshemmung durch Kontaktinhibition zu umgehen. Dennoch ist von einer Veränderung der physiologischen Eigenschaften während der Kultivierung auszugehen, weshalb Passagenzahlen über 30 verworfen wurden (Gstraunthaler und Lindl, 2021).

Für lediglich einen Mediumwechsel wurden das verbrauchte Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Nährmedium gemäß Tab. 72 zugegeben. Im Falle einer Subkultivierung wurden die Zellen vom Medium befreit, mit PBS gewaschen und mit vorgewärmtem Trypsin/EDTA (siehe Tab. 72) für 5 min inkubiert (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit). Durch Zugabe von frischem Nährmedium (siehe Tab. 72) wurde die weitere Abbaureaktion der Endopeptidase gestoppt, sodass die passagierten Zellen im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) weiter gelagert werden konnten.

Testung auf Mykoplasmen

Mykoplasmen beeinflussen als bakterieller Befall in der Zellkultur den Stoffwechsel und damit Untersuchungsergebnisse permanenter Zellen. Im Abstand von etwa zwei Monaten wurde auf einen Mykoplasmenbefall untersucht und dieser ausgeschlossen.

Hierzu wurden einige Tropfen der Zellsuspension in 10 mL Nährmedium auf einem Superfrost-Objektträger in einer Zellkulturschale (100 mm) für 24 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) anwachsen lassen. Im Anschluss wurde der Objektträger mit eiskaltem Methanol waschen, 1 h bei –20 °C gelagert und getrocknet. Angefärbt mit DAPI-SR101-Lösung wurde die Probe fluoreszenzmikroskopisch auf Mykoplasmen untersucht. Solche zeigen sich als kleine, blau leuchtende Punkte um die DNA der Zelle.

Bestimmung der Zellzahl und -viabilität

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde als Hämazytometer eine Neubauerzählkammer mit einer Volumenaufnahme von 0,1 µL verwendet. Um die Anzahl an Zellen pro mL zu erhalten, wurde der Mittelwert an gezählten Zellen in den vier vorgeprägten, großen Eckquadraten mit dem Neubauerfaktor von 10 000 multipliziert. Die Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau-Färbelösung ermöglicht zeitgleich die Bestimmung der Zellviabilität, was als zusätzlicher Faktor bei der Zellzahlbestimmung berücksichtigt werden muss. Da stoffwechselaktive Zellen den anionischen Farbstoff aktiv aus der Zelle transportieren, erscheinen sie weiß unter dem Lichtmikroskop, während tote Zellen blau gefärbt sind. So

wurde die Zellviabilität als Prozentsatz an lebenden Zellen einer Zellsuspension angegeben (Louis und Siegel, 2011).

Die zu testende Zellsuspension wurde 1:5 mit Trypanblau-Lösung verdünnt und mittels Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop die lebenden *versus* toten Zellen ausgezählt. Die Angaben erfolgten als prozentualer Anteil lebender Zellen zur Gesamtzellzahl.

6.8.2. Isolierung und Kultivierung primärer Rattenhepatozyten (pRH)

Primäre Rattenhepatozyten (pRH) sind metabolisch kompetente Zellen ohne entartete Differenzierung. Sie wurden frisch isoliert als Modell genutzt, um den Stoffwechsel realitätsnah abzubilden. Während Zytotoxizitätstests auch mit der permanenten Zelllinie HepG2 als Vergleich durchgeführt wurden, erfolgten die weiteren Untersuchungen zur Metabolisierung samt Adduktbildung aufgrund der erhaltenen Ergebnisse nur noch mit pRH.

Chemikalien und Lösungen

Tab. 73: Lösungen für die Isolierung primärer Rattenhepatozyten. Lagerung aller Lösungen bei 4 °C. SL: Stammlösung, GL: Gebrauchslösung.

Lösung	Zusammensetzung
Heparin-Lösung	1000 U/mL in 0,9 % NaCl; sterilfiltriert
Pentobarbitallösung	Hergestellt nach (Priest und Geisbuhler, 2015)
Kollagenaselösung	100 CDU/mL
HEPES, 1 M	23,83 g ad 100 mL H ₂ O; mit NaOH auf pH 7,4 titriert; sterilfiltriert
EGTA, 100 mM	3,8 g ad 100 mL H ₂ O; mit NaOH auf pH 8,0 titriert; sterilfiltriert
Perfusionsmedium I	500 mL HBSS 5 mL HEPES, 1 M 500 µL EGTA, 100 mM
Perfusionsmedium II	500 mL DMEM <i>low glucose</i> 5 mL HEPES, 1M
Waschpuffer	500 mL DMEM <i>high glucose</i> 3,5 mL BSA, 30 % 5,2 mL HEPES, 1 M 5,2 mL Pen/Strep, 100x
Percoll-Lösung	27,8 mL Percoll 4,2 mL Perfusionspuffer-SL, 10x
Perfusionspuffer-SL, 10x	81,82 g NaCl 3,73 g KCl 1,63 g MgCl ₂ * 6 H ₂ O 2,85 g Na ₂ HPO ₄ 0,544 g KH ₂ PO ₄ ad 1 L H ₂ O; auf pH 7,4 titriert

Fortsetzung Tab. 73: Lösungen für die Isolierung primärer Rattenhepatozyten. Lagerung aller Lösungen bei 4 °C. SL: Stammlösung, GL: Gebrauchslösung.

Lösung	Zusammensetzung
Kollagenlösung	0,5 g Kollagen <i>ad</i> 1 L 0,1%ige Essigsäure
Nährmedium	500 mL DMEM <i>high glucose</i> 56 mL FKS 5,6 mL Pen/Step
PBS	Siehe Chemikalien und Lösungen Tab. 71

Isolierung der pRH

Alle Lösungen wurden steril hergestellt und die Arbeiten unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Es wurden männliche Wistar-Ratten (150–250 g KG) mit Pentobarbital (100 mg/kg KG; *i.p.*) anästhesiert und die Hepatozyten mittels Kollagenaseperfusion nach Schrenk *et al.* (1992) isoliert.

Kultivierung der pRH

Die Bestimmung der Zellzahl und -viabilität erfolgte analog zur Vorgehensweise bei permanenten Zellen in Kap.6.8.1. So wurden nur Zellsuspensionen mit einer Viabilität $\geq 80\%$ genutzt. Die Aussaat der Zellen war abhängig vom darauffolgenden Versuch, jedoch war ein vorheriges Anwachsen in benötigter Zellzahl im entsprechenden Kultivierungsgefäß notwendig. Nach 3 h in frischem Nährmedium (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) wurde das Medium mit toten Zellen entfernt. Die Zellen wurden im Anschluss direkt für Untersuchungen eingesetzt, da ihre Viabilität nach 48–72 h deutlich abzunehmen begann und sie damit nicht mehr für metabolische Studien brauchbar waren.

6.8.3. Bestimmung der Zytotoxizität von MF und AcA

Zu Beginn der *in vitro*-Untersuchungen wurde die Zytotoxizität von MF und AcA in HepG2 und pRH bestimmt. Ziel war der Vergleich zwischen unterschiedlichen Zellsystemen und die Testkonzentrationen für weitere Untersuchungen festzulegen. Die Zytotoxizität wurde über die Zellvitalität mittels Resazurin-Reduktions-Assays bestimmt. Dieser beruht auf der Reduktion des nicht fluoreszierenden, blauen Farbstoffs Resazurin zu pink fluoreszierendem Resorufin ($\lambda_{\text{Anregung}} = 530\text{--}560\text{ nm}$; $\lambda_{\text{Emission}} = 590\text{ nm}$) durch Reduktionsäquivalente. Diese werden lediglich in stoffwechselaktiven Zellen (neu-)gebildet (Rampersad, 2012). Dafür eignen sich zelluläre Elektronendonore mit niedrigerem Redoxpotential als Resorufin ($E_0 = +380\text{ mV}$; pH 7,0; 25 °C) worunter Nicotinamiddinukleotidphosphat (NADPH), Nicotinamiddinukleotid (NADH), Flavinadenindinukleotid (FADH₂), Flavinmononukleotid (FMNH) und Cytochrome fallen (Page *et al.*, 1993).

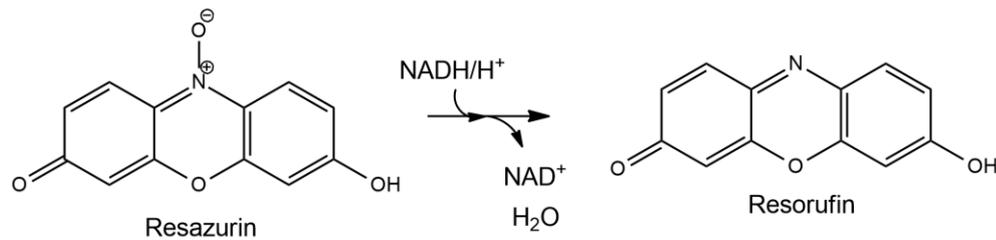


Abb. 75: Reduktion von Resazurin zu Resorufin mittels NADH/H⁺. NADH/H⁺: reduzierte Form von Nicotinamiddinukleosid, NAD⁺: oxidierte Form von Nicotinamiddinukleosid (Rampersad, 2012).

Chemikalien und Lösungen

Tab. 74: Lösungen für den Resazurin-Reduktions-Test zur Bestimmung der Zytotoxizität. Lagerung aller Lösungen bei 4 °C. Während die Resazurin-SL 4 Wochen haltbar ist, wurde die Resazurin-Puffer-Lösung vor Gebrauch frisch angesetzt. GL: Gebrauchslösung, SL: Stammlösung.

Lösung	Zusammensetzung
Resazurin-SL	11,05 mg Resazurin 100 µL Dimethylformamid
NaCl/P _i -Puffer	900 mg NaCl 14,4 mg KH ₂ PO ₄ 52,8 mg Na ₂ HPO ₄ ad 100 mL ddH ₂ O
Resazurin-Puffer-Lösung	100 µL Resazurin-SL ad 100 mL NaCl/P _i -Puffer
Resazurin-GL	5 mL Resazurin-NaCl/P _i -Lsg. 45 mL Basismedium (siehe Tab. 75), serumfrei
PBS	siehe Chemikalien und Lösungen Tab. 71
Nährmedium	500 mL Basismedium 56 mL FKS 5,6 mL Pen/Strep

HepG2-Zellen und pRH benötigten unterschiedliche Inkubationsbedingungen gemäß Tab. 75. Die IL für HepG2 oder pRH wurden aus 100-, bzw. 1000-fach konzentrierten ZV der Testsubstanz hergestellt. Dazu wurde im Umfang von 5 µL ZV/500 µL Nährmedium (HepG2), bzw. 1 µL ZV/1 mL Nährmedium (pRH) verdünnt. Die Endkonzentrationen der Testsubstanzen sind Tab. 75 zu entnehmen. Als Lösungsmittel der ZV diente DMSO. Aus den Verdünnungsschritten zu den endgültigen IL leitete sich die Negativkontrolle mit 1 % DMSO für HepG2-Zellen und 0,1 % DMSO für pRH ab. Als Positivkontrolle wurde für beide Zellarten eine Endkonzentration von 0,01 % Natriumdodecylsulfat (engl.: *sodium dodecyl sulfate*, SDS) gewählt, welches jedoch in H₂O zwischenverdünnt wurde. Die mitgeführte Mediumkontrolle, für den Vergleich mit den DMSO-enthaltenen Negativkontrollen, bestand aus dem entsprechendem Basismedium.

Tab. 75: Inkubationsbedingungen und -ansätze für Resazurin-Reduktions-Assay mit HepG2-Zellen und pRH. IL: Inkubationslösung, NK: Negativkontrolle, PK: Positivkontrolle, ZV: Zwischenverdünnung.

	HepG2-Zellen	pRH
Basismedium	RPMI-Medium	DMEM <i>low glucose</i>
Wellplatten-Format	48-Well	24-Well
Zellen/Well	180 000	200 000
V/Well [mL]	0,5	1
VF(ZV zu IL)	0,01	0,001
Inkubationslösung	5 µL ZV/0,5 mL Nährmedium	1 µL ZV/mL Nährmedium
<u>Testsubstanz:</u>		
c(ZV) in DMSO	100-fach konzentriert	1000-fach konzentriert
c(IL) MF:	100–10 000 µM	100–5000 µM
c(IL) AcA:		0,1–100 µM
<u>NK, Lösungsmittel:</u> DMSO		
c(ZV) [%]	100	100
c(IL) [%]	1	0,1
<u>PK:</u> SDS		
c(ZV) [%] in H ₂ O	1	10
c(IL) [%]	0,01	0,01

Inkubation

Die Inkubation der verschiedenen Zellenarten erforderte teilweise unterschiedliche Bedingungen, die in Tab. 75 dargestellt wurden. Nach Aussaat der definierten Zellzahl in Nährmedium in die entsprechende Wellplatten wurden HepG2-Zellen 24h, pRH lediglich 3 h anwachsen lassen (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit). Wurden die Zellen im Anschluss von verbrauchtem Medium befreit und mit PBS gewaschen, konnte die Inkubation durch Zugabe der Inkubationslösung gestartet werden. Die Testkonzentrationen und Kontrollen wurden als Duplikate oder Triplikate randomisiert über die Wellplatte angeordnet, um gerätespezifische Messschwankungen auszuschließen. Als Leerwert wurden Wells ohne Zellen mitgeführt. Die Inkubation der Zellen im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) fand über 1, 6, 18, 24 oder 48 h statt.

Resazurin-Reduktions-Assay

Nach Absaugung der Inkubationslösungen und Waschen der Zellen mit PBS, wurde abhängig vom Wellplattenformat (Tab. 75) je Well 500 µL, bzw. 1 mL Resazurin-GL aufgegeben (Tab. 75). Es bedurfte einer weiteren 1-stündigen Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit). Schließlich wurde mittels fluorimetrischer Messung am Photometer ($\lambda_{\text{Anregung}} = 544 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{Emission}} = 590$) die Zellvitalität semi-quantitativ bestimmt. Als relative Vitalität [%] wurde unter Abzug des Leerwerts der Messwert der Probe in Relation zur Negativkontrolle (mit ebenfalls subtrahiertem Leerwert) in Prozent angegeben.

6.8.4. Inkubation pRH mit MF und AcA zur Bestimmung der Adduktbildung

Basierend auf den Ergebnissen zur Zytotoxizität wurden folgende Metabolismus-Studien in pRH durchgeführt. Dafür wurden frisch isolierte pRH mit MF oder AcA inkubiert, um Muster der möglichen Adduktbildung miteinander zu vergleichen. Nach Inkubation wurde zum einen der Zellüberstand mittels SPE aufgearbeitet, um ihn mit zuvor etablierten Methoden gezielt auf Aminosäure-Addukte zu untersuchen. Zum anderen wurde die DNA aus den Zellen isoliert, hydrolysiert und auf die *in chemico* identifizierten Addukte von AcA mit Nukleosiden geprüft. Vorversuche zur Methodenetablierung wurden mit einem Stichprobenumfang von $n = 2-3$ durchführt, während die endgültigen Hauptuntersuchungen einen unabhängigen Stichprobenumfang von $n = 3-6$ aufwiesen.

Chemikalien und Lösungen

Tab. 76: Chemikalien und Lösungen für die Inkubation. Lagerung bei 4 °C.

Lösung	Zusammensetzung
PBS	siehe Chemikalien und Lösungen Tab. 71
Nährmedium	500 mL DMEM <i>low glucose</i> 56 mL FKS 5,6 mL Pen/Strep

Die SL und ZV der Testsubstanzen MF und AcA wurden in DMSO angesetzt, da sie sich in diesem Lösungsmittel als stabil erwiesen. Die Konzentrationen der SL von MF betragen 2 M (10 µL Standard mit 45,78 µL DMSO) und 1 M (50 µL SL_{2 M} *ad* 100 µL DMSO). Für die ZV von AcA wurden SL von 1 M (8,8 µL Standard mit 91,2 µL DMSO) und 10 µM (10 µL SL_{1 M} *ad* 1000 µL DMSO) gewählt. Dabei wurden ZV 1000-fach konzentriert zur Endkonzentration angesetzt, sodass die IL aus 1 µL ZV *ad* 1 mL Nährmedium hergestellt wurde. Als Negativkontrolle wurde entsprechend eine Endkonzentration von 0,1 % DMSO eingesetzt. Um DNA unbehandelter pRH zu gewinnen, wurden Proben ohne Zugaben zum Nährmedium mitgeführt.

Tab. 77: Konzentrationsreihe von MF und AcA für Inkubationen der pRH. AcA: 3-Acetylacrolein, MF: 2-Methylfuran, pRH: primäre Rattenhepatozyten, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung.

Ansatz der Zwischenverdünnungen						
Test-substanz	c(Inkubation) [µM]	c(ZV) [mM]	VF aus SL	c(SL) [mM]	V(SL) [µL]	V(DMSO) [µL]
MF	1000	1000	0,5	2000	10	10
	500	500	0,5	1000	10	10
	100	100	0,1	1000	10	90
	50	50	0,05	1000	10	190
	10	10	0,01	1000	10	990
AcA	5	5	0,005	1000	5	995
	1	1	0,1	10	10	90
	0,5	0,5	0,05	10	10	190
	0,1	0,1	0,01	10	10	990

Inkubation pRH

Um ein Anwachsen der pRH zu ermöglichen, mussten die zu verwendenden Zellkulturschalen (100 mm) gleichmäßig mit Kollagenlösung (0,5 g Kollagen/1 L 0,1%ige Essigsäure, siehe Tab. 73) benetzt und über Nacht getrocknet werden. Die frisch isolierten pRH wurden mit Nährmedium auf 1 Mio Zellen/mL verdünnt und 7 mL Zellsuspension je kollagenierter 100 mm-Schale ausgesät. Nach dreistündigem Anwachsen der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und mit Zugabe von 7 mL IL/Zellkulturschale (100 mm) die Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) gestartet. Je Testkonzentration wurden zwei Zellkulturschalen (100 mm) pro Stichprobe vorbereitet, um eine ausreichende Ausbeute an DNA und Zellüberstand garantieren zu können. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 1, 6, 18, 24 oder 48 h wurde der Zellüberstand in 15 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Proben wurden hierzu auf Eis gehalten und im Anschluss bei –80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung (Kap. 6.8.5, 6.8.6) aufbewahrt.

Zum Erhalt unbehandelter DNA aus pRH (für spätere Inkubationen von isolierter DNA) wurden Proben nach dem dreistündigen Anwachsen vom Nährmedium befreit, mit PBS gewaschen und direkt bei –80 °C bis zur DNA-Isolierung gelagert.

6.8.5. Aminosäure-Addukte in Zellüberständen pRH

In Zellüberständen pRH, welche mit MF oder AcA inkubiert wurden, sollte gezielt nach den Aminosäure-Addukten AcLys-AcA und AcCys-AcA gescreent werden. Vorversuche ($n = 2-3$) mit den in Kap. 6.5.2 etablierten Methoden (Methode I für AcLys-AcA) veranlasste die Methodenentwicklung von AcLys-AcA am sensitiveren Gerät als Methode II in Kap. 6.5.2.3 beschrieben. In der Hauptuntersuchung wurden die Proben frisch inkubierte pRH ($n = 3$) auf die Bildung von AcLys-AcA mit Methode I und II sowie AcCys-AcA vermessen.

Als interner Standard wurde AcLys-BDA mit einer Endkonzentration von 1 µM in den zu vermessenden Proben eingesetzt.

Die SPE-Methode wurde nach Jonathan I. Kremer (in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Richling, TU Kaiserslautern, unpublizierte Daten) modifiziert.

Chemikalien und Lösungen

Tab. 78: Lösungen und Ansätze für die Probenaufarbeitung von Aminosäure-Addukte in Zellüberstände pRH. Lagerung der Puffer bei 4 °C.

Lösung	Zusammensetzung
Ammoniumformiat-Puffer, 100 mM	1,5764 g NH ₄ (HCOOH) ad 100 mL H ₂ O; mit NH ₃ auf pH 10 titriert
Ammoniumcitrat-Puffer, 200 mM	4,2028 g Zitronensäure-Monohydrat ad 100 mL H ₂ O; mit NH ₃ auf pH 6,4 titriert
Elutions-Puffer	100 mL Ammoniumformiat-Puffer 100 mL MeCN

Als spezifisches Verbrauchsmaterial wurde die SPE-Säule Chromabond HR-XA (200 mg, 3 mL, Macherey-Nagel) zur Probenaufarbeitung der Zellüberstände behandelter pRH bei gleichzeitiger Aufkonzentrierung der Testsubstanzen verwendet.

Probenaufarbeitung

Basierend auf den Vorversuchen wurde das eingesetzte Probenvolumen auf die zu erwartende Adduktmenge angepasst. Der daher variierende Einsatz von 4, 6 oder 8 mL Zellüberstand wurde bei den entsprechenden Volumina an Puffern sowie als Faktor bei Berechnung der Gehalte linear berücksichtigt.

Zur Vorbereitung wurde die SPE-Säule mit 3 mL MeCN konditioniert sowie 3 mL Ammoniumformiat-Puffer equilibriert. Der Probenansatz aus 4–8 mL Zellüberstand, 4–8 mL Ammoniumformiat-Puffer und 10 µL IS (100 µM) wurde auf die Säule aufgetragen und im Anschluss mit 3 mL Ammoniumformiat-Puffer gewaschen. Die Elution der Testsubstanzen erfolgte durch Zugabe von 5 mL Elutions-Puffer. Der Nachspülschritt mit 3 mL MeCN wurde dabei nicht aufgefangen. Das Eluat wurde in einer Vakuumzentrifuge (20 mbar, 1400 rpm, Raumtemperatur) eingengt, mit 50 µL Ameisensäure (100 %) angesäuert und auf 1 mL H₂O aufgefüllt in ein 1,5 mL-Vial überführt.

Messung

Der Gehalt an AcLys-AcA wurde im Vorversuch ($n = 2-3$) und Hauptversuch ($n = 3$) zunächst mit Methode I an der HPLC-MS/MS 3200er vermessen. Zusätzlich wurden die Proben des Hauptversuchs mit der weiterentwickelten Methode II am sensitivieren UHPLC-ESI⁺-MS/MS (System III; API 5500) bestimmt ($n = 3-6$). Die Bildung von AcCys-AcA wurde mit entsprechender Methode in Kap. 6.5.2.2 im Vor- und Hauptversuch getestet.

Methodenvalidierung

Zur Bestimmung der Wiederfindung von **AcLys-AcA** in Zellüberständen nach Aufarbeitung mittels SPE (Kap. 6.8.5) wurden Analytkonzentrationen von 10, 40, 50 und 60 nM gewählt. Sie spiegeln die durchschnittlich zu erwartenden Konzentrationen (80 %, 100 %, 120 %), bekannt aus den Vorversuchen, sowie die Grenzbetrachtung wider. Die Wiederfindungsrate betrug $81,2 \pm 3,9$ %.

Die Wiederfindungsrate von **AcCys-AcA** in Zellüberständen betrug durchschnittlich $77,9 \pm 5,8$ % nach der Aufarbeitung mittels SPE (Kap. 6.8.5). Auch hier wurden Konzentration von 10, 40, 50 und 60 nM AcCys-AcA eingesetzt. Die niedrigste getestete Konzentration von 10 nM AcCys-AcA mit einer Wiederfindungsrate von $77,9 \pm 1,8$ % kann hier als Bestimmungsgrenze von AcCys-AcA in Zellüberständen herangezogen werden.

Messtechnische Validierungsparameter beider Analyten sind in Tab. 39 (AcCys-AcA), bzw. Tab 48 (AcLys-AcA) zusammengefasst.

6.8.6. DNA-Addukte in pRH

Die mit MF oder AcA inkubierten pRH ($n = 3$) wurden bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Der erste Schritt, die Isolierung der DNA, bestand aus alkalischer Lyse der Zellen sowie Aufreinigung der DNA. Die darauffolgende enzymatische Hydrolyse diente dem Freisetzen der Nukleoside, um gebildete Nukleosid-Addukte mittels UHPLC-MS/MS zu vermessen.

Proben unbehandelter pRH zum Erhalt von isolierter DNA wurden bis inklusive der DNA-Isolierung mitgeführt, sodass mit eingestelltem DNA-Gehalt wie im Folgenden beschrieben fortgeföhren werden konnte.

Die DNA wurde mittels Phenol-Chloroform-Exktration aus Zellen isoliert (Worner und Schrenk, 1996) und deren Gehalt sowie Reinheit photometrisch (NanoDrop™) bestimmt. Die enzymatische Hydrolyse der DNA wurde nach (Schumacher *et al.*, 2013) durchgeföhrt.

Chemikalien und Lösungen

Tab. 79: Lösungen für die Isolierung von DNA aus Zellen. Lagerung der aliquotierten Enzyme bei -20 °C , aller anderen Puffer und Lösungen bei 4 °C .

Lösung	Zusammensetzung
TAE-Puffer	4,844 g Tris 186 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{ H}_2\text{O}$ 1,144 mL Essigsäure, 100 % <i>ad</i> 1 L H_2O ; auf pH 8,3 titriert
SDS-Lösung, 10 %	4 g SDS <i>ad</i> 40 mL H_2O
Triton-Lösung, 10%	2 mL Triton-X-100 18 mL H_2O
Lysepuffer	400 mL TAE-Puffer 40 mL SDS-Lösung, 10 % 20 mL Triton-Lösung, 10 %
Proteinkinase K	10 mg/mL H_2O sterilfiltriert
RNase A	10 mg/mL H_2O sterilfiltriert
Extraktionslösung 1	25 mL Roti®-Phenol 24 mL Chloroform 1 mL Isoamylalkohol
Extraktionslösung 2	24 mL Chloroform 1 mL Isoamylalkohol
Natriumacetat-Lösung, 3 M	24,6103 g Natriumacetat <i>ad</i> 100 mL H_2O
Ethanol, 70 %	35 mL Ethanol <i>ad</i> 50 mL H_2O
Ethanol, 100 %	
Isopropanol, 100 %	

Tab. 80: Lösungen für die enzymatische Hydrolyse von DNA. Lagerung der aliquotierten Enzyme bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, Puffer und weiteres bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Lösung	Zusammensetzung
Succinat-Puffer	6,75 g Dinatriumsuccinat \cdot 6 H ₂ O (EK: 100 mM) 1,8378 g CaCl ₂ \cdot 2 H ₂ O (EK: 50 mM) <i>ad</i> 250 mL H ₂ O; auf pH 6,0 titriert; sterilfiltrieren
Tris-Puffer 0,5 M	6,06 g <i>ad</i> 100 mL H ₂ O; auf pH 10,8 titriert
Storage-Puffer	157,56 mg Tris-HCl; pH 8,2 (EK: 10 mM) 372,75 mg KCl (EK: 50 mM) 9,52 mg MgCl ₂ (EK: 1 mM) 1,36 mg ZnCl ₂ (EK: 0,1 mM) 50 mL Glycerol <i>ad</i> 100 mL H ₂ O
Mikrokokkale Nuklease	200 mU/ μ L 0,1 % BSA
Phosphodiesterase II	5 mU/ μ L H ₂ O
alkalische Phosphatase	1 mU/ μ L Storage-Puffer
Methanol 75 %	7,5 mL Methanol (LC/MS Grade) <i>ad</i> 20 mL H ₂ O
Ethanol 100 %	

DNA-Isolierung

Die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Zellkulturschalen (100 mm) gelagerten pRH wurden auf Eis angetaut, mit 800 μ L Lysepuffer via Zellschaber gelöst und in ein 2 mL-Reaktionsgefäß mit 15 μ L vorgelegter Proteinkinase-K-Lösung überführt. Die Probe wurde mit Zugabe von 5 μ L RNase-Lösung vorsichtig durchmischt, um 4 h bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Schüttelinkubator zu lysieren. Das auf Raumtemperatur abgekühlte Lysat wurde mit 0,9 mL Extraktionslösung 1 für 10 s gevortext. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (14 000 rpm, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, mit Bremse) und der wässrige Überstand in ein neues 2 mL-Reaktionsgefäß gegeben. Die Inkubation mit 5 μ L RNase-Lösung wurde 20 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Die zweite Extraktion mit 0,8 mL Extraktionslösung 2 wurde ebenfalls 10 s gevortext und zentrifugiert (14 000 rpm, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, mit Bremse), um den wässrige Überstand erneut in ein frisches 2 mL-Reaktionsgefäß zu geben. Zum Entfernen von organischen Resten wurde die Probe mit 1,2 mL Ethanol (100 %, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) leicht schwenkend gefällt, wodurch die DNA als feine, weiße Fäden sichtbar sedimentierte. Nach Zentrifugation (15 000 rpm, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) und restlosem Verwurf des Überstands wurde das DNA-Pellet in 250 μ L autoklaviertem H₂O erneut gelöst. Die zweite Fällung wurde durch Ergänzung von 50 μ L Natriumacetat-Lösung (3 M) und 500 μ L Isopropanol (100 %, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) erreicht. Die Probe wurde erneut zentrifugiert (15 000 rpm, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) sowie der Überstand verworfen, um die DNA mit Ethanol (70 %, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) zu waschen. Zum Erhalt der gereinigten DNA wurde diese zentrifugiert (15 000 rpm, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 50 μ L autoklaviertem H₂O homogen gelöst.

Wenn nicht anders für enzymatische Inkubationen oder Lysen vermerkt, erwies es sich als vorteilhaft auf Eis zu arbeiten. So konnte während der Extraktion eine scharfe Phasentrennung auch bei größerer Probenanzahl mit längeren Standzeiten erhalten bleiben und eine klare Fällung der DNA erfolgen. Bei unvollständiger Fällung wurde durch Lagerung der Probe bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht, Erhöhung des Anteils an organischem Lösungsmittel und Zugabe von zusätzlicher Natriumacetat-Lösung (3 M) die Fällung der DNA ermöglicht.

Der DNA-Gehalt wurde photometrisch (NanodropTM) bei $\lambda_{\text{Absorption}} = 260\text{ nm}$ als $\text{ng}/\mu\text{L}$ bestimmt. Zwei Absorptionsverhältnisse ermöglichten die Reinheit der Probe hinsichtlich organischer Reste wie auch RNA zu prüfen. Der $_{,260/280'}$ -Wert, sprich $\lambda_{\text{Absorption}}(260\text{ nm})/\lambda_{\text{Absorption}}(280\text{ nm})$, sollte bei 1,8–1,85 liegen, während das Absorptionsverhältnis von 260 nm zu 230 nm ($_{,260/230'}$) zwischen 1,8–2,2 als reine DNA angesehen wurde.

DNA-Hydrolyse

Je nach Menge an zu erwartenden DNA-Addukten wurde 30 μg oder 50 μg DNA in Lösung auf 135 μL mit H_2O in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß eingestellt. Für die Bestimmung mittels SIVA wurden als interner Standard jeweils $^{15}\text{N}_5$ -markiertes dA-AcA und dG-AcA von 0,75 nM; bzw. 5 nM (5 μL der jeweils 10-fach konzentrierten SL) der Probe zugegeben. Zudem wurde für die Bestimmung der Hydrolyserate über den dG-Gehalt als interner Standard $^{15}\text{N}_5$ -markiertes dG mit einer Endkonzentration von 20 μM (5 μL SL von 200 μM in H_2O) verwendet.

Für die enzymatische Hydrolyse der DNA wurden drei pH-abhängige Verdauungsenzyme zugegeben, deren Mengen entsprechend dem eingesetzten DNA-Gehalt in Tab. 81 aufgelistet sind.

Tab. 81: Enzyme und deren Mengen für die enzymatische Hydrolyse von DNA.

Enzym	c(SL) [mU/ μL]	Benötigte Menge Enzym mU/ μg DNA	Benötigte Menge Enzym	
			für 30 μg DNA	für 50 μg DNA
Mikrokokkale Nuklease	200	53	7,95 μL (1,59 U)	13,25 μL (2,65 U)
Phosphodiesterase II	5	2,1	12,6 μL (63 mU)	21 μL (105 mU)
Alkalische Phosphatase	1	0,6	18 μL (18 mU)	30 μL (30 mU)

Zu Beginn wurde die Probe mit 39 μL Succinat-Puffer und mikrokokkaler Nuklease (Tab. 81) für 24 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei 100 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden 93 μL Tris-Puffer in der Probe gründlich resuspendiert, sodass die Phosphodiesterase II und alkalische Phosphatase (Tab. 81) über Nacht ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 100 rpm) die DNA weiter abbauten. Am dritten Tag wurden die Proteine mittels 500 μL Ethanol (100 %, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) gefällt und die Probe zentrifugiert (20 800 g, 15 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Der Überstand wurde in einem neuen 1,5 mL-Reaktionsgefäß mittels Vakuumzentrifuge (20 mbar, 1400 rpm, Raumtemperatur) zur Entfernung des Ethanols und Wassers bis auf einen hoch viskosen Rückstand eingengt.

Messungen

Kurz vor Messung der Probe wurde der viskose Rückstand in 50 μL der initialen Fließmittelzusammensetzung (90 % MeCN; 0,1% Ameisensäure; in H_2O) resuspendiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (13 000 g, 20 min, 4 °C) und der Überstand in ein 1,5 mL-Vial mit 200 μL -Insert überführt. Gemessen wurden die Proben mit der in Kap. 6.5.2.4 etablierten UHPLC-ESI⁺-MS/MS-Methode zur Bestimmung der drei DNA-Addukte dA-AcA, dG-AcA sowie dC-AcA mittels SIVA.

Die Umrechnung des stoffmengenbezogenen Gehalts auf den Adduktgehalt pro 10^8 Nukleoside wurde über die in Kap. 6.5.2.5 beschriebene Methode der dG-Bestimmung ermöglicht.

Methodenvalidierung

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde jeweils dA-AcA, dG-AcA und dC-AcA in Konzentrationen von 1, 8, 10 und 12 nM (Grenzwert, 80 %, 100 %, 120 % durchschnittlich erwarteter Werte) Probenmatrix zugesetzt. Die aufdotierten Proben wurden ab der DNA-Hydrolyse zugeführt. Die Wiederfindungsrate betrug 100 ± 9 % für dA-AcA und 92 ± 4 % für dG-AcA. Die semiquantitativ bestimmte Wiederfindung von dC-AcA umfasst 114 %, gilt jedoch lediglich als Anhaltspunkt.

6.9. Statistik und mathematische Formeln

Statistisches Vorgehen und verwendete Bestimmungsmethode wurden bei den entsprechenden Ergebnissen (Kap. 4) vermerkt. Allgemein verwendete Tests sind im Folgenden kurz genannt (Gottwald, 2004).

Signifikanzen

Zur Ermittlung der Signifikanzen wurde der t-Test verwendet, falls die Daten normalverteilt vorlagen. Die dafür notwendige Bestimmung der Varianzdifferenz (zwei unabhängiger Proben) wurde mittels F-Test durchgeführt. Die folgende Nomenklatur wurde verwendet:

P < 0,05	*	signifikant
P < 0,01	**	sehr/hoch signifikant
P < 0,001	***	höchst signifikant

Zur Überprüfung der Daten auf Normalverteilung wurde der Anderson-Darling-Test verwendet.

Ausreißertest

Ausreißerverdächtige Werte wurden mittels dem Ausreißertest nach Nalimov untersucht.

Beurteilung von Regressionsgeraden

Neben Untersuchung der statistischen Verteilung der Residuen wurde die Reststandardabweichung (RestStabw) als Maß für die Streuung der Messwerte um die Kalibriergerade bestimmt. Mit n: Anzahl der Residuen, Res: Residuen.

$$\text{RestStabw} = \sqrt{\frac{1}{n-2} \cdot \sum (\text{Res})^2}$$

Die Verfahrensstandardabweichung (VerfahrensStabw) wurde als Maß für die Leistungsfähigkeit des Verfahrens bestimmt. Mit RestStabw: Reststandardabweichung und Steigung der Regressionsgeraden.

$$\text{VerfahrensStabw} = \frac{\text{RestStabw}}{\text{Steigung}}$$

Der Verfahrensvariationskoeffizient (VerfahrensVarK) wurde als Maß für die Präzision und Robustheit des Verfahrens ermittelt. Mit VerfahrensStabw: Verfahrensstandardabweichung, m_{Konz} : arithmetischer Mittelwert der Konzentrationen der Standardreihe.

$$\text{VerfahrensVarK} = \frac{\text{VerfahrensStabw}}{m_{\text{Konz}}} \cdot 100\%$$

Literaturverzeichnis

- Adams, A.; Borrelli, R. C.; Fogliano, V.; Kimpe, N. de (2005): Thermal degradation studies of food melanoidins. In: *J. Agric. Food Chem.* 53 (10), S. 4136–4142. DOI: 10.1021/jf047903m.
- Adams, A.; Bouckaert, C.; van Lancker, F.; Meulenaer, B. de; Kimpe, N. de (2011): Amino acid catalysis of 2-alkylfuran formation from lipid oxidation-derived α,β -unsaturated aldehydes. In: *J. Sci. Food Agric.* 59 (20), S. 11058–11062. DOI: 10.1021/jf202448v.
- Adam, W.; Bialas, J.; Hadjarapoglou, L. (1991): Kurzmitteilung / Short Communication A Convenient Preparation of Acetone Solutions of Dimethyldioxirane. In: *Chem. Ber.* 124 (10), S. 2377. DOI: 10.1002/cber.19911241036.
- Adger, B. M.; Barrett, C.; Brennan, J.; McKervey, M. A.; Murray, R. W. (1991): Oxidation of furans with dimethyldioxirane. In: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (21), S. 1553–1554. DOI: 10.1039/c39910001553.
- Aeschbacher, H. U.; Wolleb, U.; Löliger, J.; Spadone, J. C.; Liardon, R. (1989): Contribution of coffee aroma constituents to the mutagenicity of coffee. In: *Food and Chemical Toxicology* 27 (4), S. 227–232. DOI: 10.1016/0278-6915(89)90160-9.
- American Chemical Society (2017): Scifinder. 2-Methylfuran. Online verfügbar unter <https://scifinder.cas.org>. Zuletzt geprüft am 13.07.2021.
- Angerer, J. (2009): Biological Monitoring. Heutige und künftige Möglichkeiten in der Arbeits- und Umweltmedizin. 1., Auflage, neue Ausg. Weinheim: Wiley-VCH (Rundgespräche).
- Baek, S.-O.; Jenkins, R. A. (2004): Characterization of trace organic compounds associated with aged and diluted sidestream tobacco smoke in a controlled atmosphere—volatile organic compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Atmos. Environ.* 38 (38), S. 6583–6599. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2004.08.016.
- Baker, J.; Sifniades, S. (1979): Synthesis and properties of pyrrolin-2-ones. In: *J. Org. Chem.* 44 (15), S. 2798–2800.
- Basketter, D. A.; Lea, L. J.; Dickens, A.; Briggs, D.; Pate, I.; Dearman, R. J.; Kimber, I. (1999): A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. In: *J. Appl. Toxicol.* 19 (4), S. 261–266. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1263(199907/08)19:4<261::AID-JAT572>3.0.CO;2-5.
- Becalski, A.; Hayward, S.; Krakalovich, T.; Pelletier, L.; Roscoe, V.; Vavasour, E. (2010): Development of an analytical method and survey of foods for furan, 2-methylfuran and 3-methylfuran with estimated exposure. In: *Food Addit. Contam. - Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 27 (6), S. 764–775. DOI: 10.1080/19440040903473332.
- Becalski, A.; Halldorson, T.; Hayward, S.; Roscoe, V. (2016): Furan, 2-methylfuran and 3-methylfuran in coffee on the Canadian market. In: *J. Food Compost. Anal.* 47, S. 113–119. DOI: 10.1016/j.jfca.2016.01.006.
- Benford, D. J. (2016): The use of dose-response data in a margin of exposure approach to carcinogenic risk assessment for genotoxic chemicals in food. In: *Mutagenesis* 31 (3), S. 329–331. DOI: 10.1093/mutage/gev064.

- Bergmark, E.; Calleman, C. J.; He, F.; Costa, L. G. (1993): Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. In: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 120 (1), S. 45–54. DOI: 10.1006/taap.1993.1085.
- Boettcher, M. I.; Angerer, J. (2005): Determination of the major mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine by LC-ESI-MS/MS. In: *J. Chromatogr. B* 824 (1-2), S. 283–294. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.07.042.
- Byrns, M. C.; Predecki, D. P.; Peterson, L. A. (2002): Characterization of nucleoside adducts of cis-2-butene-1,4-dial, a reactive metabolite of furan. In: *Chem. Res. Toxicol.* 15 (3), S. 373–379. DOI: 10.1021/tx0101402.
- Byrns, M. C.; Vu, C. C.; Peterson, L. A. (2004): Determination of the role of DNA alkylation by cis-2-butene-1, 4-dial in furan-induced carcinogenesis. In: *Chem. Res. Toxicol.* (17), S. 1607–1613.
- Byrns, M. C.; Vu, C. C.; Neidigh, J. W.; Abad, J.-L.; Jones, R. A.; Peterson, L. A. (2006): Detection of DNA adducts derived from the reactive metabolite of furan, cis-2-butene-1,4-dial. In: *Chem. Res. Toxicol.* 19 (3), S. 414–420. DOI: 10.1021/tx050302k.
- Chen, L. J.; Hecht, S. S.; Peterson, L. A. (1995): Identification of cis-2-butene-1,4-dial as a microsomal metabolite of furan. In: *Chem. Res. Toxicol.* 8 (7), S. 903–906. DOI: 10.1021/tx00049a001.
- Chen, L. J.; Hecht, S. S.; Peterson, L. A. (1997): Characterization of amino acid and glutathione adducts of cis-2-butene-1,4-dial, a reactive metabolite of furan. In: *Chem. Res. Toxicol.* 10 (8), S. 866–874. DOI: 10.1021/tx9700174.
- Churchwell, M. I.; Scheri, R. C.; Tungeln, L. S. von; Gamboa da Costa, G.; Beland, F. A.; Doerge, D. R. (2015): Evaluation of serum and liver toxicokinetics for furan and liver DNA adduct formation in male Fischer 344 rats. In: *Food and Chemical Toxicology* 86, S. 1–8. DOI: 10.1016/j.fct.2015.08.029.
- Corma, A.; La Torre, O. de; Renz, M.; Villandier, N. (2011): Production of high-quality diesel from biomass waste products. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (10), S. 2375–2378. DOI: 10.1002/anie.201007508.
- Cramer, G. M.; Ford, R. A.; Hall, R. L. (1976): Estimation of toxic hazard—A decision tree approach. In: *Food Cosmet. Toxicol.* 16 (3), S. 255–276. DOI: 10.1016/S0015-6264(76)80522-6.
- Crews, C. (2009): Consumer exposure to furan from heat – processed food and kitchen air. In: *EFSA* 6 (9), 30E. DOI: 10.2903/sp.efsa.2009.EN-30.
- Dekant, W. (2017): Biotransformation von Fremdstoffen. In: Helmut Greim (Hg.): *Das Toxikologiebuch. Grundlagen, Verfahren, Bewertung.* Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, S. 65–110.
- Dey, A. (Hg.) (2013): Cytochrome P450 2E1. Its role in disease and drug metabolism. Unter Mitarbeit von Springer Verlag. Dordrecht (Subcellular Biochemistry, 67).
- Ding, W.; Petibone, D. M.; Latendresse, J. R.; Pearce, M. G.; Muskhelishvili, L.; White, G. A. et al. (2012): In vivo genotoxicity of furan in F344 rats at cancer bioassay doses. In: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 261 (2), S. 164–171. DOI: 10.1016/j.taap.2012.03.021.
- DMSZ (2017): Cell line: HepG2. Leipzig-Institut DMSZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Online verfügbar unter <https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-180.html>, zuletzt geprüft am 19.08.2017 um 17:30 Uhr.
- Dorne, J. L. C. M.; Walton, K.; Renwick, A. G. (2005): Human variability in xenobiotic metabolism and pathway-related uncertainty factors for chemical risk assessment: a review. In: *Food Chem. Toxicol.* 43 (2), S. 203–216. DOI: 10.1016/j.fct.2004.05.011.

- Eberle, G.; Barbin, A.; Laib, R. J.; Ciroussel, F.; Thomale, J.; Bartsch, H.; Rajewsky, M. F. (1989): 1,N6-etheno-2'-deoxyadenosine and 3,N4-etheno-2'-deoxycytidine detected by monoclonal antibodies in lung and liver DNA of rats exposed to vinyl chloride. In: *Carcinogenesis* 10 (1), S. 209–212. DOI: 10.1093/carcin/10.1.209.
- ECHA, E. C. A. (2017): Read-Across Assessment Framework (RAAF). Online verfügbar unter https://www.echa.europa.eu/documents/10162/13628/raaf_en.pdf, zuletzt geprüft am 08.07.2021.
- Elder, L.; Poirier, K.; Dourson, M.; Kleiner, J.; Mileson, B.; Nordmann, H. et al. (2002): Mathematical modelling and quantitative methods. In: *Food Chem. Toxicol.* 40 (2-3), S. 283–326. DOI: 10.1016/S0278-6915(01)00116-8.
- Egle, J. L.; Gochberg, B. J. (1979): Retention of inhaled 2-methylfuran and 2,5-dimethylfuran. In: *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 40 (10), S. 866–869. DOI: 10.1080/15298667991430415.
- Eisenbrand, G.; Metzler, M.; Hennecke, F. J. (2005): Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner: Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren. Weinheim: Wiley-VCH.
- Elmore, J. S.; Mottram, D. S.; Enser, M.; Wood, J. D. (1999): Effect of the polyunsaturated fatty acid composition of beef muscle on the profile of aroma volatiles. In: *J. Agric. Food Chem.* 47 (4), S. 1619–1625. DOI: 10.1021/jf980718m.
- Emery, M. G.; Fisher, J. M.; Chien, J. Y.; Kharasch, E. D.; Dellinger, E. P.; Kowdley, K. V.; Thummel, K. E. (2003): CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. In: *Hepatology* 38 (2), S. 428–435. DOI: 10.1053/jhep.2003.50342.
- European Food Safety Authority (2005): Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to A Harmonised Approach for Risk Assessment of Substances Which are both Genotoxic and Carcinogenic. In: *EFSA* 3 (10), S. 282. DOI: 10.2903/j.efsa.2005.282.
- Evans, W. E.; Relling, M. V. (1999): Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. In: *Science* 286 (5439), S. 487–491. DOI: 10.1126/science.286.5439.487.
- Filipiak, W.; Ruzsanyi, V.; Mochalski, P.; Filipiak, A.; Bajtarevic, A.; Ager, C. et al. (2012): Dependence of exhaled breath composition on exogenous factors, smoking habits and exposure to air pollutants. In: *J. Breath Res.* 6 (3), S. 36008. DOI: 10.1088/1752-7155/6/3/036008.
- Fromberg, A.; Mariotti, M. S.; Pedreschi, F.; Fagt, S.; Granby, K. (2014): Furan and alkylated furans in heat processed food, including home cooked products. In: *Czech J. Food Sci.* (32), S. 443–448.
- Fry, J. R.; Garle, M. J.; Hammond, A. H. (1990): Competing pathways in metabolism-mediated cytotoxicity in vitro. In: *Toxicol. In Vitro* 4 (4-5), S. 467–473. DOI: 10.1016/0887-2333(90)90102-Y.
- Gates, L. A.; Lu, D.; Peterson, L. A. (2012): Trapping of cis-2-butene-1,4-dial to measure furan metabolism in human liver microsomes by cytochrome P450 enzymes. In: *Drug Metab. Dispos.* 40 (3), S. 596–601. DOI: 10.1124/dmd.111.043679.
- Gates, L. A.; Phillips, M. B.; Matter, B. A.; Peterson, L. A. (2014): Comparative metabolism of furan in rodent and human cryopreserved hepatocytes. In: *Drug Metab. Dispos.* 42 (7), S. 1132–1136. DOI: 10.1124/dmd.114.057794.
- Gestis-Stoffdatenbank (2021): Furfurylalkohol. Sorbe "Sicherheitstechnische Kenndaten chemischer Stoffe" ("Safety-related characteristics of chemical substances"), sicherheitsNet.de, Landsberg. Hg. v. Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung. Online verfügbar unter <https://gestis.dguv.de/data?name=027380>, zuletzt geprüft am 18.10.2021.

- Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. (1999): A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. In: *J. Comb. Chem.* 1 (1), S. 55–68. DOI: 10.1021/cc9800071.
- Gill, S. S.; Kavanagh, M.; Cherry, W.; Barker, M.; Weld, M.; Cooke, G. M. (2014): A 28-day gavage toxicity study in male Fischer 344 rats with 2-methylfuran. In: *Toxicol. Pathol.* 42 (2), S. 352–360. DOI: 10.1177/0192623313482526.
- Glatt, H.; Schneider, H.; Murkovic, M.; Monien, B. H.; Meinel, W. (2012): Hydroxymethyl-substituted furans: mutagenicity in *Salmonella typhimurium* strains engineered for expression of various human and rodent sulphotransferases. In: *Mutagenesis* 27 (1), S. 41–48. DOI: 10.1093/mutage/ger054.
- Gottwald, Wolfgang (2004): Statistik für Anwender. [2. Nachdr.]. Weinheim, Berlin: Wiley-VCH (Die Praxis der instrumentellen Analytik).
- Gstraunthaler, Gerhard; Lindl, Toni (2021): Zell- und Gewebekultur. Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. 8. Aufl. 2021. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Habibi, H.; Mohammadi, A.; Hoseini, H.; Mohammadi, M.; Azadniya, E. (2013): Headspace liquid-phase Microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for determination of furanic compounds in baby foods and method optimization using response surface methodology. In: *Food Anal. Methods* 6 (4), S. 1056–1064. DOI: 10.1007/s12161-012-9510-7.
- Hammond, A. H.; Fry, J. R. (1991): The use of hepatocytes cultured from inducer-treated rats in the detection of cytochrome P-450-mediated cytotoxicity. In: *Toxicol. In Vitro* 5 (2), S. 133–137. DOI: 10.1016/0887-2333(91)90033-A.
- Hart, S. N.; Li, Y.; Nakamoto, K.; Subileau, E.; Steen, D.; Zhong, X. (2010): A comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues. In: *Drug Metab. Dispos.* 38 (6), S. 988–994. DOI: 10.1124/dmd.109.031831.
- Hecht, S. S.; Ruth Young-Sciame; Fung Lung Chung (1992): Reaction of alpha.-acetoxy-N-nitrosopiperidine with deoxyguanosine: oxygen-dependent formation of 4-oxo-2-pentenal and a 1, N2-ethenodeoxyguanosine adduct. In: *Chem. Res. Toxicol.* 5 (5), S. 706–712.
- Heit, C.; Dong, H.; Chen, Y.; Thompson, D. C.; Deitrich, R. A.; Vasiliou, V. K. (2013): The Role of CYP2E1 in Alcohol Metabolism and Sensitivity in the Central Nervous System. In: A. Dey (Hg.): *Cytochrome P450 2E1. Its role in disease and drug metabolism*, Bd. 67. Unter Mitarbeit von Springer Verlag. Dordrecht (Subcellular Biochemistry, 67), S. 235–247.
- Høie, A. H.; Monien, B. H.; Sakhi, A. K.; Glatt, H.; Hjertholm, H.; Husøy, T. (2015a): Formation of DNA adducts in wild-type and transgenic mice expressing human sulfotransferases 1A1 and 1A2 after oral exposure to furfuryl alcohol. In: *Mutagenesis* 30 (5), S. 643–649. DOI: 10.1093/mutage/gev023.
- Høie, A. H.; Svendsen, C.; Brunborg, G.; Glatt, H.; Alexander, J.; Meinel, W.; Husøy, T. (2015b): Genotoxicity of three food processing contaminants in transgenic mice expressing human sulfotransferases 1A1 and 1A2 as assessed by the in vivo alkaline single cell gel electrophoresis assay. In: *Environ. Mol. Mutagen.* 56 (8), S. 709–714. DOI: 10.1002/em.21963.
- Høie, A. H.; Svendsen, C.; Rasmussen, T.; Alexander, J.; Husøy, T. (2016): Intestinal Tumor Development in C57BL/6J-ApcMin/+ Mice Expressing Human Sulphotransferases 1A1 and 1A2 After Oral Exposure to 2,5-Dimethylfuran. In: *Anticancer Res.* 36 (2), S. 545–553.
- Hoydonckx, H. E.; van Rhijn, W. M.; van Rhijn, W.; Vos, D. E. de; Jacobs, P. A. (2012): Furfural and Derivatives. In: *Ullmann's encycl. ind. chem.*, S. 285–313. DOI: 10.1002/14356007.a12_119.pub2.

- Huang, Y.-B.; Yang, Z.; Dai, J.-J.; Guo, Q.-X.; Fu, Y. (2012): Production of high quality fuels from lignocellulose-derived chemicals. A convenient C–C bond formation of furfural, 5-methylfurfural and aromatic aldehyde. In: *RSC Adv.* 2 (30), S. 11211–11214. DOI: 10.1039/C2RA22008C.
- Hu, C.; Li, R.; Wang, J.; Liu, Y.; Wang, J.; Sun, B. (2021): Untargeted metabolite profiling of liver in mice exposed to 2-methylfuran. In: *J. Food Sci.* 86 (1), S. 242–250. DOI: 10.1111/1750-3841.15549.
- Hudzik, J. M.; Bozzelli, J. W. (2017): Thermochemistry of Hydroxyl and Hydroperoxide Substituted Furan, Methylfuran, and Methoxyfuran. In: *J. Phys. Chem. A* 121 (23), S. 4523–4544. DOI: 10.1021/acs.jpca.7b02343.
- Huffman, M. P.; Høie, A. H.; Svendsen, C.; Brunborg, G.; Murkovic, M.; Glatt, H.; Husøy, T. (2016): An in vitro study on the genotoxic effect of substituted furans in cells transfected with human metabolizing enzymes. 2,5-dimethylfuran and furfuryl alcohol. In: *Mutagenesis* 31 (5), S. 597–602. DOI: 10.1093/mutage/gew025.
- Huo, J.; Liu, Y.; Zeng, Z.; Zhu, X.; Peng, Z.; Chen, J.; Zhang, L. (2019): Assessment of the genotoxicity of 2-methylfuran based on a multi-endpoint genotoxicity test system in vivo. In: *Am. J. Hyg.* 6 (48), S. 976–1000.
- Huo, J.; Liu, Y.; Zhu, X.; Zeng, Z.; Chen, Y.; Li, R. et al. (2020): 2-Methylfuran: Toxicity and genotoxicity in male Sprague-Dawley rats. In: *Mutation research* 854-855, S. 503209. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2020.503209.
- Jakubke, Hans-Dieter; Jeschkeit, Hans (1982): Aminosäuren, Peptide, Proteine. Weinheim: Verl. Chemie.
- Jarabek, A. M.; Pottenger, L. H.; Andrews, L. S.; Casciano, D.; Embry, M. R.; Kim, J. H. et al. (2009): Creating context for the use of DNA adduct data in cancer risk assessment: I. Data organization. In: *Crit. Rev. Toxicol.* 39 (8), S. 659–678. DOI: 10.1080/10408440903164155.
- Jia, W.-H.; Pan, Q.-H.; Qin, H.-D.; Xu, Y.-F.; Shen, G.-P.; Chen, L. et al. (2009): A case-control and a family-based association study revealing an association between CYP2E1 polymorphisms and nasopharyngeal carcinoma risk in Cantonese. In: *Carcinogenesis* 30 (12), S. 2031–2036. DOI: 10.1093/carcin/bgp239.
- Jochum, T. (2020): Untersuchungen zur DNA-schädigenden Wirkung von 2-Methylfuran, 2,5-Dimethylfuran und Furfurylalkohol. Masterarbeit. Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern.
- Kächele, M.; Monakhova, Y. B.; Kuballa, T.; Lachenmeier, D. W. (2014): NMR investigation of acrolein stability in hydroalcoholic solution as a foundation for the valid HS-SPME/GC-MS quantification of the unsaturated aldehyde in beverages. In: *Anal. Chim. Acta* 820, S. 112–118. DOI: 10.1016/j.aca.2014.02.030.
- Kawai, Y.; Uchida, K.; Osawa, T. (2004): 2'-deoxycytidine in free nucleosides and double-stranded DNA as the major target of lipid peroxidation products. In: *Free Radic. Biol. Med.* 36 (5), S. 529–541. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.12.006.
- Kawai, Y.; Nuka, E. (2018): Abundance of DNA adducts of 4-oxo-2-alkenals, lipid peroxidation-derived highly reactive genotoxins. In: *J. Clin. Biochem. Nutr.* 62 (1), S. 3–10. DOI: 10.3164/jcbrn.17-90.
- Kim, J.-H.; Cheong, H. S.; Park, B. L.; Kim, L. H.; Shin, H. J.; Na, H. S. et al. (2015): Direct sequencing and comprehensive screening of genetic polymorphisms on CYP2 family genes (CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, and CYP2E1) in five ethnic populations. In: *Arch. Pharm. Res.* 38 (1), S. 115–128. DOI: 10.1007/s12272-014-0348-y.
- Knutsen, H. K.; Alexander, J.; Barregård, L.; Bignami, M.; Brüschweiler, B.; Ceccatelli, S. et al. (2017): Risks for public health related to the presence of furan and methylfurans in food. In: *EFSA J.* 15 (10), S. 11058. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.5005.

- Kroes, R.; Kleiner, J.; Renwick, A. (2005): The threshold of toxicological concern concept in risk assessment. In: *Toxicol. Sci.* 86 (2), S. 226–230. DOI: 10.1093/toxsci/kfi169.
- Kunz, C.; Saito, Y.; Schär, P. (2009): DNA Repair in mammalian cells: Mismatched repair: variations on a theme. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (6), S. 1021–1038. DOI: 10.1007/s00018-009-8739-9.
- Lieber, C. S. (1997): Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role. In: *Physiol. Rev.* 77 (2), S. 517–544. DOI: 10.1152/physrev.1997.77.2.517.
- Limacher, A.; Kerler, J.; Conde-Petit, B.; Blank, I. (2007): Formation of furan and methylfuran from ascorbic acid in model systems and food. In: *Food Addit. Contam.* 24 Suppl 1, S. 122–135. DOI: 10.1080/02652030701393112.
- Limacher, A.; Kerler, J.; Davidek, T.; Schmalzried, F.; Blank, I. (2008): Formation of furan and methylfuran by maillard-type reactions in model systems and food. In: *J. Agric. Food Chem.* 56 (10), S. 3639–3647. DOI: 10.1021/jf800268t.
- Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. (1997): Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. In: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23 (1-3), S. 3–25. DOI: 10.1016/S0169-409X(96)00423-1.
- Liu, Z.; Young-Sciame, R.; Hecht, S. S. (1996): Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric detection of an ethenodeoxyguanosine adduct and its hemiaminal precursors in DNA reacted with alpha-acetoxy-N-nitrosopiperidine and cis-4-Oxo-2-pentenal. In: *Chem. Res. Toxicol.* 9 (4), S. 774–780. DOI: 10.1021/tx950206r.
- Louis, K. S.; Siegel, A. C. (2011): Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. In: *Methods mol. biol.* 740, 2011, S. 7–12.
- Luo, G.; Cunningham, M.; Kim, S.; Burn, T.; Lin, J.; Sinz, M. et al. (2002): CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. In: *Drug Metab. Dispos.* 30 (7), S. 795–804. DOI: 10.1124/dmd.30.7.795.
- Märk, J.; Pollien, P.; Lindinger, C.; Blank, I.; Märk, T. (2006): Quantitation of furan and methylfuran formed in different precursor systems by proton transfer reaction mass spectrometry. In: *J. Agric. Food Chem.* 54 (7), S. 2786–2793. DOI: 10.1021/jf052937v.
- Marques, S. A.; Loureiro, A. P. M.; Gomes, O. F.; Garcia, C. C.; Di Mascio, P.; Medeiros, M. H. (2004): Induction of 1, N2 -etheno-2'-deoxyguanosine in DNA exposed to β -carotene oxidation products. In: *FEBS Lett.* 560 (1-3), S. 125–130. DOI: 10.1016/S0014-5793(04)00084-5.
- Mochalski, P.; Unterkofler, K. (2016): Quantification of selected volatile organic compounds in human urine by gas chromatography selective reagent ionization time of flight mass spectrometry (GC-SRI-TOF-MS) coupled with head-space solid-phase microextraction (HS-SPME). In: *Analyst* 141 (15), S. 4796–4803. DOI: 10.1039/C6AN00825A.
- Monien, B. H.; Herrmann, K.; Florian, S.; Glatt, H. (2011): Metabolic activation of furfuryl alcohol. Formation of 2-methylfuran DNA adducts in *Salmonella typhimurium* strains expressing human sulfotransferase 1A1 and in FVB/N mice. In: *Carcinogenesis* 32 (10), S. 1533–1539. DOI: 10.1093/carcin/bgr126.
- Munro, I. C.; Ford, R. A.; Kennepohl, E.; Sprenger, J. G. (1996): Correlation of structural class with no-observed-effect levels: A proposal for establishing a threshold of concern. In: *Food Chem. Toxicol.* 34 (9), S. 829–867. DOI: 10.1016/S0278-6915(96)00049-X.
- Nedelcheva, V.; Gut, I.; Soucek, P.; Tichavská, B.; Týnkova, L.; Mráz, J. et al. (1999): Metabolism of benzene in human liver microsomes: individual variations in relation to CYP2E1 expression. In: *Arch. Toxicol.* 73 (1), S. 33–40. DOI: 10.1007/s002040050583.
- Nelson, David L.; Cox, Michael M. (2005): *Lehninger Biochemie. Mit 40 Tabellen. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl., 1. korrigierter Nachdr.* Berlin, Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).

- Nestmann, E. R.; Bryant, D. W.; Carr, C. J. (1996): Toxicological significance of DNA adducts: summary of discussions with an expert panel. In: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 24 (1 Pt 1), S. 9–18. DOI: 10.1006/rtph.1996.0059.
- Nuka, E.; Tomono, S.; Ishisaka, A.; Kato, Y.; Miyoshi, N.; Kawai, Y. (2016): Metal-catalyzed oxidation of 2-alkenals generates genotoxic 4-oxo-2-alkenals during lipid peroxidation. In: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80 (10), S. 2007–2013. DOI: 10.1080/09168451.2016.1191334.
- Onyango, A. N. (2012): Small reactive carbonyl compounds as tissue lipid oxidation products; and the mechanisms of their formation thereby. In: *Chem. Phys. Lipids* 165 (7), S. 777–786. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2012.09.004.
- Page, B.; Page, M.; Noel C. (1993): A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. In: *Int. J. Oncol.* 3 (3), S. 473–476. DOI: 10.3892/ijo.3.3.473.
- Palmen, N.; Evelo, C. (1996): Glutathione depletion in human erythrocytes and rat liver: a study on the interplay between bioactivation and inactivation functions of liver and blood. In: *Toxicol. In Vitro* 10 (3), S. 273–281. DOI: 10.1016/0887-2333(96)00002-1.
- Parmar, D.; Burka, L. T. (1993): Studies on the interaction of furan with hepatic cytochrome P-450. In: *J. Biochem. Toxicol.* 8 (1), S. 1–9. DOI: 10.1002/jbt.2570080103.
- Peterson, L. A.; Naruko, K. C.; Predecki, D. P. (2000): A reactive metabolite of furan, cis-2-butene-1,4-dial, is mutagenic in the Ames assay. In: *Chem. Res. Toxicol.* 13 (7), S. 531–534. DOI: 10.1021/tx000065f.
- Peterson, L. A.; Cummings, M. E.; Vu, C. C.; Matter, B. A. (2005): Glutathione trapping to measure microsomal oxidation of furan to cis-2-butene-1,4-dial. In: *Drug Metab. Dispos.* 33 (10), S. 1453–1458. DOI: 10.1124/dmd.105.004432.
- Peterson, L. A.; Cummings, M. E.; Chan, J. Y.; Vu, C. C.; Matter, B. A. (2006): Identification of a cis-2-butene-1,4-dial-derived glutathione conjugate in the urine of furan-treated rats. In: *Chem. Res. Toxicol.* 19 (9), S. 1138–1141. DOI: 10.1021/tx060111x.
- Petisca, C.; Pérez-Palacios, T.; Farah, A.; Pinho, O.; Ferreira, I. M. (2013): Furans and other volatile compounds in ground roasted and espresso coffee using headspace solid-phase microextraction: Effect of roasting speed. In: *Food Bioprod. Process.* 91 (3), S. 233–241. DOI: 10.1016/j.fbp.2012.10.003.
- Priest, S. M.; Geisbuhler, T. P. (2015): Injectable sodium pentobarbital: Stability at room temperature. In: *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 76, S. 38–42. DOI: 10.1016/j.vascn.2015.07.012.
- Raies, A. B.; Bajic, V. B. (2016): In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. In: *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 6 (2), S. 147–172. DOI: 10.1002/wcms.1240.
- Rampersad, S. N. (2012): Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. In: *Sensors (Basel, Switzerland)* 12 (9), S. 12347–12360. DOI: 10.3390/s120912347.
- Ravindranath, V.; Burka, L.; Boyd, M. (1984a): Reactive metabolites from the bioactivation of toxic methylfurans. In: *Science* 224 (4651), S. 884–886. DOI: 10.1126/science.6719117.
- Ravindranath, V.; Burka, L. T.; Boyd, M. R. (1984b): Syntheses of 2-([¹⁴C]methyl)furan and 4-oxo[5-¹⁴C]-2-pentenal. In: *J. Label Compd Radiopharm.* 21 (8), S. 713–718. DOI: 10.1002/jlcr.2580210804.
- Ravindranath, V.; Boyd, M. R. (1985): Metabolic activation of 2-methylfuran by rat microsomal systems. In: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 78 (3), S. 370–376. DOI: 10.1016/0041-008X(85)90242-X.

- Ravindranath, V.; McMenamin, J. H.; Dees, J. H.; Boyd, M. R. (1986): 2-Methylfuran toxicity in rats? Role of metabolic activation in vivo. In: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85 (1), S. 78–91. DOI: 10.1016/0041-008X(86)90389-3.
- Ravindranath, V.; Boyd, M. R. (1991): Effect of modulators of glutathione synthesis on the hepatotoxicity of 2-methylfuran. In: *Biochem. Pharmacol.* 41 (9), S. 1311–1318. DOI: 10.1016/0006-2952(91)90102-B.
- Rentel, C.; Wang, X.; Batt, M.; Kurata, C.; Oliver, J.; Gaus, H. et al. (2005): Formation of modified cytosine residues in the presence of depurinated DNA. In: *J. Org. Chem.* 70 (20), S. 7841–7845. DOI: 10.1021/jo050767f.
- Renwick, A.; Barlow, S.; Hertz-Picciotto, I.; Boobis, A.; Dybing, E.; Edler, L. et al. (2003): Risk characterisation of chemicals in food and diet. In: *Food Chem. Toxicol.* 41 (9), S. 1211–1271. DOI: 10.1016/s0278-6915(03)00064-4.
- Sachse, B.; Hielscher, J.; Lampen, A.; Abraham, K.; Monien, B. H. (2017): A hemoglobin adduct as a biomarker for the internal exposure to the rodent carcinogen furfuryl alcohol. In: *Arch. Toxicol.* 91 (12), S. 3843–3855. DOI: 10.1007/s00204-017-2005-y.
- Schmitz, Sabine (2009): *Der Experimentator: Zellkultur*. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verl. (Der Experimentator).
- Schumacher, F.; Herrmann, K.; Florian, S.; Engst, W.; Glatt, H. (2013): Optimized enzymatic hydrolysis of DNA for LC-MS/MS analyses of adducts of 1-methoxy-3-indolylmethyl glucosinolate and methyleugenol. In: *Anal. Biochem.* 434 (1), S. 4–11. DOI: 10.1016/j.ab.2012.11.001.
- Shen, M.; Liu, Q.; Jia, H.; Jiang, Y.; Nie, S.; Xie, J. et al. (2016): Simultaneous determination of furan and 2-alkylfurans in heat-processed foods by automated static headspace gas chromatography-mass spectrometry. In: *LWT - Food Sci. Tech.* 72, S. 44–54. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.04.030.
- Shimada, T.; Yamazaki, H.; Mimura, M.; Inui, Y.; Guengerich, F. P. (1994): Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. In: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270 (1), S. 414–423. Online verfügbar unter <https://jpet.aspetjournals.org/content/270/1/414.short>.
- Shimada, T.; Mimura, M.; Inoue, K.; Nakamura, S.; Oda, H.; Ohmori, S.; Yamazaki, H. (1997): Cytochrome P450-dependent drug oxidation activities in liver microsomes of various animal species including rats, guinea pigs, dogs, monkeys, and humans. In: *Arch. Toxicol.* 71 (6), S. 401–408. DOI: 10.1007/s002040050403.
- Shinohara, K.; Kim, E.; Omura, H. (1986): Furans as the mutagens formed by amino-carbonyl reactions. In: *Dev. Food Sci.* 13, S. 353–362. Online verfügbar unter <https://ci.nii.ac.jp/naid/10024585368/>.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D. et al. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: *Anal. Biochem.* 150 (1), S. 76–85. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Sperber, W. H. (2001): Hazard identification: from a quantitative to a qualitative approach. In: *Food Control* 12 (4), S. 223–228. DOI: 10.1016/S0956-7135(00)00044-X.
- Stegmüller, S.; Schrenk, D.; Cartus, A. T. (2018): Formation and fate of DNA adducts of alpha- and beta-asarone in rat hepatocytes. In: *Food Chem. Toxicol.* 116 (Pt B), S. 138–146. DOI: 10.1016/j.fct.2018.04.025.
- Stegmüller, S.; Beißmann, N.; Kremer, J. I.; Mehl, D.; Baumann, C.; Richling, E. (2020): A New UPLC-qTOF Approach for Elucidating Furan and 2-Methylfuran Metabolites in Human Urine Samples after Coffee Consumption. In: *Molecules* 25 (21). DOI: 10.3390/molecules25215104.

- Stich, H. F.; Rosin, M. P.; Wu, C. H.; Powrie, W. D. (1981): Clastogenicity of furans found in food. In: *Cancer Lett.* 13 (2), S. 89–95. DOI: 10.1016/0304-3835(81)90133-6.
- Subramanyam, S.; Sailaja, D.; Rathnaprabha, D. (1989): Genotoxic assay of two dietary furans by some in vivo cytogenetic parameters. In: *Environ. Mol. Mutagen.* (14), S. 239.
- Sujatha, P. S. (2008): Monitoring cytotoxic potentials of furfuryl alcohol and 2-furyl methyl ketone in mice. In: *Food Chem. Toxicol.* 46 (1), S. 286–292. DOI: 10.1016/j.fct.2007.08.008.
- Tee, O. S.; Swedlund, B. E. (1983): On the reaction of furan with bromine in aqueous solution. Observation of the slow hydration of malealdehyde. In: *Can. J. Chem.* 61 (9), S. 2171–2176. DOI: 10.1139/v83-378.
- Terent'ev, A. P.; Kazitsyna, L. A. (1949): Sulfonation and the sulfonic acids of acidophobic compounds. II. Sulfonation of furan homologs. In: *Zhurnal Obshchei Khimii* (19), S. 531–537.
- Uhlig, S.; Wendel, A. (1992): The physiological consequences of glutathion variations. In: *Life Sci* (51), S. 1083–1094. DOI: 10.1016/0024-3205(92)90509-N.
- Wang, K.; Li, W.; Chen, J.; Peng, Y.; Zheng, J. (2015): Detection of cysteine- and lysine-based protein adductions by reactive metabolites of 2,5-dimethylfuran. In: *Anal. Chim. Acta* 896, S. 93–101. DOI: 10.1016/j.aca.2015.09.017.
- Watzek, N.; Scherbl, D.; Feld, J.; Berger, F.; Doroshenko, O.; Fuhr, U. et al. (2012): Profiling of mercapturic acids of acrolein and acrylamide in human urine after consumption of potato crisps. In: *Mol. Nutr. Food Res.* 56 (12), S. 1825–1837. DOI: 10.1002/mnfr.201200323.
- Wenzl, Thomas; Haedrich, Johannes; Schaechtele, Alexander; Robouch, Piotr; Stroka, Joerg (2016): Guidance document on the estimation of LOD and LOQ for measurements in the field of contaminants in feed and food: Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Wilkening, S.; Stahl, F.; Bader, A. (2003): Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. In: *Drug Metab. Dispos.* 31 (8), S. 1035–1042. DOI: 10.1124/dmd.31.8.1035.
- Worner, W.; Schrenk, D. (1996): Influence of liver tumor promoters on apoptosis in rat hepatocytes induced by 2-acetylaminofluorene, ultraviolet light, or transforming growth factor beta 1. In: *Cancer Res.* 56 (6), S. 1272–1278. Online verfügbar unter <https://cancerres.aacrjournals.org/content/56/6/1272.short>.
- Yamazaki, H.; Inui, Y.; Yun, C. H.; Guengerich, F. P.; Shimada, T. (1992): Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. In: *Carcinogenesis* 13 (10), S. 1789–1794. DOI: 10.1093/carcin/13.10.1789.
- Yang, J.; He, M. M.; Niu, W.; Wrighton, S. A.; Li, L.; Liu, Y.; Li, C. (2012): Metabolic capabilities of cytochrome P450 enzymes in Chinese liver microsomes compared with those in Caucasian liver microsomes. In: *Br. J. Clin. Pharmacol.* 73 (2), S. 268–284. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2011.04076.x.
- Yang, M.; Tsuang, J.; Wan, Y.-J. Y. (2007): A haplotype analysis of CYP2E1 polymorphisms in relation to alcoholic phenotypes in Mexican Americans. In: *Alcoholism Clin. Exp. Res.* 31 (12), S. 1991–2000. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2007.00533.x.
- Zeiger, E.; Anderson, B.; Haworth, S.; Lawlor, T.; Mortelmans, K. (1992): Salmonella mutagenicity tests. V. Results from the testing of 311 chemicals. In: *Environ. Mol. Mutagen.* 19 (S21), S. 2–141. DOI: 10.1002/em.2850190603.
- Zheng, H.-Y.; Zhu, Y.-L.; Teng, B.-T.; Bai, Z.-Q.; Zhang, C.-H.; Xiang, H.-W.; Li, Y.-W. (2006): Towards understanding the reaction pathway in vapour phase hydrogenation of furfural to 2-methylfuran. In: *J. Mol. Catal. A Chem.* 246 (1-2), S. 18–23. DOI: 10.1016/j.molcata.2005.10.003.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Verteilung an Cytochrom P450-Enzymen (CYP) [pmol/mg Protein] in humanen Lebermikrosomen (Shimada et al., 1994).	4
Abb. 2: 2-Methylfuran.....	7
Abb. 3: Thermische Bildung von MF aus Aminosäuren über deren Streckeraldehyde. Modifiziert nach (Limacher et al., 2008). MF: 2-Methylfuran.	9
Abb. 4: Bildung von MF aus 2-Pentalen, einem Abbauprodukt des oxidativen Fettsäurestoffwechsels. Modifiziert nach (Adams et al., 2011). MF: 2-Methylfuran.	9
Abb. 5: Metabolische Aktivierung von 2-Methylfuran (MF) zu 3-Acetylacrolein (AcA) abgefangen mit Semicarbazid (SC) sowie hypothetischer Addukte von AcA mit Lysin (Lys), Cystein (Cys) und Glutathion (GSH, GS-). Zum Nachweis wurde MF mittels m-Chlorperbenzoesäure (mCPBA, engl. m-chloroperoxybenzoic acid) zu AcA oxidiert. Modifiziert nach (Ravindranath et al., 1984a; Ravindranath und Boyd, 1985).	12
Abb. 6: Fragestellungen dieser Arbeit zur Untersuchung des Metabolismus von 2-Methylfuran (MF). AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: N-Acetyl-L-cystein, AcLys: N _α -Acetyl-L-lysin; dA: 2'-Desoxyadenosin, dC: 2'-Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, pRH: primäre Rattenhepatozyten, dT: 2'-Desoxythymidin.	22
Abb. 7: Strukturen, die im Zuge der in silico Untersuchung von MF diskutiert wurden. AcA: 3-Acetylacrolein, BDA: 2-Buten-1,4-dial, 2,5-Dimethylfuran, FFA: 2-Furfurylalkohol, MeFFA: 5-Methyl-Furfurylalkohol, MF: 2-Methylfuran.....	23
Abb. 8: Strukturelle Ähnlichkeit [%] von MF zu Furan, DMF, BDA und MeFFA berechnet mit QSAR toolbox. AcA: 3-Acetylacrolein, BDA: 2-Buten-1,4-dial, DMF: 2,5-Dimethylfuran, FFA: Furfurylalkohol, MF: 2-Methylfuran, MFFA: 5-Methyl-Furfurylalkohol.....	32
Abb. 9: ¹ H-NMR-Spektrum von cis-AcA (400 MHz, DMSO-d ₆). Die strukturelle Zuordnung ist der Übersicht in <i>trans</i> -AcA in organischem Lösungsmittel	41
Abb. 10: ¹³ C-NMR-Spektrum von cis-AcA (151 MHz, DMSO). AcA: 3-Acetylacrolein.	42
Abb. 11: ¹ H-NMR-Spektrum von trans-AcA in DMSO-d ₆ (600 MHz). Die strukturelle Zuordnung ist <i>trans</i> -AcA in organischem Lösungsmittel	44
Abb. 12: ¹³ C-NMR-Spektrum (101 MHz) von cis-AcA in DMSO nach H ₂ O-Zugabe. AcA: 3-Acetylacrolein.	45
Abb. 13: ¹ H-NMR-Spektrum (600 MHz) von cis-AcA in D ₂ O. Die Zuordnung der Signale ist in Tab. 12 gezeigt. AcA: 3-Acetylacrolein.....	46
Abb. 14: Postulierter Mechanismus der Hydratisierung von cis-AcA in Wasser zu cis-AcA-OH ₂ . Während die Isomere von cis-AcA-OH ₂ NMR-spektrometrisch nachgewiesen wurden, stellt die anschließende Dehydratation einen theoretischen Bildungsweg von Nebenprodukten dar. AcA: 3-Acetylacrolein. .	48
Abb. 15: ¹ H-NMR-Spektrum (400 MHz) von trans-AcA in D ₂ O. Die Zuordnung der Signale ist in Tab. 13 gezeigt. AcA: 3-Acetylacrolein.....	49
Abb. 16: Hydratisierung von trans-AcA in Wasser zu trans-AcA-OH ₂ . AcA: 3-Acetylacrolein.....	50

- Abb. 17:** ESI⁺-MS²-Scan von AcA (5 μM) mit zugeordneten Strukturfragmenten. Ausgehend vom Prekursorion mit dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis m/z 117 wurde im Bereich von m/z 55–110 gescannt nach Methode in Kap. 6.5.2.1. AcA: 3-Acetylacrolein, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.. 51
- Abb. 18:** Umlagerung von AcA in unterschiedlichen Lösungsmitteln und Bedingungen. Ausgehend von der Synthese aus MF mit DMDO. AcA: 3-Acetylacrolein, DMDO: Dimethyldioxiran, MF: 2-Methylfuran. 52
- Abb. 19:** Hydratisierung von BDA (A) und o-Benzoldicarbaldehyd (B) in Wasser nach (Tee und Swedlund, 1983). BDA: cis-2-Buten-1,4-dial 53
- Abb. 20:** HPLC-ESI⁺-MS²-Spektrum von AcCys-AcA mit postulierten Fragmentstrukturen. Dargestellt wurde (5-methylfuran-2-yl)thio)-AcCys, basierend auf den MS²-Messungen ist (5-methylfuran-3-yl)thio)-AcCys als Produkt nicht auszuschließen. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: N-Acetyl-L-Cystein, M: Prekursorion, MF: 2-Methylfuran, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis..... 54
- Abb. 21:** ¹H-NMR-Spektrum (600 MHz) von AcCys-AcA in D₂O. Die Zuordnung der Signale ist in Tab. 14 gezeigt. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: N-Acetyl-L-Cystein..... 55
- Abb. 22:** Identifizierung von AcCys-AcA. I.) Signalzuordnung des ¹H- und ¹³C-NMR gemäß den Signalen in Tab. 14. II.) Charakteristischem Fragment im LC-ESI-MS/MS-System. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: N-Acetyl-L-Cystein, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. 56
- Abb. 23:** Hypothesen zu der Bildung von (I) 3-(5-Methyl-)furanoyl-AcCys (AcCys-AcA_{II}) oder (II) 2-(5-Methyl-)furanoyl-AcCys (AcCys-AcA_{III}). AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: N_α-Acetyl-L-Cystein. 58
- Abb. 24:** Adduktbildung von BDA nach (Chen et al., 1997). (A) Postulierter Reaktionsmechanismus von BDA mit Thiolen (RSH) und Aminen (R-NH₂). (B) Nachgewiesene Addukte von BDA nach Inkubation mit AcCys (AcCys-BDA) sowie gemeinsamer Inkubation mit AcCys und AcLys (AcCys-AcLys-BDA). AcCys: N_α-Acetyl-L-Cystein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial. 59
- Abb. 25:** Bildung der isomeren Formen von AcLys-BDA (I, II) nach (Chen et al., 1997). Adduktbildung nach Inkubation von BDA mit AcLys in chemico. AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial. 61
- Abb. 26:** HPLC-ESI⁺-MS²-Spektrum von AcLys-BDA mit postulierten Fragmentstrukturen. AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis..... 62
- Abb. 27:** ¹H-NMR-Spektrum von AcLys-BDA in DMSO-d₆ (600 MHz). AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial..... 63
- Abb. 28:** Postulierter Mechanismus der AcLys-BDA Bildung basierend auf der Hypothese von (Chen et al., 1997). AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial. 66
- Abb. 29:** ESI⁺-MS²-Spektrum von AcLys-AcA mit postulierten Fragmentstrukturen. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis..... 67
- Abb. 30:** HPLC-ESI⁺-MS²-Chromatogramm der Massenübergänge von (A) AcLys-AcA und (B) AcLys-BDA im MRM-Modus (synthetisierte Standards, 1 μM, Methode I, Kap. 6.5.2.3). AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis..... 69
- Abb. 31:** ¹H-NMR-Spektrum von AcLys-AcA in D₂O (600 MHz). AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin. 72
- Abb. 32:** H,H-COSY-Spektrum von AcLys-AcA in D₂O (400 MHz). AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin. 73
- Abb. 33:** HMQC-Korrelation von AcLys-AcA in DMSO-d₆. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin..... 74

- Abb. 34:** DOSY-Messung von AcLys-AcA in (A) D₂O und (B) DMSO-d₆. Oben dargestellten Chromatogramme zeigen die Signale der ¹H-NMR-Messungen von AcLys-AcA im entsprechenden Lösungsmittel (siehe Abb. 31, Abb. 33). Auftragung der chemischen Verschiebung δ [ppm] gegen die Diffusionskonstanten [m²/s]. Die vertikalen Achsen wurde in einer Range von (a) $2,95e^{-10}$ – $2,10e^{-9}$ m²/s dargestellt, während die horizontale Achsen (A) 0,00019–7,00 ppm, bzw. (B) –0,504–14,5 ppm umfassen. Gefittete Funktionen sind dem elektronischen Anhang (II) zu entnehmen. Die Messung wurde von D. Bellaire am Lehrstuhl für Thermodynamik der TUK vorgenommen. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N α -Acetyl-L-Lysin. 76
- Abb. 35:** ¹H-NMR-Spektren von AcLys-AcA in MeCN-d₃ bei –35 bis 65 °C. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N α -Acetyl-L-Lysin. 77
- Abb. 36:** High resolution scans von AcLys-AcA (10 μ M) via HPLC-ESI⁺-MS/MS. (A) EPI-Scan. (B) Enhanced resolution scan. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N α -Acetyl-L-Lysin, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis, EPI: enhanced product ion. 80
- Abb. 37:** Reaktivität von AcA (1; 10 μ M) mit AcCys (4 mM) und AcLys (4 mM) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und des Lösungsmittels. Die Reaktion wurde bei 37 °C, 600 rpm durchgeführt. (A) Reaktion von AcA (1 μ M) mit AcCys (4 mM) in Wasser; Angabe von AcCys-AcA als [AUC]. (B) Reaktion von AcA (1 μ M) mit AcCys (4 mM) in reinem Lösungsmittel Wasser, Ethanol (EtOH), Acetonitril (MeCN) oder Dimethylsulfoxid (DMSO), je ohne Zusatz („rein“) und mit Zugabe von Säure (0,01% Essigsäure), bzw. Base (1 μ M Natriumhydroxid). Die Bildung von AcCys-AcA [AUC] wurde auf die Adduktbildung in reinem Wasser normiert. Durchführung gemäß Kap. 6.6. Detektion der AUC von AcCys-AcA mittels HPLC-ESI⁺-MS/MS (Methode Kap. 6.5.2.2). (C) Reaktion von AcA (1; 10 μ M) mit AcLys (4 mM) in K₂HPO₄-Puffer (50 mM, pH 7,4) im mikrosomalen System. Detektion von AcLys-AcA mittels HPLC-ESI⁺-MS/MS (Methode Kap. 6.7). n = 3, Mittelwert \pm Standard-abweichung. AcA: 3-Acetylacrolein; AcCys: N-Acetyl-L-cystein, AcLys: N α -Acetyl-L-lysin..... 84
- Abb. 38:** ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) von dC-AcA in DMSO-d₆. Die Zuordnung der Signale ist in Tab. 19 gezeigt. AcA: 3-Acetylacrolein, dC: 2'-Desoxycytosin..... 86
- Abb. 39: Identifizierung von dC-AcA. I.) Signalzuordnung aus ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren gemäß der Signale in Tab. 19. II.) Fragmentierungsmuster aus LC-ESI⁺-MS/MS-Messungen. AcA: 3-Acetylacrolein, dC: 2'-Desoxycytosin, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis..... 87
- Abb. 40:** HPLC-ESI⁺-MS/MS-Spektrum (MRM-Modus mit m/z: 308/192) von dC-AcA (0,01–5 nM). AcA: Acetylacrolein, dC: 2'-Desoxycytidin, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis..... 88
- Abb. 41:** HPLC-ESI⁺-MS²-Spektrum von dC-AcA mit postulierten, charakteristischen Fragmentstrukturen. AcA: Acetylacrolein, dC: 2'-Desoxycytidin, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. 89
- Abb. 42:** Hypothetischer Bildungsmechanismus von dC-AcA. Modifiziert nach dem Mechanismus von 4-Oxo-2-alkenalen (Kawai et al., 2004). AcA: 3-Acetylacrolein, dC: 2'-Desoxycytidin, dR: 2'-Desoxyribose. 89
- Abb. 43:** ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) von dG-AcA in DMSO-d₆. Die Zuordnung der Signale ist in Tab. 20 gezeigt. AcA: 3-Acetylacrolein, dG: 2'-Desoxyguanosin. 91
- Abb. 44:** HPLC-ESI⁺-MS²-Spektrum von dG-AcA mit postulierten, charakteristischen Fragmentstrukturen. AcA: Acetylacrolein, dG: 2'-Desoxyguanosin, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. 93
- Abb. 45:** Postulierter Bildungsmechanismus von dG-AcA. Alternativ ist die umgekehrte Reihenfolge von Schritt 1 und 2 möglich. Mechanismus basierend auf (Hecht et al., 1992) und (Kawai et al., 2004). AcA: 3-Acetylacrolein, dG: 2'-Desoxyguanosin, dR: 2'-Desoxyribose..... 94
- Abb. 46:** ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz) von dC-AcA in DMSO-d₆. Die Zuordnung der Signale ist in Tab. 22 gezeigt. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin. 95

- Abb. 47:** HPLC-ESI⁺-MS²-Spektrum von dA-AcA mit postulierten, charakteristischen Fragmentstrukturen. AcA: Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. 96
- Abb. 48:** Hypothetischer Bildungsmechanismus von dA-AcA. Mechanismus abgeleitet von (Hecht et al., 1992) und (Kawai et al., 2004). AcA: Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, dR: 2'-Desoxyribose..... 97
- Abb. 49:** Gehalt an dA-AcA (A), dG-AcA (B) und dC-AcA (C) in unbehandelter Lachs-DNA. Ermittelt via HPLC-ESI⁺-MS/MS, MRM-Methode Kap. 6.5.2.4. n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin. 99
- Abb. 50:** (A) Zeit- und (B) dosisabhängige Bildung von dA-, dG- und dC-AcA nach Inkubation von AcA mit isolierter DNA aus pRH. Die Inkubationen bei 37 °C wurden im Falle der zeitabhängige Testung mit konstant 100 µM AcA durchgeführt (A), während die dosisabhängige Versuche konstant 24 h inkubiert wurden (B). n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung. Signifikanzen wurden gegen die nächst niedrigeren Einheit getestet mittels ungepaartem, einseitigem T-Test mit (*) P < 0,05 signifikant, (**) P < 0,01 hoch signifikant, (***) P < 0,001 höchst signifikant. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin..... 102
- Abb. 51:** Umsatzrate (dN-AcA/AcA [ppm]) von AcA zu dA-, dG- oder dC-AcA nach Inkubation mit isolierter DNA aus pRH. n = 3, Mittelwert ± Standardabweichung. Signifikanzen wurden gegen die nächst niedrigeren Einheit getestet mittels ungepaartem, einseitigem T-Test mit (*) P < 0,05 signifikant, (**) P < 0,01 hoch signifikant, (***) P < 0,001 höchst signifikant. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, dN: Nukleosid..... 103
- Abb. 52:** AcA-Bildung in RLM und HLM nach Inkubation mit MF. (A) Zeitabhängige Inkubation mit 100 µM bzw. 500 µM MF, (B) Dosisabhängige Inkubation (10 min). AcA abgefangen mit AcLys und detektiert als AcLys-AcA. Eingesetzt wurde je 1 mg mikrosomales Protein/mL. n = 3–5, Mittelwert ± Standardabweichung, Signifikanzen getestet mittels ungepaartem, zweiseitigem T-Test mit (*) P < 0,05 signifikant, (**) P < 0,01 hoch signifikant, (***) P < 0,001 höchst signifikant. Bis auf die Inkubationszeit von 1 min (A) mit 500 µM AcA lagen alle Werte signifikant erhöht zur Negativkontrolle. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, HLM: humane Lebermikrosome, MF: 2-Methylfuran, RLM: Rattenlebermikrosome. 107
- Abb. 53:** Inkubation der Supersomes CYP 1A2, 2A6, 2C9, 2D6, 2E1 und 3A4 mit MF (100; 500 µM) für 10, 30 oder 60 min zur Bestimmung der AcA-Bildung. Detektiert als AcLys-AcA (Analyt) mit AcLys-BDA als interner Standard (IS). n = 3–5, Mittelwert ± Standardabweichung, Signifikanzen getestet gegen die Negativkontrolle (NK, ohne NADPH) mittels ungepaartem, zweiseitigem T-Test mit (*) P < 0,05 signifikant, (**) P < 0,01 hoch signifikant, (***) P < 0,001 höchst signifikant. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial, CYP: Cytochrom P450, MF: 2-Methylfuran..... 108
- Abb. 54:** AcA-Bildung in SupersomeTM CYP 2E1 sowie RLM und HLM nach Inkubation mit MF. (A) Zeitabhängige Inkubation von CYP 2E1 mit 100 µM und 500 µM MF verglichen mit derer von RLM und HLM. (B) Dosisabhängige Inkubation von CYP 2E1, RLM und HLM Inkubation (10 min). AcA abgefangen mit AcLys und detektiert als AcLys-AcA. Eingesetzt wurde 120 nM CYP 2E1/mL, bzw. 1 mg mikrosomales Protein/mL. n = 3–5, Mittelwert ± Standardabweichung, Signifikanzen getestet mittels ungepaartem, zweiseitigem T-Test mit (*) P < 0,05 signifikant, (**) P < 0,01 hoch signifikant, (***) P < 0,001 höchst signifikant. Alle Werte wurden als höchst signifikant zur Negativkontrolle (ohne NADPH, hitzeinaktivierte Enzyme) getestet. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, CYP: Cytochrom P450, HLM: humane Lebermikrosome, MF: 2-Methylfuran, RLM: Rattenlebermikrosome 109

- Abb. 55:** Bildungsgeschwindigkeit v von AcA durch MF-Inkubation von RLM (A), HLM (B) und CYP 2E1 (C) im Michaelis-Menten- und Hill-Modell. K_M ; k : Michaelis-Menten-Konstante, n : Hill-Faktor, v_{max} : maximale Bildungsgeschwindigkeit. Die Werte wurden gerundet. AcA: 3-Acetylacrolein, CYP: Cytochrom P450, HLM: humane Lebermikrosome, MF: 2-Methylfuran, RLM: Rattenlebermikrosome. 113
- Abb. 56:** Eadie-Hofstee-Plots und abgeleitete Parameter für die AcA-Bildung in RLM (A), HLM (B) und CYP 2E1 (C) nach Inkubation mit 10, 100, 250, 500 oder 750 μM MF. Parameter wurden bestimmt als v_{max} für Mikrosomen, bzw. k_{cat} für Supersomes. AcA: 3-Acetylacrolein, CYP: Cytochrom P450, HLM: humane Lebermikrosome, MF: 2-Methylfuran, RLM: Rattenlebermikrosome, RSQ: Residuenquadratsumme. 114
- Abb. 57:** Relative Umsatzrate [n-%] der Enzyme zu AcA bezogen auf eingesetzte Stoffmenge MF. Vergleich von RLM, HLM, CYP 2E1 und CYP 2E1 mit Abzug der Negativkontrolle (- NK). $n = 3-5$, Mittelwert \pm Standardabweichung, Signifikanzen getestet mittels ungepaartem, zweiseitigem T-Test mit (*) $P < 0,05$ signifikant, (**) $P < 0,01$ hoch signifikant, (***) $P < 0,001$ höchst signifikant. AcA: 3-Acetylacrolein, CYP: Cytochrom P450, HLM: humane Lebermikrosome, MF: 2-Methylfuran, RLM: Rattenlebermikrosome. 118
- Abb. 58:** Zytotoxizität von MF (0,1–10 mM) in pRH und HepG2-Zellen nach 24 h-Inkubation. Gemessen als relative Vitalität [%] durch Bezug auf Negativkontrolle (DMSO, 0,1 %). $n = 3-5$, berechnet als Mittelwert \pm Standardabweichung, Sigmoidaler Fit nach Boltzmann. MF: 2-Methylfuran, pRH: primäre Rattenhepatozyten. 120
- Abb. 59:** Zytotoxizität von (A) MF und (B) AcA in pRH, zeit- und dosisabhängig. Gemessen als relative Vitalität [%] durch Bezug auf Negativkontrolle (DMSO, 0,1 %). $n = 3-5$, berechnet als Mittelwert \pm Standardabweichung, Sigmoidaler Fit nach Boltzmann. AcA: 3-Acetylacrolein, MF: 2-Methylfuran, pRH: primäre Rattenhepatozyten. 122
- Abb. 60:** Bildung von AcLys-AcA [nM] in pRH nach Inkubation mit (A) MF (10–1000 μM) und (B) AcA (0,1–5 μM). Die Signifikanzen wurden gegen die Negativkontrolle (NK; DMSO 0,1 %) getestet im einseitigen T-Test. $n = 3-5$, Mittelwert \pm Standardabweichung, Signifikanzen getestet mittels ungepaartem, einseitigem T-Test mit (*) $P < 0,05$ signifikant, (**) $P < 0,01$ hoch signifikant, (***) $P < 0,001$ höchst signifikant. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin, MF: 2-Methylfuran, pRH: primäre Rattenhepatozyten. 125
- Abb. 61:** Relative Umsatzrate [ppm] zu AcLys-AcA (LA) in pRH (1–48 h) bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge MF (10–1000 μM ; A,C) und AcA (0,1–5 μM ; B,D), ohne (A,B) und mit (C,D) Substraktion der Negativkontrolle (NK; DMSO, 0,1 %). $n = 3-5$, Mittelwert \pm Standardabweichung. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin, MF: 2-Methylfuran, pRH: primäre Rattenhepatozyten. 127
- Abb. 62:** Entscheidungsschema zur Wahl eines geeigneten Szenarios im RAAF (modifiziert nach Richtlinien der OECD). RAAF: (engl.) read-across assessment framework. 150
- Abb. 63:** HPLC-ESI-MS/MS-Chromatogramm von AcCys-AcA (1 μM) im MRM-Modus. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: N-Acetyl-L-Cystein, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. 169
- Abb. 64:** Regressionsgerade der Kalibrierreihe von AcCys-AcA (2,5–100 nM). AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: N-Acetyl-L-Cystein. 172
- Abb. 65:** HPLC-ESI⁺-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Modus) von (A) AcLys-AcA (1 μM) und (B) AcLys-BDA (1 μM) mit Methode I. Die Übergänge entsprechen den m/z in. 175
- Abb. 66:** Regressionsgerade der Kalibrierreihe von AcLys-AcA (2,5–1000 nM) mit Methode I. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin, Analyt: AcLys-AcA, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial, IS: interner Standard (AcLys-BDA, 1 μM). 180

- Abb. 67:** HPLC-ESI⁺-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Modus) von AcLys-AcA (A) und AcLys-BDA (B) mit Methode II. Die Massenübergänge entsprechen den m/z in Tab. 47 geordnet nach ihrer Intensität. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. 182
- Abb. 68:** Regressionsgerade der Kalibrierreihe von AcLys-AcA (0,5–1000 nM) für Methode II. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, Analyt: AcLys-AcA, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial, IS: interner Standard (AcLys-BDA, 1 μM). 183
- Abb. 69:** HPLC-ESI⁺-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Modus) von dA-AcA, dG-AcA und dC-AcA (je 1 nM). Interner Standard (gestrichelte Linien): ¹⁵N₅-dA-AcA (50 nM), ¹⁵N₅-dG-AcA (50 nM). Die Massenübergänge entsprechen den m/z in..... 188
- Abb. 70:** Regressionsgerade zur Quantifizierung von dA-AcA (0,05–5 nM) mit ¹⁵N₅-dA-AcA (0,6 nM) als internem Standard. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin. 194
- Abb. 71:** Regressionsgerade zur Quantifizierung von dG-AcA (0,05–5 nM) mit ¹⁵N₅-dG-AcA (4,7 nM) als internem Standard. AcA: 3-Acetylacrolein, dG: 2'-Desoxyguanosin. 195
- Abb. 72:** Regressionsgerade zur Semi-Quantifizierung von dC-AcA (1–20 nM) mit ¹⁵N₅-dG-AcA (5 nM) als internem Standard. 3-Acetylacrolein, dC: 2'-Desoxycytosin. 196
- Abb. 73:** HPLC-ESI⁺-MS/MS-Chromatogramm (MRM-Modus) von dG (50 μM) und ¹⁵N₅-dG (20 μM). Die Massenübergänge entsprechen den m/z in Tab. 58Tab. 58. dG: 2'-Desoxyguanosin, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. 200
- Abb. 74:** Regressionsgerade zur Quantifizierung von dG (1–500 μM) mit ¹⁵N₅-dGI (20 μM) als internem Standard. dG: 2'-Desoxyguanosin. 202
- Abb. 75:** Reduktion von Resazurin zu Resorufin mittels NADH/H⁺. NADH/H⁺: reduzierte Form von Nicotinamiddinukleosid, NAD⁺: oxidierte Form von Nicotinamiddinukleosid (Rampersad, 2012)..... 217

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1:** Auswahl relevanter Cytochrom P450-Enzyme (CYP) im Phase-I-Metabolismus (Dekant, 2017; Luo et al., 2002). *) den Zertifikaten der im experimentellen Teil verwendeter Mikrosomen entnommen. GIT: Gastro-Intestinal-Trakt..... 4
- Tab. 2:** Cramer-Klassifizierung mit Expositionsschwellenwerten gemäß dem TTC-Konzept. Der Expositionsschwellenwert bezieht sich auf eine 60 kg schwere Person und wurde aus dem 5 %-igen NOEL mit einem Sicherheitsfaktor von 100 berechnet (Munro et al., 1996; Cramer et al., 1976). KG: Körpergewicht, NOEL: (engl.) no observed effect level, TTC: (engl.) threshold of toxicological concern. 7
- Tab. 3:** Physikalisch-chemischen Daten von 2-Methylfuran und Derivaten zum Vergleich (ACS, 2017; Hoydonckx et al., 2012; Terent'ev und Kazitsyna, 1949; Knutsen et al., 2017; Gestis-Stoffdatenbank, 2021). DMF: 2,5-Dimethylfuran, FFA: 2-Furfurylalkohol, MF: 2-Methylfuran, Sdp.: Siedepunkt. 8
- Tab. 4:** MF-Gehalte in ausgewählten Lebensmitteln. Detektion mittels Headspace-GC-MS. LOQ: limit of quantification, MF: 2-Methylfuran, MW: Mittelwert, RL: Reporting limit (Meldegrenze)..... 10
- Tab. 5:** Furan, MF und 3-MF-Gehalte in Lebensmittelproben (aus (Becalski et al., 2010). Angaben als prozentualer Anteil an entsprechendem Furan nachgewiesen in Proben, dem Median und der maximalen gemessenen Konzentration (Kaffeeproben wurden hier nicht einberechnet). MF: 2-Methylfuran, 3-MF: 3-Methylfuran..... 17
- Tab. 6:** In silico verglichene Strukturen. AcA: 3-Acetylacrolein (Evans und Relling, 1999; ACS, 2017). *) wenn $-0,4 \leq \log P \leq 5,6$. BDA: 2-Buten-1,4-dial, 2,5-Dimethylfuran, FFA: 2-Furfurylalkohol, MF: 2-Methylfuran..... 24
- Tab. 7:** In silico Einstufung von MF, Furan, DMF, FFA, BDA und AcA via ToxTree. Die Einstufung von AcA wurde manuell nach dem Entscheidungsbaum analog zu BDA durchgeführt, während die Abfrage der übrigen Substanzen automatisch durchlaufen wurden. AcA: 3-Acetylacrolein, BDA: 2-Buten-1,4-dial, DMF: 2,5-Dimethylfuran, FFA: Furfurylalkohol, MF: 2-Methylfuran..... 26
- Tab. 8:** Metabolite von MF generiert via QSAR toolbox (der OCED) mit dem Metabolismus/Transformations-Simulator „in vivo Ratte“. Die vom Programm ermittelten potentiellen Metabolite wurden im Anschluss manuell basierend auf ihrer Grundstruktur und Eigenschaften gruppiert. *) aus AcA; **) vermutlich instabile Vorstufe von AcA (Hudzik und Bozzelli, 2017); ***) (Peterson et al., 2000; Høie et al., 2016). AcA: 3-Acetylacrolein, FFA: Furfurylalkohol, MeFFA: 5-Methylfurfurylalkohol..... 28
- Tab. 9:** QSAR-Analyse von MF in spezifischen Endpunkten via QSAR toolbox (der OECD). CA: Chromosomenaberrationen, MF: 2-Methylfuran, MNT: Mikronukleus-Test, RAAF: Read across assessment framework, SS: Hautsensibilierend (engl.: skin sensitisation)..... 34
- Tab. 10:** $^1\text{H-NMR}$ -Signale von cis-AcA in CDCl_3 der eigenen Synthese (400 MHz) verglichen mit Literaturdaten in CDCl_3 (Ravindranath et al., 1984b). AcA: 3-Acetylacrolein. 39
- Tab. 11:** $^1\text{H-NMR}$ -Signale von cis-AcA und trans-AcA mit deren Konformation abhängig von Zeit und Bedingungen in DMSO-d_6 . Rein: Vorliegen als Reinsubstanz, Mix: Vorliegen als Isomergemisch. Verhältnisse von Gemischen wurden über Integration der Protonen im $^1\text{H-NMR}$ bestimmt. *) nur direkt nach D_2O -Zugabe messbar ($t = 0$ h); nicht integrierbar durch starke Überlappung mit HDO. AcA: 3-Acetylacrolein..... 42

- Tab. 12:** ^1H -NMR-Signale von cis-AcA und cis-AcA-OH₂ und deren verhältnismäßiges Vorliegen in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Mix: Vorliegen als Diastereomere. Verhältnisse von Diastereomeregemisch wurden über Integration der Protonen im ^1H -NMR bestimmt. AcA: 3-Acetylacrolein..... 47
- Tab. 13:** ^1H -NMR-Signale von trans-AcA und trans-AcA-OH₂ und deren verhältnismäßiges Vorliegen. Mix: Vorliegen als Gemisch. Verhältnisse von Gemischen wurden über Integration der Protonen im ^1H -NMR bestimmt. *) nur direkt nach D₂O-Zugabe messbar (t = 0 h); nicht integrierbar durch starke Überlappung mit HDO. AcA: 3-Acetylacrolein..... 49
- Tab. 14:** ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale von AcCys-AcA mit struktureller Zuordnung. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: N-Acetyl-L-Cystein..... 55
- Tab. 15:** ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale von AcLys-BDA in DMSO-d₆ (bei 600 MHz, bzw. 151 MHz). br s: breites Singulett. AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial..... 63
- Tab. 16:** ^1H -NMR-Signale der relevanten Ringprotonen sowie HPLC-UV/Vis-Charakteristika der Isomere von AcLys-BDA aus (Chen et al., 1997). AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial..... 64
- Tab. 17:** ^1H -NMR-Signale von AcLys-AcA und AcLys in D₂O mit teils struktureller Zuordnung. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin..... 70
- Tab. 18:** Elementaranalyse und Berechnung der Summenformel von AcLys-AcA. Der Sollwert beruht auf der Annahme der Bruttosummenformel C₁₃H₂₀N₂O₄ mit einem Molekulargewicht von 268,14 g/mol. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin..... 78
- Tab. 19:** ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale von dC-AcA aus der Synthese im Vergleich zu Literaturdaten. Eigene Synthese in DMSO-d₆ mit ^1H -NMR (400 MHz) und ^{13}C -NMR (101 MHz), Referenzliteratur in DMSO-d₆ (Rentel et al., 2005). AcA: 3-Acetylacrolein, dC: 2'-Desoxycytosin..... 86
- Tab. 20:** Identifizierung von dG-AcA via NMR und MS mit Literaturvergleich. Syn: eigene Synthese in DMSO-d₆ mit ^1H -NMR (400 MHz) und charakteristischer Hauptfragmente mittels ESI⁺-MS/MS, Ref.: Referenzliteratur in DMSO-d₆ lag t.w. nur als Spektrum vor, weshalb die mit (̃) markierten δ lediglich abgeschätzt wurden (Hecht et al., 1992). *) amid-gebundenes Proton mit geringer Signalintensität. AcA: 3-Acetylacrolein, dG: 2'-Desoxyguanosin, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis..... 91
- Tab. 21:** Prekursorionen und Fragmente [m/z] im Produktionenscan (MS²) von dG-AcA, dG-AcA-OH₂ und ¹⁵N₅-dG-AcA. Ac: Acetyl, AcA: 3-Acetylacrolein, dG: 2'-Desoxyguanosin, dR: 2'-Desoxyribose, m/z: Masse-Ladungs-Verhältnis, PropCO: Isopropenyloxy..... 93
- Tab. 22:** Identifikation von dA-AcA via NMR und MS. ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale in DMSO-d₆ mit ^1H -NMR (400 MHz) und ^{13}C -NMR (101 MHz) und charakteristischer Hauptfragmente mittels ESI⁺-MS/MS. *) Theoretische Abschätzung durch Überlappung mit Lösungsmittelsignal. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis..... 95
- Tab. 23:** Prekursorionen und Fragmente [m/z] im Produktionenscan (MS²) von dA-AcA, dA-AcA-OH₂ und ¹⁵N₅-dA-AcA. Ac: Acetyl, AcA: Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, dR: 2'-Desoxyribose, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis, PropCO: Isopropenyloxy..... 96
- Tab. 24:** Enzymkinetische Parameter der AcA-Bildung eigener Ergebnisse im Vergleich zu Daten aus der Literatur. Im biphasischen System steht (I) für die Reaktion bei hohen Substratkonzentrationen (250, 500, 750 μM) und (II) für die Reaktion bei niedrigen Substratkonzentrationen (10, 100 μM). *) Mikrosomen aus Phenobarbital vorbehandelten Ratten. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden Literaturwerte ggf. in die entsprechende Einheit umgerechnet und gerundet (siehe elektronischer Anhang III). CYP: Cytochrom P450, HLM: humane Lebermikrosome, LM: Lebermikrosomen, MF: 2-Methylfuran, RLM: Rattenlebermikrosome, unbeh.: unbehandelt Ratten, vorbeh.: vorbehandelte Ratten..... 115

Tab. 25: Verwendete Chemikalien mit Herstellern/Lieferanten. *) primäre Nutzung, falls nicht anders vermerkt. **) Verwendung als Fließmittel und Ansätze bei Nutzung des UHPLC-MS/MS-System III.	139
Tab. 26: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Hersteller/Lieferanten.....	142
Tab. 27: Verwendete Geräte mit Herstellern/Lieferanten.	143
Tab. 28: Verwendete Zellen/Tiere mit Herstellern/Lieferanten.	144
Tab. 29: Verwendete Mikrosomen und Supersomes™ mit Herstellern/Lieferanten.....	145
Tab. 30: Verwendete Software mit Herausgeber.	145
Tab. 31: Parameter der semipräparativen Aufreinigung von AcCys-AcA. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: N-Acetyl-L-Cystein.	164
Tab. 32: Parameter der präparativen Aufreinigung von AcLys-AcA und AcLys-BDA. Nach Trennung des Synthesegemischs in Lauf 1 wurden die entsprechend vereinigten Fraktion in Lauf 2 erneut fraktioniert. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N _α -Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial.....	165
Tab. 33: Retentionszeiten der Isomere von AcLys-AcA und AcLys-BDA im Q1-Scan. *) verschiedene Fraktionen durch gelungene präparative Trennung und Basislinientrennung von Misch-/Fraktionen im analytischen Lauf. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N _α -Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial.....	165
Tab. 34: Parameter der präparativen Aufreinigung von AcLys-AcA und AcLys-BDA. *) auch entsprechender isotopenmarkierter Standard. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N _α -Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial.	166
Tab. 35: MS-Parameter zur Charakterisierung von AcA via Produktionenscan am ESI ⁺ -MS/MS-System 2 (API 3200). CAD: collisionally activated dissociation, CE: collision energy, CEP: collision cell entrance potential, CUR: curtain gas, CXP: cell exit potential, DP: declustering potential, dtime: dwell time, EP: entrance potential, GS1: nebulizer gas, GS2: heater gas, IS: ion spray voltage. AcA: 3-Acetylacrolein.	167
Tab. 36: HPLC-Parameter zur Quantifizierung von AcCys-AcA. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: N-Acetyl-L-Cystein.	168
Tab. 37: MS-Parameter zur Quantifizierung von AcCys-AcA. Unterstrichene Massenübergänge dienten als Quantifier, während die übrigen als Qualifier herangezogen wurden CAD: collisionally activated dissociation, CE: collision energy, CEP: collision cell entrance potential, CUR: curtain gas, CXP: cell exit potential, DP: declustering potential, dtime: dwell time, EP: entrance potential, GS1: nebulizer gas, GS2: heater gas, IS: ion spray voltage, Q1: quadrupol 1, Q3: quadrupol 3, TEMP: ion source temperatur. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: N-Acetyl-L-Cystein, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis.....	168
Tab. 38: Ansatz der Zwischenverdünnung und Endlösung der Konzentrationsreihe von AcCys-AcA. LM: Fließmittelzusammensetzung unter Berücksichtigung des wässrigen Anteils der ZV. EL: Endlösung, LM: Lösungsmittel, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: N-Acetyl-L-Cystein.....	169
Tab. 39: Kalibrierung von AcCys-AcA mit Validierungsparametern für den Bereich 2,5–100 nM. Analyt: AcCys-AcA, AUC: area under the curve, m: Mittelwert, LOD: Detektionsgrenze, LOQ: Quantifizierungsgrenze, Übergang: Massenübergang, Stabw.: Standardabweichung, Vark: Varianzkoeffizient. AcA: 3-Acetylacrolein, AcCys: N-Acetyl-L-Cystein.	171
Tab. 40: HPLC-Parameter zur Quantifizierung von AcLys-AcA mit AcLys-BDA in Methode I. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N _α -Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial.	174

- Tab. 41:** MS-Parameter zur Quantifizierung von AcLys-AcA mit AcLys-BDA in Methode I. Unterstrichene Massenübergänge dienten als Quantifier, während die übrigen als Qualifier herangezogen wurden. CAD: collisionally activated dissociation, CE: collision energy, CEP: collision cell entrance potential, CUR: curtain gas, CXP: cell exit potential, DP: declustering potential, dtime: dwell time, EP: entrance potential, GS1: nebulizer gas, GS2: heater gas, IS: ion spray voltage, Q1: quadrupol 1, Q3: quadrupol 3, TEMP: ion source temperatur. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. 175
- Tab. 42:** Ansatz der Stammlösungen von AcLys-AcA für die Kalibrierreihe mit AcLys-BDA als internem Standard. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor. 176
- Tab. 43:** Ansatz der Stammlösungen von AcLys-AcA für die Kalibrierreihe mit AcLys-BDA als internem Standard. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial, EL: Endlösung, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung. 176
- Tab. 44:** Ansatz der Endlösungen von AcLys-AcA für die Kalibrierreihe mit AcLys-BDA als internem Standard. LM: Fließmittelzusammensetzung unter Berücksichtigung des wässrigen Anteils der ZV. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial, EL: Endlösung, LM: Lösungsmittel, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung. 178
- Tab. 45:** Kalibrierung von AcLys-AcA mit Validierungsparametern der Methode I. Analyt: AcLys-AcA, IS: AcLys-BDA. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, AUC: area under the curve, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial, m: Mittelwert, LOD: Detektionsgrenze, LOQ: Quantifizierungsgrenze, Übergang: Massenübergang, IS: interner Standard, Stabw.: Standardabweichung, VarK: Varianzkoeffizient.... 179
- Tab. 46:** HPLC-Parameter zur Quantifizierung von AcLys-AcA mit AcLys-BDA in Methode II. 180
- Tab. 47:** MS-Parameter zur Quantifizierung von AcLys-AcA mit AcLys-BDA in Methode II. Unterstrichene Massenübergänge dienten als Quantifier, während die übrigen als Qualifier herangezogen wurden. CAD: collisionally activated dissociation, CE: collision energy, CEP: collision cell entrance potential, CUR: curtain gas, CXP: cell exit potential, DP: declustering potential, dtime: dwell time, EP: entrance potential, GS1: nebulizer gas, GS2: heater gas, IS: ion spray voltage, Q1: quadrupol 1, Q3: quadrupol 3, TEMP: ion source temperatur. . AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. 181
- Tab. 48:** Kalibrierung von AcLys-AcA mit Validierungsparametern der Methode II. AcA: 3-Acetylacrolein, AcLys: N_α-Acetyl-L-Lysin, Analyt: AcLys-AcA, AUC: area under the curve, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial, IS: interner Standard (AcLys-BDA), m: Mittelwert, LOD: Detektionsgrenze, LOQ: Quantifizierungsgrenze, Übergang: Massenübergang, Stabw.: Standardabweichung, VarK: Varianzkoeffizient. 183
- Tab. 49:** HPLC-Parameter zur Quantifizierung der DNA-Addukte dA-AcA, dG-AcA und dC-AcA mit ¹⁵N₅-dA-AcA sowie ¹⁵N₅-dG-AcA. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, dC: 2'-Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin. 184
- Tab. 50:** MS-Parameter zur Quantifizierung der DNA-Addukte dA-AcA, dG-AcA und dC-AcA mit [¹⁵N₅]-dA-AcA sowie [¹⁵N₅]-dG-AcA. Unterstrichene Massenübergänge wurden als Quantifier genutzt, während die anderen als Qualifier dienten. CAD: collisionally activated dissociation, CE: collision energy, CEP: collision cell entrance potential, CUR: curtain gas, CXP: cell exit potential, DP: declustering potential, dtime: dwell time, EP: entrance potential, GS1: nebulizer gas, GS2: heater gas, IS: ion spray voltage, Q1: quadrupol 1, Q3: quadrupol 3, TEMP: ion source temperatur. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, dC: 2'-Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. 187

- Tab. 51:** Ansatz der Stamm- und Zwischenverdünnungen von dA-AcA, dG-AcA und dC-AcA zur Kalibrierung der DNA-Addukte. Als dN-AcA ist die Kombination aus dA-AcA, dG-AcA, dC-AcA zusammengefasst. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, dC: 2'-Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, EL: Endlösung, LM: Lösungsmittel, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung. 188
- Tab. 52:** Ansatz der Stamm- und Zwischenverdünnung der internen Standards $^{15}\text{N}_5$ -dA-AcA (IS_A) und $^{15}\text{N}_5$ -dG-AcA (IS_G) zur Kalibrierung der DNA-Addukte. *) Bestimmt mittels externer Kalibrierung. AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, dC: 2'-Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, EL: Endlösung, LM: Lösungsmittel, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung. 190
- Tab. 53:** Ansatz der Endlösung zur Kalibrierung der DNA-Addukte von AcA. Mit dN-AcA: dA-AcA + dG-AcA + dC-AcA; $\text{IS}_{A|G}$: $^{15}\text{N}_5$ -dA-AcA (IS_A) + $^{15}\text{N}_5$ -dG-AcA (IS_G). *) LM: 0,11 % Ameisensäure (LC-MS grade) in Methanol (LC-MS grade). AcA: 3-Acetylacrolein, dA: 2'-Desoxyadenosin, dC: 2'-Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, EL: Endlösung, LM: Lösungsmittel, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung. 190
- Tab. 54:** Kalibrierung von dA-AcA mit Validierungsparametern. AcA: 3-Acetylacrolein, Analyt: dA-AcA, AUC: area under the curve, dA: 2'-Desoxyadenosin, IS: internen Standard ($^{15}\text{N}_5$ -dA-AcA), m: Mittelwert, LOD: Detektionsgrenze, LOQ: Quantifizierungsgrenze, Übergang: Massenübergang, Stabw.: Standardabweichung, VarK: Varianzkoeffizient. 194
- Tab. 55:** Kalibrierung von dG-AcA mit Validierungsparametern. AcA: 3-Acetylacrolein, Analyt: dG-AcA, AUC: area under the curve, dG: 2'-Desoxyguanosin, IS: internen Standard ($^{15}\text{N}_5$ -dG-AcA), m: Mittelwert, LOD: Detektionsgrenze, LOQ: Quantifizierungsgrenze, Übergang: Massenübergang, Stabw.: Standardabweichung, VarK: Varianzkoeffizient. 195
- Tab. 56:** Kalibrierung von dC-AcA mit Validierungsparametern. *) Noise entspricht Peakhöhe bei 0,001 nM dC-AcA. AcA: 3-Acetylacrolein, Analyt: dC-AcA, AUC: area under the curve, dC: 2'-Desoxycytosin, dG: 2'-Desoxyguanosin, IS: internen Standard (dG-AcA), m: Mittelwert, LOD (S/N = 3/1): Detektionsgrenze, LOQ (S/N = 6/1): Quantifizierungsgrenze, Übergang: Massenübergang, Stabw.: Standardabweichung, VarK: Varianzkoeffizient. 196
- Tab. 57:** HPLC-Parameter zur Quantifizierung von dG mit $^{15}\text{N}_5$ -dG als interner Standard, nach (Stegmüller et al., 2018). dG: 2'-Desoxyguanosin. 198
- Tab. 58:** MS-Parameter zur Quantifizierung von dG mit $^{15}\text{N}_5$ -dG als interner Standard. CAD: collisionally activated dissociation, CE: collision energy, CEP: collision cell entrance potential, CUR: curtain gas, CXP: cell exit potential, DP: declustering potential, dtime: dwell time, EP: entrance potential, FP: focusing potential, GS1: nebulizer gas, GS2: heater gas, IS: ion spray voltage, Q1: quadrupol 1, Q3: quadrupol 3, TEMP: ion source temperature. dG: 2'-Desoxyguanosin, m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. 200
- Tab. 59:** Pipettierschema der Konzentrationsreihe von dG mit internen Standard $^{15}\text{N}_5$ -dG. Die Endkonzentrationen wurden für ein Gesamtvolumen von 200 μL /Konzentration angesetzt. dG: 2'-Desoxyguanosin, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung. 201
- Tab. 60:** Kalibrierung von dG mit Validierungsparametern und $^{15}\text{N}_5$ -dG als internem Standard. Analyt: dG, AUC: area under the curve, dG: 2'-Desoxyguanosin, IS: internen Standard ($^{15}\text{N}_5$ -dG), m: Mittelwert, LOD: Detektionsgrenze, LOQ: Quantifizierungsgrenze, Übergang: Massenübergang, Stabw.: Standardabweichung, VarK: Varianzkoeffizient. 201
- Tab. 61:** Lösungen und Suspensionen für Untersuchungen der Reaktivität. *) Vorliegen als Suspension; erst vollständige Lösung im Reaktionsansatz. 203
- Tab. 62:** Reaktionsansatz mit AcA aus saurer Hydrolyse. *) Reaktant: N-Acetyl-L-cystein (AcCys), N_α -Acetyl-L-lysin (AcLys), 2'-Desoxyadenosin (dA), 2'-Desoxycytosin (dC), 2'-Desoxyguanosin (dG) oder 2'-Desoxythymidin (dT). DHDMMF: 2,5-Dihydro-2,5-dimethoxy-2-methylfuran, SL: Stammlösung. 203

- Tab. 63:** Ansatz für Reaktion in chemico mit AcA aus Synthese mit DMDO. *) Puffer: K_2HPO_4 (SL 500 mM), Tris-HCl (SL 500 mM) oder $(NH_4)_2CO_3$ (SL 100 mM) mit pH 5, 7,4 oder 9. **) Testsubstanz: 3-Acetylacrolein (AcA) oder 2-Methylfuran (MF). ***) Reaktant: N-Acetyl-L-cystein (AcCys), N_α -Acetyl-lysin (AcLys), 2'-Desoxyadenosin (dA), 2'-Desoxycytosin (dC), 2'-Desoxyguanosin (dG) oder 2'-Desoxythymidin (dT). DMDO: Dimethyldioxiran, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor. 204
- Tab. 64:** Ansatz der Stammlösungen von AcA für entsprechende Zwischenverdünnungen und Endlösungen. *) Standard. AcA: 3-Acetylacrolein, DMSO: Dimethylsulfoxid, RL: Reaktionslösung, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung. 205
- Tab. 65:** Ansatz zur Untersuchung der Reaktivität von AcA mit isolierter DNA. *) Puffer: K_2HPO_4 . AcA: 3-Acetylacrolein, RL: Reaktionslösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung. 205
- Tab. 66:** Enzymgehalte und -aktivitäten der RLM und HLM (Herstellerangaben). Unterschiedliche Testverfahren wurden in separaten Spalten aufgeführt. HLM: humane Lebermikrosome, RLM: Rattenlebermikrosome. 207
- Tab. 67:** Rekombinant exprimierte humane Cytochrom P450-Enzyme (Supersomes™). Alle Supersomes enthalten Oxidoreduktase und tw. Cytochrome b_5 . Die CYP-Aktivität wurde mittels spezifischer Assays bestimmt, die den spezifischen Zertifikaten und Tab. 1 zu entnehmen sind. Prot.: Protein. CYP: Cytochrom P450. 208
- Tab. 68:** Lösungen für die Enzyminkubationen. Lagerung der Mikrosomen und Supersomes bei $-80^\circ C$, alle anderen Ansätze bei $-20^\circ C$. IS: Interner Standard. AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial, CYP: Cytochrom P450. 209
- Tab. 69:** Konzentrationsreihe von MF für die enzymatische Inkubation. LM: Lösungsmittel, MF: 2-Methylfuran, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung. 210
- Tab. 70:** Inkubationsansatz der Mikrosomen oder Supersomes™. IS: Interner Standard, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung. *) Tris-Puffer für CYP 2A6 und CYP 2C9; K_2HPO_4 -Puffer für alle anderen Supersomes und Mikrosomen. **) Wird nicht zum Inkubationsvolumen gezählt. CYP: Cytochrom P450, MF: 2-Methylfuran, IS: interner Standard (AcLys-BDA, AcLys: N_α -Acetyl-L-Lysin, BDA: cis-2-Buten-1,4-dial). 210
- Tab. 71:** Lösungen für die Zellkultur permanenter Zelllinien. Lagerung aller Lösungen bei $4^\circ C$. SL: Stammlösung, GL: Gebrauchslösung. 212
- Tab. 72:** Benötigte Mengen an Medium und Trypsin/EDTA für unterschiedliche Kulturflaschengrößen. 213
- Tab. 73:** Lösungen für die Isolierung primärer Rattenhepatozyten. Lagerung aller Lösungen bei $4^\circ C$. SL: Stammlösung, GL: Gebrauchslösung. 215
- Tab. 74:** Lösungen für den Resazurin-Reduktions-Test zur Bestimmung der Zytotoxizität. Lagerung aller Lösungen bei $4^\circ C$. Während die Resazurin-SL 4 Wochen haltbar ist, wurde die Resazurin-Puffer-Lösung vor Gebrauch frisch angesetzt. GL: Gebrauchslösung, SL: Stammlösung. 217
- Tab. 75:** Inkubationsbedingungen und -ansätze für Resazurin-Reduktions-Assay mit HepG2-Zellen und pRH. IL: Inkubationslösung, NK: Negativkontrolle, PK: Positivkontrolle, ZV: Zwischenverdünnung. . 220
- Tab. 76:** Chemikalien und Lösungen für die Inkubation. Lagerung bei $4^\circ C$ 223
- Tab. 77:** Konzentrationsreihe von MF und AcA für Inkubationen der pRH. AcA: 3-Acetylacrolein, MF: 2-Methylfuran, pRH: primäre Rattenhepatozyten, SL: Stammlösung, VF: Verdünnungsfaktor, ZV: Zwischenverdünnung. 223
- Tab. 78:** Lösungen und Ansätze für die Probenaufarbeitung von Aminosäure-Addukte in Zellüberstände pRH. Lagerung der Puffer bei $4^\circ C$ 225

Tab. 79: Lösungen für die Isolierung von DNA aus Zellen. Lagerung der aliquotierten Enzyme bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, aller anderen Puffer und Lösungen bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$	226
Tab. 80: Lösungen für die enzymatische Hydrolyse von DNA. Lagerung der aliquotierten Enzyme bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, Puffer und weiteres bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$	227
Tab. 81: Enzyme und deren Mengen für die enzymatische Hydrolyse von DNA.....	228

Anhang

Eigene Publikationen

Es wurden Teil der Arbeit in folgenden Publikationen bereits veröffentlicht.

Zeitschriftenartikel

- Kirsch, V.; Bakuradze, T.; Richling, E. (2020): Toxicological testing of syringaresinol and enterolignans. *Current Research in Toxicology*, 1, S. 104-110.
- Röhrig, T.; Kirsch, V.; Schipp, D.; Galan, J.; Richling, E. (2019): Absorption of anthocyanin rutosides after consumption of a blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67 (24), S. 6792-6797.

Vorträge

- Kirsch, V.; Richling, E.: Lignane – Toxikologisch relevante Pflanzeninhaltsstoffe? Jahrestagung des Regionalverbandes "Südwest" der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (Gießen, 2018)
- Kirsch, V.; Richling, E.: 2-Methylfuran – Metabolic activation and adduct formation. 6th German Pharm-Tox Summit 2021 der German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT) (digital, 2021)

Poster

- Kirsch, V.; Bakuradze, T.; Richling, E. (2018): Zyto- und genotoxische *in-vitro*-Untersuchungen von 2-Methylfuran und Derivaten. 47. Lebensmittelchemikertag der Gesellschaft deutscher Chemiker (GdCh) (Berlin, 2018)

Messen

- Kirsch, V.; Becker, D.; Weingart, P.; Saynisch, R.; Akermann, A.; Weiermüller, J.; Ulber, R.; Thiel, W.; Richling, E.: Bioval – Valorization of Brewers' spent grain.ACHEMA (Frankfurt, 2018)

Lebenslauf

Hochschulbildung

- 10/2017–
03/2021 **Promotion**
Technische Universität Kaiserslautern
Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Elke Richling
- 10/2015–
09/2017 **Master of Science**, Studium der Lebensmittelchemie mit Abschluss
Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie. Titel der Abschlussarbeit:
„Toxikologische Untersuchungen ausgewählter Substanzen aus Biertreber“
(September 2017)
Auszeichnung der Abschlussarbeit, Preis der Kreissparkassenstiftung 2017
- 04/2016–
09/2016 **Forschungsarbeit**
Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie. Titel der Arbeit:
„Modifizierung des Comet-Assays zur Erfassung der DNA-Reparatur in Lymphozyten“ (September 2016)
- 04/2013–
09/2015 **Bachelor of Science**, Studium der Lebensmittelchemie mit Abschluss
Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie. Titel der Abschlussarbeit:
„Untersuchung auf wesentliche Inhaltsstoffe und lebensmittelrechtliche Beurteilung des natürlichen Mineralwassers Meerjungfrauenquell“
(September 2015)

Weiterbildungen

- 09/2021–
12/2021 Weiterbildung „**Clinical Research Management**“
HGA – Gesundheitsakademie Hessen, Hanau
- Seit 2018 Teilnahme am Weiterbildungsprogramm der Gesellschaft für Toxikologie in der DGPT zur **Fachtoxikologin**, absolvierte Kurse:
- Organtoxikologie und -pathologie I (Erfurt, 2018)
 - Organtoxikologie und -pathologie II (Erfurt, 2019)
 - Chemische Kanzerogenese und Mutagenese (München, 2019)
 - Lebensmitteltoxikologie (Kaiserslautern, 2019)
 - Molekulare Zelltoxikologie (München, 2020)
 - Fremdstoffmetabolismus (Online-Kurs, Zürich, 2021)
 - Analytische Toxikologie (Online-Kurs, Basel, 2021)

Mitgliedschaften

- Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT; GT)
- Gesellschaft Deutsch Chemiker e.V. (GDCh)

Danke

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in der Zeit meiner Promotion unterstützt und bereichert haben.

An erster Stelle gilt mein Dank *Frau Professor Dr. Elke Richling* für die Möglichkeit dieses spannende Thema in ihrem Arbeitskreis übernehmen zu dürfen, aber auch für das entgegengebrachte Vertrauen meine Ideen frei umsetzen zu können.

Herrn Professor Dr. Georg Manolikakes danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur sowie seine Zeit für Diskussionen über die Aufklärung chemischer Strukturen.

Ich bedanke mich bei *Herrn Professor Dr. Werner Thiel* für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes, aber auch die angenehme Zusammenarbeit im BioVal-Projekt.

In diesem Zuge möchte ich mich ebenfalls bei *Herrn Professor Dr. Gerhard Eisenbrand* und *Herrn Dr. Alexander Cartus* für die fachliche Unterstützung bedanken.

Da die Promotion kein Einzelkampf ist, ein Dankeschön an meine Arbeitsgruppe für die tolle Zusammenarbeit, hilfreichen Diskussionen und freundschaftlichen Mittagessen. Ein besonderer Dank gilt *Daniela Becker*, die nicht nur als zuverlässige Kollegin alle BioVal-Veranstaltungen mit bestritten hat und meine Arbeit stets kritisch hinterfragt hat, sondern auch zu eine meiner besten Freunde geworden ist. Zusammen mit *Dorothea Karlstätter*, vielen Dank für die unzähligen, lustigen, späte Abende im Labor, Büro und in den Bergen. Ich bedanke mich bei *Dr. Simone Stegmüller* für viele ausdauernde Diskussionen rund um die Themen LC-MS-Analytik & Metabolismus sowie ihre Zeit zur gründlichen Durchsicht dieser Arbeit. Mein Dank gilt zudem *Janina Leidner* und *Hanna Becker* für die Unterstützung im Labor. Nicht zu vergessen sind meine ehemaligen KollegInnen *Dr. Tamara Bakuradze*, *Dr. Teresa Röhrig*, *Dr. Katharina Goerke*, *Christine Fuchs*, *Jonathan Kremer*, *Kirsten Berger*, *Celina Göttel*, *Daniel Bohlen*, *Nadine Beißmann*, *Tobias Jochum*, wie auch *Eva Gorgus*, *Sylvia Schmitt* und nicht zuletzt *Ingrid Hemm* für die nette Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei *Dr. Harald Kelm* und *Christiane Müller*, die nie müde wurden meine NMRs zu messen, Sonderwünsche zu erfüllen und wertvolle Anregungen zu geben. Hier auch ein Dankeschön an *Dr. Sarah Reeb* und *Daniel Bellaire* für die Besprechung von NMR-Spektren und Messung der DOSY-Spektren. *Ruth Bergsträsser* danke ich für die Elementaranalysen.

Ein herzliches Danke an *Sara Khorshid* und *Elisabeth Schwind*, die mich nicht nur durch mein Studium begleitet haben, sondern auch alle Höhen und Tiefen mit mir durchstehen.

Matthias Schäfer, einfach Danke!, der mit seiner gelassenen, positiven Art vieles mitgemacht und gleichzeitig alles leichter gemacht hat. Ebenso Danke meinen Eltern *Regina & Matthias Kirsch* wie meinem Bruder *Moritz Kirsch*, die mich immer bedingungslos unterstützen und denen ich alles verdanke.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Verena Kirsch, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Metabolismus und Toxizität von 2-Methylfuran“ selbstständig verfasst und nur die in der Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmitteln genutzt habe.

Bestandteile dieser Arbeit wurden vor der Erstellung dieser Dissertation bereits auf Tagungen und in Printmedien veröffentlicht (siehe Publikationsliste).

Die vorliegende Dissertation habe ich weder im Ganzen noch in Teilen als Prüfungsarbeit bei einem anderen Fachbereich eingereicht und kein anderes Promotionsverfahren bei einer anderen Hochschule beantragt oder eröffnet. Die geltende Promotionsordnung des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern vom 25. März 2014 ist mir bekannt.

Kaiserslautern, den 08.04.2022

(Verena Kirsch)

*“Nothing in life is to be feared,
it is only to be understood.”
- Marie Curie, 1894*