

**Untersuchungen zur Genotoxizität von Zigarettenrauch-  
Inhaltsstoffen und Induktion von Cytochrom P450 1A1  
in primären Zellkulturen aus Schweineharnblasen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Sabine Plöttner  
aus Lünen

August 2006



Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen des Internationalen Graduiertenkollegs „*Molecular Mechanisms of Food Toxicology*“ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Zeitraum von Juni 2002 bis Juli 2006 am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund angefertigt.

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Dr. Hermann M. Bolt  
1. Koreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich  
2. Koreferent: Prof. Dr. Hartmut Greven

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2006



Teile der vorliegenden Dissertation wurden im Rahmen des Drittmittelprojekts „*Development and application of an in vitro system for detection and quantitation of urothelial genotoxicity of tobacco smoke-specific constituents utilizing classical genotoxic endpoints and cDNA expression profiling*“ durch das „*Philip Morris External Research Program*“ gefördert.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Zeitschrift veröffentlicht:

*Toxicology* 207: 255 – 269

Wolf, A., Kutz, A., Plöttner, S., Behm, C., Bolt, H. M., Föllmann, W. und Kuhlmann, J. (2005). The effect of benzo(a)pyrene on porcine urinary bladder epithelial cells analyzed for the expression of selected genes and cellular toxicological endpoints.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Allgemeiner Hintergrund zur Toxikologie des Tabakrauchens</b>	<b>1</b>
1.1.1	Historische Aspekte zum Tabakrauchen	1
1.1.2	Chemie des Zigarettenrauchs	2
1.1.3	Metabolische Aktivierung von Tabakrauch-Kanzerogenen	4
1.2	<b>Harnblasenkrebs</b>	<b>8</b>
1.2.1	Allgemeines zum Harnblasenkrebs	8
1.2.2	Risikofaktor aromatische Amine	8
1.2.3	Risikofaktor Zigarettenrauchen	10
1.3	<b>Verbundprojekt zur Untersuchung von Wirkungen des Zigarettenrauchs auf das Harnblasenepithel</b>	<b>12</b>
1.3.1	Das benützte Zellkulturmodell	13
1.3.2	Die Modellsubstanzen	14
1.4	<b>Aufgabenstellung der Dissertation</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
2.1	<b>Material</b>	<b>18</b>
2.1.1	Probenmaterial	18
2.1.2	Chemikalien	18
2.1.3	Gesamtpartikelmasse aus Zigarettenrauchkondensat	19
2.1.4	Antikörper, Enzyme und andere Proteine	19
2.1.5	Kits	20
2.1.6	Verbrauchsmaterial	20
2.1.7	Geräte	20
2.1.8	Puffer und Lösungen	22
2.1.9	Software	27
2.2	<b>Methoden</b>	<b>28</b>
2.2.1	Kultivierung der Schweineharnblasenepithelzellen (PUBEC)	28
2.2.2	Neutralrot-Test	32
2.2.3	COMET Assay (alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese)	33
2.2.4	Modifizierter COMET Assay mit Reparaturenzym zur Bestimmung oxidativer Basenveränderungen	38

2.2.5	Mikrokern-Test ( <i>in vitro</i> )	39
2.2.6	Zellhomogenisierung	41
2.2.7	Bicinchoninsäure Assay	41
2.2.8	SDS PAGE („sodium dodecyl sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis“)	43
2.2.9	Western Blot	44
2.2.10	Durchflusszytometrie: Intrazellulärer Nachweis von Enzyminduktion	45
2.2.11	Statistische Auswertung der Inkubationsversuche	48
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Toxikologische Aspekte von Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen: Untersuchungen zur Zytotoxizität und Genotoxizität in PUBEC</b>	<b>49</b>
3.1.1	Zytotoxizität von Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen in PUBEC – Neutralrot-Testergebnisse	49
3.1.2	Genotoxizität von Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen in PUBEC – COMET Assay Ergebnisse (konventionelle Methode)	55
3.1.3	Oxidative DNA-Schäden durch Zigarettenrauch-Inhaltsstoffe in PUBEC – COMET Assay Ergebnisse (modifizierte Methode mit Reparaturenzym)	61
3.1.4	Genotoxizität von Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen in PUBEC – Mikrokern-Testergebnisse	66
<b>3.2</b>	<b>Biochemische Primäreffekte von Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen in PUBEC: Untersuchungen zur Cytochrom P450 1A1 Induktion</b>	<b>73</b>
3.2.1	Induktion von CYP1A1 auf Proteinebene in PUBEC – Western Blot Ergebnisse	73
3.2.2	Induktion von CYP1A1 auf Einzelzellebene in PUBEC – FACS Ergebnisse	79
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>87</b>
<b>4.1</b>	<b>Methodische Diskussion</b>	<b>88</b>
4.1.1	Genotoxizitätstests: COMET Assay und Mikrokern-Test	88
4.1.2	Intrazellulärer Nachweis von CYP1A1 mittels Durchflusszytometrie	90
<b>4.2</b>	<b>Allgemeine Diskussion</b>	<b>92</b>
4.2.1	Induktion von Cytochrom P450 1A1 und genotoxische Effekte von Einzelkomponenten aus dem Zigarettenrauch in PUBEC	92
4.2.2	Induktion von Cytochrom P450 1A1 und genotoxische Effekte von binären Substanzgemischen aus dem Zigarettenrauch in PUBEC	96
4.2.3	Induktion von Cytochrom P450 1A1 und genotoxische Effekte von komplexen Substanzgemischen aus dem Zigarettenrauch in PUBEC	99
<b>4.3</b>	<b>Ausblick</b>	<b>103</b>

---

<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>123</b>
<b>7.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>123</b>
<b>7.2</b>	<b>Weitere Testergebnisse</b>	<b>125</b>
7.2.1	Weitere COMET Assay Ergebnisse	125
7.2.2	Weitere Mikrokern-Testergebnisse	129
7.2.3	Weitere Western Blot Ergebnisse	134
7.2.4	Weitere FACS Ergebnisse	137
<b>7.3</b>	<b>Statistik</b>	<b>139</b>
7.3.1	Statistik zum COMET Assay	139
7.3.2	Statistik zum Mikrokern-Test	142
7.3.3	Statistik zur Western Blot Analyse	146
7.3.4	Statistik zur Durchflusszytometrie	148
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>150</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>152</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeiner Hintergrund zur Toxikologie des Tabakrauchens

### 1.1.1 Historische Aspekte zum Tabakrauchen

Die Tabakpflanze (*Nicotiana spec.*) ist in Amerika beheimatet, und ihr Gebrauch war ursprünglich auf diesen Kontinent begrenzt. Archäologische Funde deuten darauf hin, dass die Mayas bereits im 1. Jh. v. Chr. vermutlich zu kultischen Zwecken Tabakblätter rauchten (SLADE 1997, PROCTOR 2001). Die Tabakpflanze und ihre Anwendung in verschiedenen Formen, vor allem Schnupfen und Priemen, kamen mit der Entdeckung Amerikas durch Columbus nach Europa und erfuhren eine rapide Ausbreitung in den europäischen Ländern und in der restlichen Welt (IARC 1986, HUBER & PANDINA 1997). Die Gewohnheit des Rauchens von Tabak verbreitete sich jedoch erst Jahrhunderte später, anfangs in höheren und danach auch in niedrigeren gesellschaftlichen Schichten (HUBER & PANDINA 1997). Eine drastische Zunahme Tabakkonsums kam in der zweiten Hälfte des 19. Jh. als Folge der Massenproduktion von Zigaretten auf (IARC 1986, HUBER & PANDINA 1997). Zunächst waren es hauptsächlich Männer, die Zigaretten rauchten. Erst Jahrzehnte später begannen auch Frauen mit dem Rauchen (SASCO et al. 2004). Heute werden Tabakprodukte von weltweit mehr als einer Milliarde Menschen konsumiert: ca. 250 Millionen Frauen und annähernd eine Milliarde Männer rauchen täglich (MACKAY & ERIKSEN 2002). Man schätzt, dass weltweit 30 Millionen Menschen pro Jahr mit dem Rauchen beginnen und jährlich mehr als 10 Millionen an den Folgen des Tabakkonsums sterben werden, sofern nicht 20 Millionen aktuelle Raucher sofort das Rauchen aufgeben (BOYLE et al. 2006).

Mit der Ausbreitung des Tabakgenusses auf immer größere Bevölkerungsgruppen wurden zunehmend adverse Effekte bei Tabakkonsumenten beobachtet (PROCTOR 2001). Ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von Tumoren durch den Gebrauch von Tabak wurde schon ab dem 18. Jh. dokumentiert. Bereits 1761 warnte HILL vor der Entstehung von Nasentumoren im Zusammenhang mit der Anwendung von Schnupftabak, und SÖMMERING dokumentierte 1795 das gehäufte Auftreten von Lippenkrebs bei Pfeifenrauchern. Im 19. Jh. wurde die Verbindung zwischen dem Genuss von Tabak und dem Auftreten äußerlich sichtbarer Tumoren durch den Einsatz elementarer Statistik erforscht. Verbesserte Untersuchungsmethoden durch neue Technologien haben es jedoch erst im 20. Jh. ermöglicht, verschiedene, bis dahin selten diagnostizierte Tumorerkrankungen innerer Organe, wie z. B. der Lunge, zu erfassen und den Zusammenhang zwischen Krebsentstehung und Tabakkonsum unter Verwendung ausgereifter statistischer Methoden zu belegen (PROCTOR 2001). Heute ist anerkannt, dass der Gebrauch von Tabakprodukten für die Krebsentstehung in verschiedenen Organen des Menschen verantwortlich ist (IARC 1986, 2004). Das Rauchen stellt das am weitesten verbreitete Bindeglied zwischen der Exposition gegenüber bekannten Kanzerogenen und der Krebsmortalität dar (HECHT 2003).

## 1.1.2 Chemie des Zigarettenrauchs

Beim Rauchen von Tabak wird organisches Material unvollständig verbrannt, und es entsteht ein Aerosol mit einem Gewicht von ca. 400 – 500 mg pro Zigarette, das ungefähr  $5 \times 10^9$  Partikel pro Milliliter enthält (HOFFMANN et al. 1978). Die beim Abrauchen einer Zigarette gebildeten Verbrennungsprodukte unterscheidet man in Haupt- und Nebenstromrauch. Ersterer entsteht während des Zuges an der Zigarette und wird inhalativ vom Raucher über das Mundstück aufgenommen. Nebenstromrauch bezeichnet den Rauchanteil, der während der Zugpausen beim Verglimmen des Tabaks gebildet und in die Umgebungsluft abgegeben wird (HOFFMANN & WYNDER 1997). Hauptstromrauch ist ein komplexes Aerosol aus zwei Phasen, die man unter experimentellen Bedingungen voneinander trennen kann. Die Gasphase ist willkürlich als die Fraktion des Rauchaerosols definiert, die durch einen Cambridge Glasfaserfilter strömt. Der Rauchanteil, der auf diesem Filter festgehalten wird, stellt die Partikelphase dar. Mit Gewichtsanteilen von 90 – 96% macht die Gasphase den größten Anteil des Hauptstromrauches einer filterlosen Zigarette aus (HOFFMANN & HOFFMANN 1997). Sie besteht vorwiegend aus Stickstoff (50 – 60%), Kohlendioxid (8 – 14%), Sauerstoff (10 – 15%) und Kohlenmonoxid (3 – 6%). Die partikuläre Masse macht nur ca. 4 – 9% des Zigarettenrauches aus (HOFFMANN et al. 1978). Wichtigste Bestandteile der Partikelphase sind Nikotin (0,2 – 0,6% des gesamten Rauches) und eine Vielzahl von Kanzerogenen, die jedoch nur einen verhältnismäßig geringen Gewichtsanteil ausmachen (HOFFMANN et al. 2001). In Tab. 1 sind einige ausgewählte Inhaltsstoffe des Zigaretten-Hauptstromrauches aufgeführt.

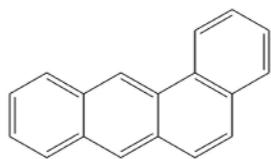
**Tab. 1:** Zigarettenrauch-Inhaltsstoffe im Hauptstromrauch pro abgerauchter Zigarette. Die Werte wurden entnommen aus IARC 1986, 2004 und ROEMER et al. 2004 und sind in dieser Tabelle zusammengefasst worden.

Zigarettenrauch-Inhaltsstoff pro abgerauchter Zigarette		Mit Filter			Ohne Filter
		„ultra low tar“	„low tar“	„full flavor“	„full flavor“
Teer	mg	1,6 – 5,5	8,4 – 11,8	11,4 – 14,5	14,5 – 23,1
Nikotin	mg	0,2 – 0,5	0,8 – 1,0	1,1	1 – 2,3
Formaldehyd	µg	3,7 – 9,5	16,1 – 23,1	29,3 – 75,5	48,1 – 100
Acrylnitril	µg	2,7 – 5,7	9,2 – 13,5	13,6 – 15,3	19,6
Benzol	µg	14,4 – 25,9	31,2 – 52,5	52,0 – 58,9	20 – 57,2
2-Naphthylamin	ng	1,5 – 4,7	5,9 – 9,6	3,5 – 8,7	1,7 – 22
2-Toluidin	ng	8,6 – 28,7	47,0 – 66,6	42,6 – 70,6	32 – 160
4-Aminobiphenyl	ng	0,3 – 0,8	1,3 – 1,8	0,7 – 1,7	2,3 – 4,6
Benz[a]anthracen	ng	2,6 – 6,5	9,4 – 16,7	14,6 – 17,27	20 – 70
Benzo[a]pyren	ng	1,5 – 3,8	6,0 – 9,3	8,1 – 9,5	14,5 – 40
Dibenz[a,h]anthracen	ng	< 0,6	0,7 – 1,2	1,1 – 1,3	1,8 – 4
Dimethylnitrosamin	ng	< 5,00	< 5,0	4,1 – 15,2	9,4 – 76
N-Nitrosoornikotin (NNK)	ng	29 – 83	111 – 196	43 – 196	200 – 3000
4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNN)	ng	12,6 – 56,4	86,1 – 131,2	80,4 – 128,1	80 – 770

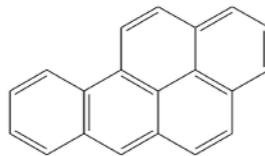
Bis 1996 waren im Hauptstromrauch von Zigaretten ca. 4.800 Substanzen identifiziert worden (GREEN & RODGMAN 1996). Unter diesen sind allein mindestens 70 bekannte Kanzerogene (IARC 1986, SMITH et al. 1997, 2000, 2001, HOFFMANN et al. 2001). Sie bilden das Verbindungsglied zwischen Nikotin-Abhängigkeit und der Entstehung von Krebs (HECHT 1999). Nikotin selbst ist nicht krebserregend. Allerdings ist es für die Abhängigkeit verantwortlich und damit dafür, dass Raucher mit jeder Zigarette eine Vielzahl von kanzerogenen Stoffen zu sich nehmen. Die Art des Rauchens und die Gesamtzahl täglich gerauchter Zigaretten bestimmen hierbei die Aufnahmemenge von Nikotin und auf diese Weise auch die Menge von krebserzeugenden Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen, die inhaliert werden (DJORDJEVIC et al. 1997).

Zu den Hauptklassen der im Zigarettenrauch vertretenen kanzerogenen Substanzen gehören polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Nitrosamine, aromatische Amine, heterozyklische Amine, Aldehyde und verschiedene andere organische sowie anorganische Verbindungen (IARC 1986, HOFFMANN & HOFFMANN 1997). In Abb. 1 sind beispielhaft einige krebserregende organische Verbindungen verschiedener Substanzklassen dargestellt.

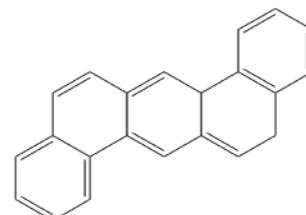
### Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe



Benz[a]anthracen

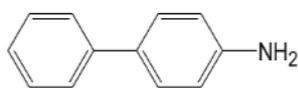


Benzo[a]pyren

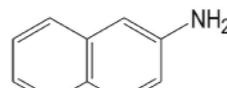


Dibenz[a,h]anthracen

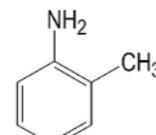
### Aromatische Amine



4-Aminobiphenyl

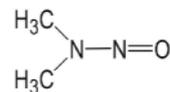


2-Naphthylamin

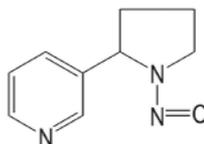


2-Toluidin

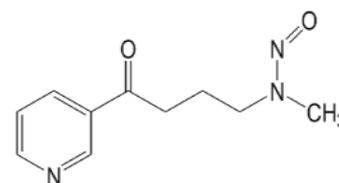
### Nitrosamine



Dimethylnitrosamin

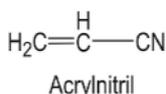


N-Nitrosomikotin

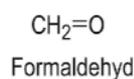


4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon

### Andere organische Verbindungen



Acrylnitril



Formaldehyd



Benzol

Abb. 1: Strukturformeln karzinogener organischer Verbindungen, die im Zigarettenrauch vorkommen.

### 1.1.3 Metabolische Aktivierung von Tabakrauch-Kanzerogenen

Die meisten Zigarettenrauch-Kanzerogene sind in ihrer ursprünglichen Form chemisch inert (HECHT 2003). Nach der Verteilung im Organismus und der metabolischen Aktivierung dieser Prokanzerogene zu genotoxischen Zwischenprodukten können sie jedoch mit zellulären Makromolekülen, wie Proteinen oder Nukleinsäuren, reagieren (GUENGERICH & SHIMADA 1991). Eine zentrale Rolle bei dieser Aktivierung spielen fremdstoffmetabolisierende Enzyme, deren Aufgabe darin besteht, die Akkumulation von Fremdstoffen im Organismus zu verhindern. Lipophile Substrate werden über enzymkatalysierte Reaktionen in hydrophilere Produkte umgewandelt, um sie besser ausscheidbar zu machen. Der Hauptanteil des Fremdstoffmetabolismus findet in der Leber statt. Aber auch andere Organe sind aufgrund ihrer Ausstattung mit entsprechenden Enzymen metabolisch kompetent.

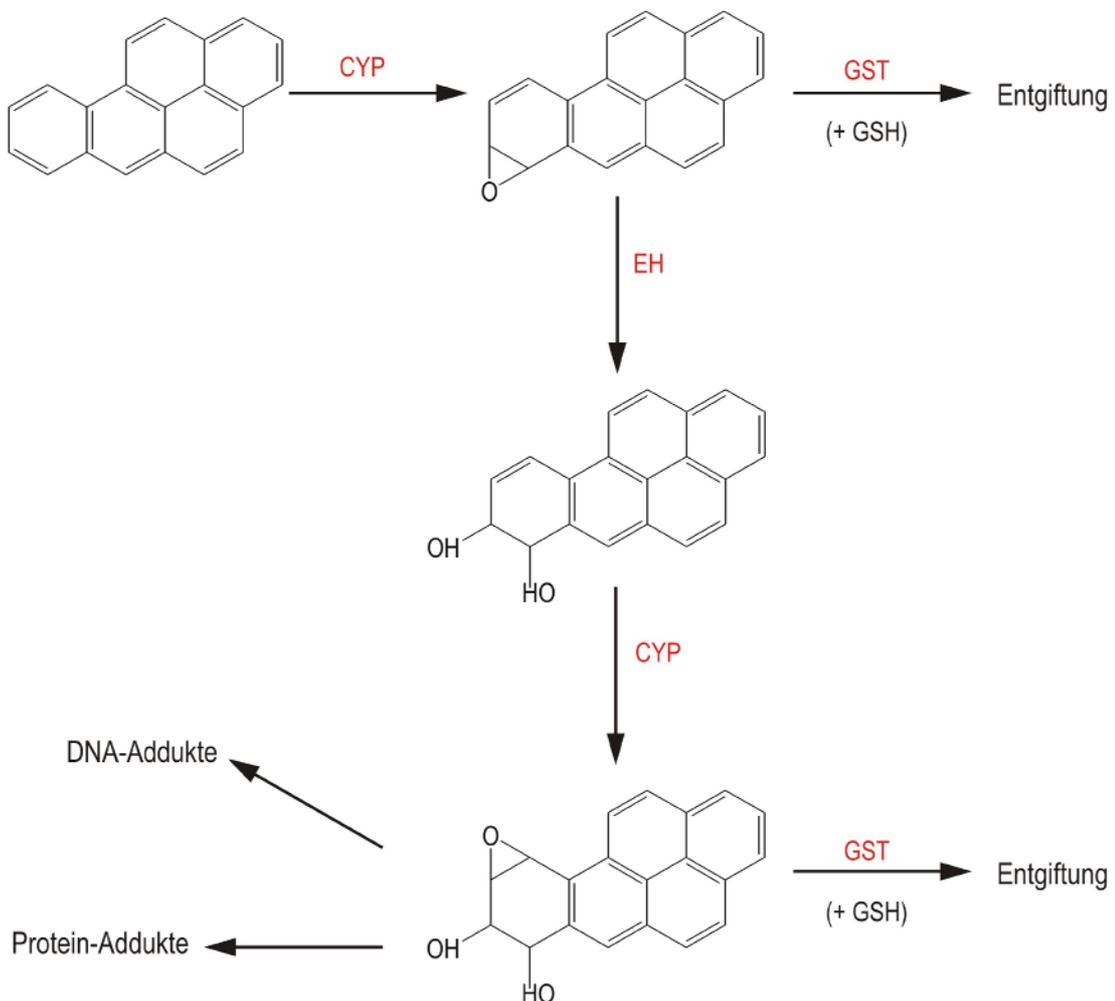
In einer ersten enzymatischen Reaktion (Phase I) werden im Fremdstoff durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse funktionelle Gruppen eingefügt oder freigegeben. Nach diesem Schritt katalysieren verschiedene Transferasen die Konjugation des funktionalisierten Fremdstoffes (Phase II) mit einem endogenen Substrat, wie z. B. mit Glutathion, Glucuronsäure, Acetyl- oder Sulfonylgruppen. Hierdurch wird die Wasserlöslichkeit noch weiter erhöht, und die Substanz kann renal oder biliär ausgeschieden werden.

Wichtige Vertreter der Phase I sind die Enzyme der Cytochrom P450 Superfamilie (CYP). Sie katalysieren den Transfer eines Sauerstoffatoms auf einen Fremdstoff (GUENGERICH 2001). Durch die CYP Enzyme wird jedoch nicht immer die Toxizität des Fremdstoffes reduziert, sondern sie kann deutlich erhöht werden, wenn als Folge der Oxidation reaktive elektrophile Zwischenprodukte entstehen, die Addukte mit zellulären Makromolekülen bilden (LANG & PELKONEN 1999). Werden diese nicht durch Reparaturmechanismen entfernt, kann es darauf folgend zur Entstehung von Mutationen und zur Initiation der Kanzerogenese kommen. Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder Proto-Onkogenen, die einen Verlust der Kontrolle zellulärer Regelkreisläufe, welche eine normale Zellproliferation und die zelluläre Homöostase steuern, zur Folge haben, sind hierbei von zentraler Bedeutung (HANAHAN & WEINBERG 2000).

Die Balance zwischen der metabolischen Aktivierung von prokanzerogenen Stoffen zu DNA-reaktiven Metaboliten und ihrer Detoxifizierung, meistens durch Enzyme der Phase II, hat einen wichtigen Einfluss auf das Krebsrisiko. Im Folgenden wird beispielhaft die metabolische Aktivierung von einigen Prokanzerogenen, die im Zigarettenrauch vorkommen, erläutert.

### Metabolische Aktivierung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen am Beispiel von Benzo[a]pyren

Benzo[a]pyren (B[a]P) wurde von COOPER et al. (1954) als erster karzinogener polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff (PAK) im Zigarettenrauch identifiziert. Es ist der vermutlich bestuntersuchte Vertreter der PAK und gilt als Modellsubstanz für diese Stoffklasse (PHILIPS 1983). B[a]P ist chemisch inert und muss metabolisch aktiviert werden, um seine karzinogene Wirkung entfalten zu können (SIMS et al. 1974). Der im Folgenden beschriebene Weg zur metabolischen Aktivierung von Benzo[a]pyren (Abb. 2) stellt nur einen kleinen Ausschnitt aus dem ansonsten sehr komplexen Metabolismus dar (GELBOIN 1980, CONNEY 1982).



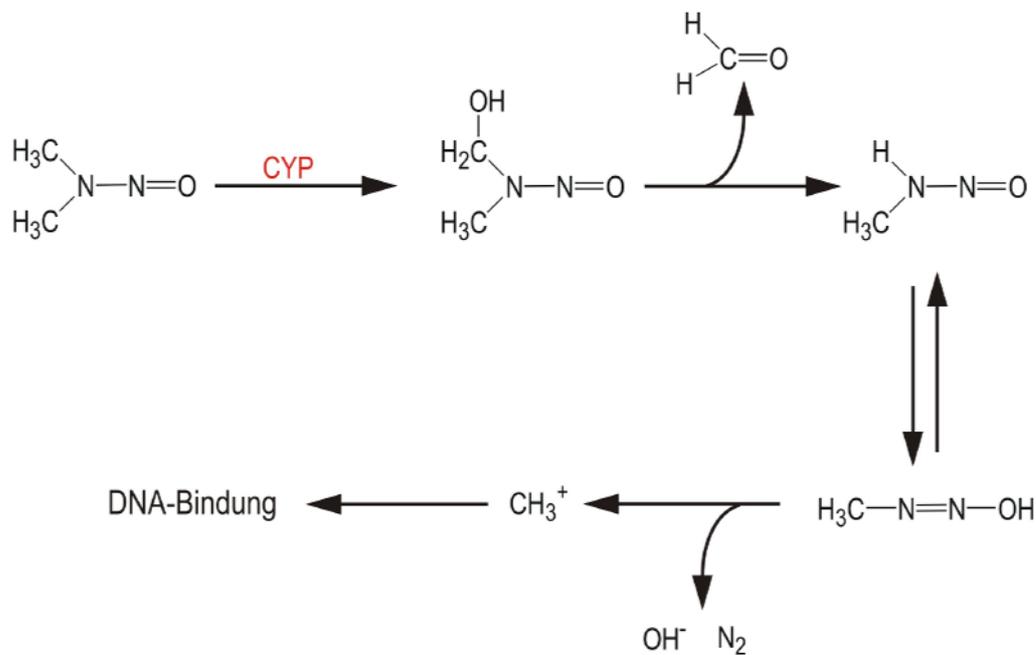
**Abb. 2:** Stark vereinfachter Ausschnitt aus dem Metabolismus von Benzo[a]pyren. Verwendete Abkürzungen: CYP – Cytochrom P450 Enzyme, EH – Epoxidhydratase, GSH – Glutathion, GST – Glutathion-S-Transferase.

Der erste Schritt der metabolischen Aktivierung von Benzo[a]pyren (Abb. 2) besteht in einer Oxidation an der 7,8-Position, die durch Cytochrom P450 1A1 oder 1B1 (CYP1A1 bzw. CYP1B1) vermittelt wird. Das entstandene Benzo[a]pyren-7,8-epoxid kann entweder durch Glutathion-S-Transferasen (GST) mit

Glutathion (GSH) konjugiert und ausgeschieden oder durch eine Epoxidhydrolase (EH) zu B[a]P-7,8-diol hydrolysiert werden. Dieses wiederum bildet ein Substrat für CYP Isoenzyme (z.B. CYP1A1, 1B1 und 3A4), die in einem weiteren oxidativen Schritt die Umsetzung zum Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid katalysieren (THAKKER et al. 1976, BUENING et al. 1978). Dieser Metabolit ist hochreaktiv und kann mit zellulären Makromolekülen reagieren. Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid bindet bevorzugt an der exozyklischen Aminogruppe des Desoxyguanosins (WEINSTEIN et al. 1976). Durch diese Addukte entstehen Mutationen, z. B. im Tumorsuppressorgen p53, bei denen es sich vorwiegend um G•C → T•A Transversionen handelt (EISENSTADT et al. 1982, RUGGERI et al. 1993).

### Metabolische Aktivierung von Nitrosaminen am Beispiel von Dimethylnitrosamin

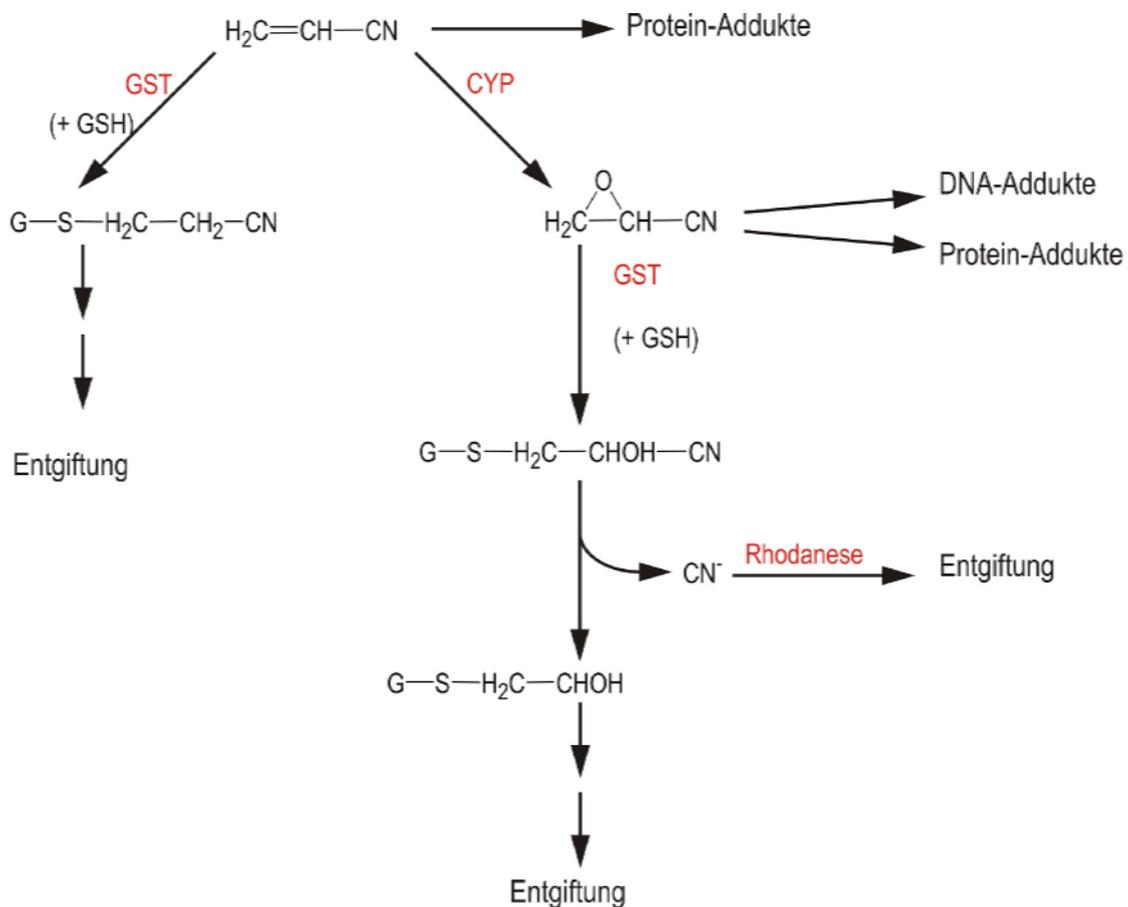
Als erstes Nitrosamin im Zigarettenrauch wurde Dimethylnitrosamin (DMN), ein flüchtiges Nitrosamin, nachgewiesen (RHOADES & JOHNSON 1972). Zur Bildung eines reaktiven, karzinogenen Zwischenprodukts muss DMN, wie andere Nitrosamine auch, metabolisch aktiviert werden (MONTESANO & MAGEE 1970). Dies geschieht über eine  $\alpha$ -C-Hydroxylierung (Abb. 3), die z. B. durch das Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1) katalysiert wird (YANG et al. 1990). Der entstandene Metabolit ist instabil und zerfällt in einer spontanen Reaktion unter Abspaltung von Formaldehyd zu Monomethylnitrosamin. In weiteren Reaktionen entstehen Methyldiazohydroxid und letztendlich ein Carbenium-Ion, das äußerst reaktiv ist und die DNA alkyliert.



**Abb. 3:** Metabolische Aktivierung von Dimethylnitrosamin (modifiziert nach EISENBRAND & KÖHL 1997). Verwendete Abkürzung: CYP – Cytochrom P450 Enzyme

### Metabolische Aktivierung einer organischen Substanz mit aktivierter Doppelbindung am Beispiel von Acrylnitril

Acrylnitril, ein Bestandteil des Hauptstromrauches von Zigaretten (BYRD et al. 1990, DARRALL et al. 1998), wird im Menschen über zwei konkurrierende Reaktionswege metabolisiert (Abb. 4). Der eine führt über die direkte Konjugation des Acrylnitrils mit Glutathion (GSH) durch Glutathion-S-Transferasen (GST) zur Entgiftung und Ausscheidung im Urin. Der andere Weg hingegen führt über oxidativen Metabolismus durch das Cytochrom P450 2E1 (CYP2E1) zur metabolischen Aktivierung von Acrylnitril zum 2-Cyanoethylenoxid (WHYSNER et al. 1998, LÉONARD et al. 1999). Dieses Epoxid ist sehr reaktiv und kann Addukte mit Nukleinsäuren oder zellulären Proteinen bilden (GUENGERICH et al. 1981, PETER et al. 1983). Es wird angenommen, dass 2-Cyanoethylenoxid für die Genotoxizität von Acrylnitril verantwortlich ist (RECIO & SKOPEK 1988). Das reaktive 2-Cyanoethylenoxid ist ein Substrat für Glutathion-S-Transferasen. Nach der Konjugation des Epoxids mit GSH kommt es zur Abspaltung des toxischen Cyanids. Dieses kann enzymatisch in Thiocyanat umgewandelt und im Urin ausgeschieden werden. Insgesamt entstehen durch den oxidativen Pfad viele verschiedene Metaboliten, von denen ein sehr großer Teil im Urin ausgeschieden wird.



**Abb. 4 :** Vereinfachtes Schema zur metabolischen Aktivierung von Acrylnitril (modifiziert nach THIER et al. 2000). Verwendete Abkürzungen: CYP – Cytochrom P450 Enzyme, GSH – Glutathion, GST – Glutathion-S-Transferase.

## 1.2 Harnblasenkrebs

### 1.2.1 Allgemeines zum Harnblasenkrebs

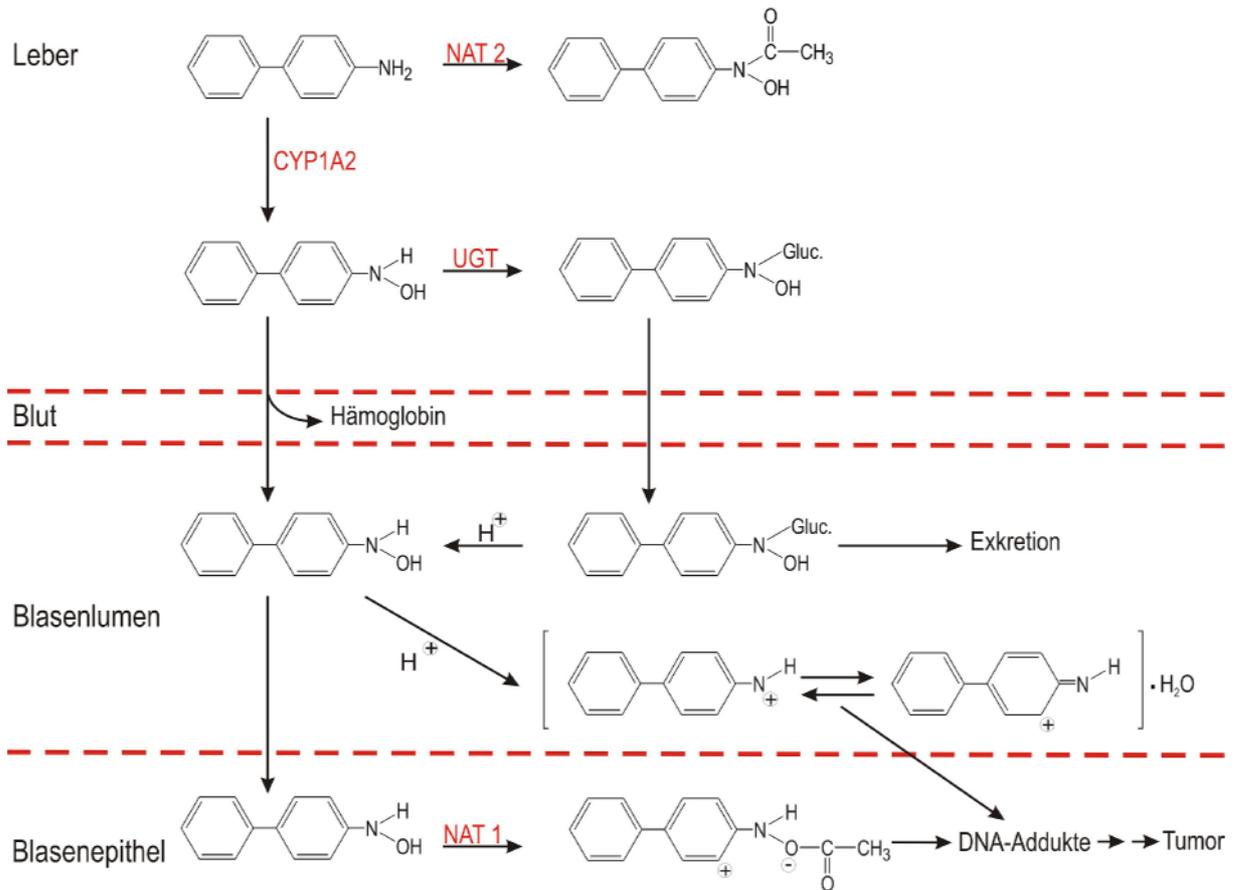
Harnblasenkrebs ist die fünfthäufigste Krebserkrankung in der westlichen Welt mit jährlich 336.000 neuen Krebs- und 132.000 Sterbefällen (PARKIN et al. 2001). In Deutschland erkranken pro Jahr ca. 25.950 Menschen an einer „bösartigen Neubildung der Harnblase“, wobei Männer 2,5 Mal so häufig betroffen sind wie Frauen (KREBS IN DEUTSCHLAND 2006). Bei der überwiegenden Anzahl der Harnblasenkrebskrankungen handelt es sich histomorphologisch um Übergangszellkarzinome (95%), die vom Urothel ausgehen. Weniger als 5% der Tumoren sind Plattenepithel- und Adenokarzinome (RÜBBEN & OTTO 2001).

Blasenkrebs wurde als erste Tumorerkrankung des Menschen mit bestimmten Chemikalien als Auslöser in Verbindung gebracht. Vor allem die berufliche Exposition gegenüber aromatischen Aminen ist in Bezug auf die Induktion von Blasenkrebs von zentraler Bedeutung. Weitere Risikofaktoren sind der Gebrauch von arsenhaltigem Trinkwasser, chronische Harnwegsinfektionen mit *Schistosoma*-Spezies, die Strahlentherapie von an die Harnblase angrenzenden Organen, die therapeutische Verwendung alkylirender Substanzen und das Zigarettenrauchen (JOHANSSON & COHEN 1997). Im Jahr 1986 wurde das Tabakrauchen von der Internationalen Agentur für Krebsforschung (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) als wichtigster nicht-arbeitsplatzbezogener Risikofaktor für die Entstehung von Harnblasenkrebs evaluiert (IARC 1986).

### 1.2.2 Risikofaktor aromatische Amine

Der Zusammenhang zwischen der Entstehung von Harnblasenkrebs und der beruflichen Exposition gegenüber aromatischen Aminen ist schon seit langem bekannt. Bereits 1895 publizierte REHN eine Arbeit über das Auftreten von „Blasengeschwülsten“ bei Arbeitern einer Fuchsin-Fabrik. Ursprünglich wurde diese Art von Tumoren als Anilinkrebs bezeichnet. Doch es stellte sich heraus, dass nicht Anilin, sondern Verunreinigungen mit 2-Naphthylamin für den gefundenen Effekt verantwortlich waren. Später konnten neben 2-Naphthylamin auch andere aromatische Amine, wie Benzidin und 4-Aminobiphenyl, als verantwortliche Substanzen für das hohe Blasenkrebsvorkommen bei Arbeitern in der chemischen Industrie identifiziert werden (CASE et al. 1954).

Wie viele andere krebserregende Substanzen müssen auch aromatische Amine zunächst metabolisch aktiviert werden, um mit zellulären Makromolekülen interagieren zu können. Die Hypothese, wie aromatische Amine zur Entstehung von Harnblasenkrebs beim Menschen führen, ist in Abb. 5 für die bekanntermaßen beim Menschen blasenkrebs erzeugende Verbindung 4-Aminobiphenyl (IARC 1972, 1987) schematisch aufgezeigt und wird im Folgenden beschrieben.



**Abb. 5:** Ausschnitt der Biotransformation von 4-Aminobiphenyl bei der Entstehung von Harnblasenkrebs (modifiziert nach KADLUBAR & BADAWI 1995)

Nach seiner Aufnahme in den Organismus wird 4-Aminobiphenyl (4-ABP) in der Leber über zwei konkurrierende Reaktionswege verstoffwechselt. Die metabolische Aktivierung des Arylamins erfolgt über eine Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2) katalysierte N-Hydroxylierung (BUTLER et al. 1989). Durch die N-Acetyltransferase 2 (NAT 2) wird das Arylamin detoxifiziert (HEIN 1988). Der N-hydroxylierte Metabolit gelangt entweder direkt in die Blutzirkulation, wo bereits ein großer Anteil des reaktiven Zwischenprodukts kovalent an Hämoglobin bindet (GREEN et al. 1984, BRYANT et al. 1987), oder aber das N-Hydroxy-4-Aminobiphenyl wird in der Leber über UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) mit Glucuronsäure konjugiert (KADLUBAR et al. 1977). Beide Metaboliten werden über das Blut zur Niere transportiert und über renale Filtration in den Harn ausgeschieden. Im sauren Milieu des Blasenlumens kann der glucuronidierte Metabolit hydrolysiert und das N-Hydroxylamin wieder freigesetzt werden (KADLUBAR et al. 1977, POUPKO et al. 1979). Durch Protonierung des N-Hydroxylamins entsteht ein hochreaktives Nitrenium-Ion, das nach Aufnahme in Urothelzellen DNA-Addukte bilden kann. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass das N-Hydroxylamin direkt von der Blasenmucosa aufgenommen und in den Epithelzellen durch eine O-Acetylierung weiter metabolisiert wird. Diese Reaktion wird die N-Acetyltransferase 1 (NAT 1) katalysiert und führt zur Entstehung eines N-Acetoxyarylamins. Dieses kann bei

seinem Zerfall ebenfalls starke Elektrophile bilden, die an die DNA binden und so Mutationen auslösen, die letztendlich zur Krebsentstehung führen können.

### 1.2.3 Risikofaktor Zigarettenrauchen

Verschiedene epidemiologische Studien belegen den Zusammenhang zwischen dem Zigarettenrauchen und der Entstehung von Harnblasenkrebs für beide Geschlechter in verschiedenen Ländern (DOLIN 1991; BRENNAN et al. 2000, 2001). Das Rauchen ist für Männer mit einem 2- bis 4-fach und für Frauen mit einem 1,5- bis 2,5-fach erhöhten Risiko assoziiert, an Blasenkrebs zu erkranken (DOLIN 1991). Sowohl für die Intensität und Dauer des Rauchens als auch für den lebenslangen Konsum von Tabak wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen nachgewiesen (DOLIN 1991). Interessanterweise wurde beobachtet, dass das Blasenkrebsrisiko mit der Anzahl täglich gerauchter Zigaretten bis zu einem Schwellenwert von maximal 15 – 20 Zigaretten pro Tag steigt, nicht jedoch darüber hinaus. Eine sofortige Reduktion dieses Risikos wurde für ehemalige Raucher beobachtet: Bereits nach 1 – 4 Jahren Rauchabstinenz war das Krebsrisiko um über 30% und nach 25 Jahren um über 60% reduziert (BRENNAN et al. 2000, 2001). Von den Harnblasenkrebsfällen in Europa sind bei Männern 66% (BRENNAN et al. 2000) und bei Frauen 30% auf das Rauchen zurückzuführen (BRENNAN et al. 2001).

Obwohl der Zusammenhang zwischen der Harnblasenkrebsentstehung bei Menschen durch das Rauchen epidemiologisch belegt ist, weiß man bis heute nicht, welche der vielen krebserzeugenden Substanzen im Tabakrauch für diesen blasenspezifischen Effekt verantwortlich sind und in welchem Ausmaß. In Bezug auf die chemisch induzierte Harnblasenkarzinogenese des Menschen ist der Zusammenhang mit aromatischen Aminen, vermutlich in Verbindung mit dem saueren pH des Urins, besonders gut verstanden (ROTHMAN et al. 1997, SARKAR et al. 2002). Arylamine kommen daher als potentielle Kandidaten für den harnblasenspezifischen karzinogenen Effekt durch das Zigarettenrauchen in Betracht (BELAND & KADLUBAR 1986).

#### 1.2.3.1 Aromatische Amine im Zigarettenrauch

Aromatische Amine sind Bestandteile des Zigarettenhaupt- und Nebenstromrauches (PARTIANAKOS & HOFFMANN 1979, PIERACCINI et al. 1992, LUCERI et al. 1993, STABBERT et al. 2003). Als erste Arylamine wurden 1- und 2-Naphthylamin im Tabakrauch nachgewiesen (HOFFMANN et al. 1969). Unter den bis heute im Zigarettenrauch identifizierten aromatischen Aminen sind zwei bekanntermaßen und zwei wahrscheinlich krebserzeugend im Menschen. Hierbei handelt es sich um 4-Aminobiphenyl und 2-Naphthylamin bzw. 2-Toluidin und 2,6-Dimethylanilin (IARC 1986, SMITH et al. 1997, 2001, HOFFMANN et al. 2001). Obwohl ihre Konzentrationen im Zigarettenhauptstromrauch relativ gering sind (siehe

Tab. 1), deuten einige Befunde darauf hin, dass Arylamine eine wichtige Rolle bei der Harnblasenkrebsentstehung durch das Rauchen spielen.

Der Tabakrauch von Zigaretten aus dunklem Tabak enthält mindestens anderthalb Mal so viele aromatische Amine als der aus hellem Tabak (PARTIANAKOS & HOFFMANN 1979, LUCERI et al. 1993). In einigen epidemiologischen Studien zur Untersuchung von humanem Harnblasenkrebs wurde daher zwischen Rauchern von hellem (blondem) rauchfanggetrocknetem und dunklem luftgetrocknetem Tabak unterschieden. Hierbei zeigte sich, dass das Risiko, an Harnblasenkrebs zu erkranken, um den Faktor 2 bis 3 für diejenigen Raucher erhöht war, die bevorzugt Zigaretten aus dunklem Tabak rauchten (VINEIS 1991). BARTSCH et al. (1993) fanden darüber hinaus 1,5 Mal mehr 4-ABP-Hämoglobin-Addukte im Blut der Raucher von dunklem Tabak, und ihr Urin enthielt um den Faktor 1,8 mehr Mutagene als der Urin von Rauchern blonden Tabaks. Das allgemein deutlich erhöhte Vorkommen von 4-Aminobiphenyl-Hämoglobin-Addukten im Blut von Rauchern gegenüber dem Blut von Nichtrauchern wurde auch ohne Unterscheidung zwischen den gerauchten Tabaksorten in mehreren Studien beschrieben (PHILIPS 2002) und spiegelt die erhöhte Exposition von Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern gegen dieses Karzinogen wider. Eine Korrelation von 4-ABP-Hämoglobin- und 4-ABP-DNA-Addukten in exfoliierten Urothelzellen mit der Anzahl gerauchter Zigaretten sowie der Mutagenität des Urins und DNA-Addukt-Mengen in exfoliierten Urothelzellen von Rauchern wurden von TALASKA et al. (1991) beschrieben.

Ein weiterer wichtiger Faktor in Bezug auf Harnblasenkrebsentstehung ist der Polymorphismus der N-Acetyltransferase 2 (NAT 2), einem Enzym der Phase II. Die N-Acetylierung von 4-Aminobiphenyl durch die NAT 2 wird als Detoxifizierungsschritt angesehen. Diese enzymatische Reaktion steht in direkter Konkurrenz zur N-Hydroxylierung (siehe Abb. 5, Seite 9). Je schneller das Arylamin acetyliert wird, desto weniger Substrat steht für eine N-Hydroxylierung über CYP1A2 zur Verfügung. Für den Phänotyp des „langsamen Acetylierers“ ist der NAT 2 Polymorphismus ein eindeutiger Risikofaktor, an Blasenkrebs zu erkranken (HEIN et al. 2000, GOLKA et al. 2002, HEIN 2002).

### 1.2.3.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe im Zigarettenrauch

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) entstehen bei unvollständiger Verbrennung organischer Materialien und sind daher ubiquitär vorhanden. Von den bislang im Haupt- und Nebenstromrauch von Zigaretten identifizierten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen wurden zehn von der IARC als wahrscheinlich im Menschen krebserzeugend eingestuft (IARC 1986, SMITH et al. 2000, 2001, HOFFMANN et al. 2001).

Aus verschiedenen epidemiologischen Studien zum Zusammenhang zwischen beruflicher Exposition gegenüber polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und einem erhöhten Harnblasenkrebsrisiko liegen Hinweise darauf vor, dass PAK möglicherweise kanzerogen für das Urothel sind (BONASSI et

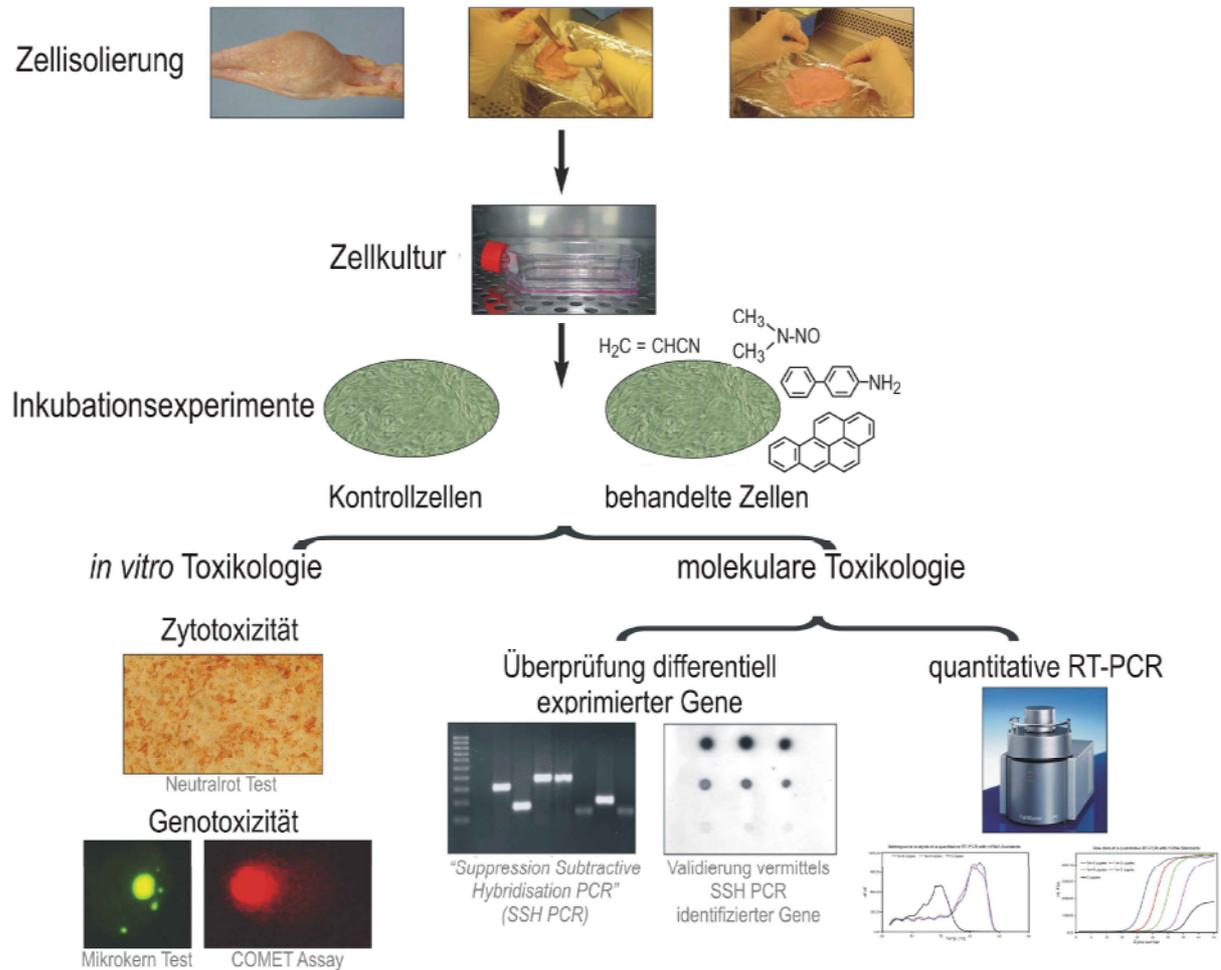
al. 1989, MASTRANGELO et al. 1996, PESCH et al. 2000). Da diese Substanzklasse auch im Zigarettenrauch vertreten ist, besteht die Möglichkeit, dass Substanzen dieser Klasse an der Entstehung von Blasenkrebs durch Tabakrauchen beteiligt sein können. Im Vergleich mit den aromatischen Aminen (siehe 1.2.3.1) sind die metabolischen Aktivierungs- und Detoxifizierungspfade für PAK in Bezug auf die Harnblasenkanzerogenese jedoch weniger klar (KADLUBAR & BADAWI 1995).

Ein wichtiger Faktor in Bezug auf das Blasenkrebsrisiko bei Zigarettenrauchern stellt der Enzym polymorphismus der Glutathion-S-Transferase M1 (GSTM1) dar. Der Zusammenhang zwischen dem Fehlen dieses Enzyms (*GSTM1* 0/0 Genotyp) und einem erhöhten Risiko an Harnblasenkrebs zu erkranken wurde mehrfach in der Literatur beschrieben. Im Jahr 2000 wurde von JOHNS und HOULSTON eine Meta-Analyse von 15 Fall-Kontroll-Studien durchgeführt, um diesen beschriebenen Einfluss zu überprüfen. Die Zusammenfassung dieser Daten ergab, dass im Zusammenhang mit *GSTM1*-Defizienz ein erhöhtes Risiko besteht, an Harnblasenkrebs zu erkranken (mit einem Odds Ratio von 1,53 und einem 95% Konfidenzintervall von 1,28 – 1,84). Die Glutathion-S-Transferase M1 spielt eine wichtige Rolle in der Detoxifizierung von Epoxiden, die als Zwischenprodukte der metabolischen Aktivierung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen entstehen. Das erhöhte Harnblasenkrebsrisiko durch das Fehlen der Glutathion-S-Transferase M1 könnte demnach möglicherweise auf diese Substanzklasse zurückzuführen sein. Die reaktiven Metaboliten aus dem Metabolismus von PAK können DNA-Addukte bilden (siehe 1.1.3), die ohne DNA-Reparatur zur Anhäufung von Mutationen in den Urothelzellen und letztendlich zur Initiation der Kanzerogenese führen können.

### **1.3 Verbundprojekt zur Untersuchung von Wirkungen des Zigarettenrauchs auf das Harnblasenepithel**

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Internationalen Graduiertenkollegs „*Molecular Mechanisms of Food Toxicology*“ in der Heinrich-Heine-Universität ausgeführt und war Teil eines Verbundprojektes zwischen dem Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund (IfADo) und dem Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie (MPI) in Dortmund. In diesem Rahmen sollte ein experimentelles *in vitro* Testsystem, basierend auf primären Urothelzellen, zum Nachweis der genotoxischen Wirkung ausgewählter Zigarettenrauch-Inhaltsstoffe etabliert werden (Abb. 6). Ziel dieses Projektes war es, Genexpressionsprofile für bestimmte Substanzklassen zu generieren und mit klassischen genotoxischen Endpunkten zu korrelieren, um eine Vorhersage genotoxischer und karzinogener Wirkungen für das Harnblasenepithel zu ermöglichen. Genotoxische Wirkungen ausgewählter Substanzen, die im Zigarettenrauch vorkommen, wurden einerseits im Rahmen der vorliegenden Arbeit, und andererseits von Dr. Claudia Behm (Postdoktorandin am IfADo) untersucht. Als Endpunkte wurden die Induktion von DNA-Strangbrüchen und das Entstehen von Mikrokernen in Einzelzellen gemessen. Die

Veränderung der Expression ausgewählter Gene, die z. B. für fremdstoffmetabolisierende Enzyme oder für an der Signaltransduktion beteiligte Proteine codieren, wurde im Rahmen des Verbundprojektes von den Postdoktoranden Dres. Alexandra Kutz und Alexander Wolf (MPI) mittels quantitativer Echtzeit-Reverser Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-RT-PCR) untersucht.



**Abb. 6:** Methodische Aufgabenverteilung im Rahmen des Verbundprojekts zwischen dem IfADo und dem MPI zur Etablierung eines *in vitro* Testsystems zum Nachweis genotoxischer Wirkungen von Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen.

### 1.3.1 Das benützte Zellkulturmodell

Obwohl die chemische Zusammensetzung des Tabakrauchs mit mindestens 70 Kanzerogenen (IARC 1986, SMITH et al. 1997, 2000, 2001, HOFFMANN et al. 2001) heute weitestgehend bekannt ist (GREEN & RODGMAN 1996), weiß man nicht, welche dieser Komponenten in welchem Ausmaß an der Urothel-Kanzerogenese beteiligt sind. In ihrer ursprünglichen Form sind viele dieser Tabakrauch-Kanzerogene nicht reaktiv (HECHT 2003). Nach metabolischer Aktivierung können sie jedoch mit zellulären Makromolekülen wie der DNA reagieren (GUENGERICH & SHIMADA 1991). Im Gegensatz zur allgemein vorherrschenden Meinung, das Urothel sei ein passives Ziel für reaktive Metaboliten hepatischen Ursprungs, konnte für

den Menschen und für verschiedene Tierspezies gezeigt werden, dass Urothelzellen über eine entsprechende Ausstattung mit fremdstoffmetabolisierenden Enzymen verfügen (GUHE et al. 1996, IMAOKA et al. 1997, BRAUERS et al. 2000, ROOS et al. 2006) und dass sie selbst in der Lage sind, Prokanzerogene metabolisch zu aktivieren (AUTRUP et al. 1981, LANGENBACH et al. 1981, STONER et al. 1982, IMAOKA et al. 1997, DEGEN et al. 2004).

Im Rahmen des Verbundprojektes, in welches die vorliegende Arbeit eingebettet war, wurde mit Primärzellkulturen aus der Harnblase gearbeitet, um genotoxische Wirkungen von Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen auf das Harnblasenepithel zu untersuchen. Der Vorteil von Primärkulturen liegt darin, dass diese Zellen noch über einige Zeit (mehrere Tage bis Wochen) die Eigenschaften wie im intakten Organismus beibehalten, aus dem sie zur Kultivierung frisch entnommen wurden. Da die Verfügbarkeit von primären humanen Urothelzellen in ausreichender Menge und Qualität ein Problem darstellt, wurde mit Epithelzellen aus Schweineharnblasen, PUBEC („*porcine urinary bladder epithelial cells*“), gearbeitet. Dieses Zellkulturmodell wurde 1994 von GUHE und FÖLLMANN entwickelt und hinsichtlich physiologischer Zellfunktionen und metabolischer Kompetenz charakterisiert (GUHE & FÖLLMANN 1994, GUHE et al. 1996, MÄHLER et al. 1998, FÖLLMANN et al. 2000, DEGEN et al. 2004). Aufgrund der Ausstattung von PUBEC mit fremdstoffmetabolisierenden Enzymen, deren Aktivitäten über mehrere Wochen in Kultur erhalten bleiben (GUHE et al. 1996), ist dieses Modell geeignet, genotoxische und biochemische Primäreffekte von Tabakrauch-Inhaltsstoffen direkt in Zellen des Zielorgans zu untersuchen. Die Verwendung von PUBEC bietet zudem einige Vorteile: Zum einen ist das Schwein mit dem Menschen physiologisch näher verwandt als die gängigen Versuchstiere Ratte und Maus. Darüber hinaus handelt es sich bei Schweineharnblasen um Abfallprodukte der kommerziellen Fleischverarbeitung, was das Töten von Tieren zu Versuchszwecken unnötig macht (GUHE & FÖLLMANN 1994).

### 1.3.2 Die Modellsubstanzen

Da bislang nicht geklärt ist, welche Substanzen im Zigarettenrauch durch genotoxische Wirkungen im Urothel an der blasenspezifischen Krebsentstehung beteiligt sind, wurden im Rahmen des Verbundprojektes Kanzerogene unterschiedlicher Stoffklassen untersucht. Wie bereits ausgeführt, scheinen insbesondere aromatische Amine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe einen wichtigen Einfluss auf die systemische Induktion von Harnblasenkrebs durch das Tabakrauchen zu haben (siehe 1.2.3.1 und 1.2.3.2). Weitere relevante Information leitet sich von der chemischen Natur der Addukte am N-Terminus des Hämoglobins ab, die gehäuft bei Rauchern vorkommen. Im Speziellen sind dies N-Methylvalin- und N-(2-Cyanoethyl)valin-Hämoglobin-Addukte, die wahrscheinlich auf die Substanzen Dimethylnitrosamin bzw. Acrylnitril zurückzuführen sind (THIER et al. 1999, 2000, 2001).

Im Tabakrauch findet man drei Gruppen von Nitrosaminen, die während der Verarbeitung des Tabaks und während des Rauchens entstehen: flüchtige, nicht-flüchtige und tabakspezifische Nitrosamine (IARC 1986). Letztere kommen ausschließlich in Tabakprodukten vor. Und zwar findet man sie nicht nur im Rauch, sondern bereits auch in großen Mengen in unverbrannten Tabakprodukten. Tabakspezifische Nitrosamine entstehen bereits während der Weiterverarbeitung von Tabakblättern (Fermentation und Trocknungsprozessen) durch Nitrosierung von Nikotin (IARC 1986). Beispiele für diese Gruppe der Nitrosamine sind 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNN) und N-Nitrosornikotin (NNK). Sie werden vor allem mit der Entstehung von Lungenkrebs in Verbindung gebracht (HECHT 2003). Flüchtige Nitrosamine hingegen könnten eine Rolle bei der Harnblasenkrebsentstehung durch Zigarettenrauchen spielen. Im Blut von Rauchern wurden von THIER et al. (2001) doppelt so hohe Spiegel an N-Methylvalin-Hämoglobin-Addukten wie im Blut von Nichtrauchern gefunden. Als vermutlich für die gefundenen Effekte verantwortliches Agens wurde insbesondere Dimethylnitrosamin in Betracht gezogen, da dies quantitativ einen großen Anteil im Zigarettenrauch – insbesondere im Nebenstromrauch – ausmacht und für systemische Effekte durch das Rauchen verantwortlich sein kann (THIER et al. 2001).

Im Blut von Rauchern wurden außerdem vermehrt N-(2-Cyanoethyl)valin-Hämoglobin-Addukte gefunden (TAVARES et al. 1996, FENNELL et al. 2000). Diese Addukte deuten auf eine Exposition gegenüber Acrylnitril hin, welches in großen Mengen im Zigarettenrauch vorkommt (siehe Tab. 1, Seite 2). Die Mengen dieser Addukte waren im Blut von Rauchern, die nicht berufsbedingt mit Acrylnitril in Kontakt gekommen waren, abhängig von der Anzahl täglich gerauchter Zigaretten (TAVARES et al. 1996, FENNELL et al. 2000). Dieser systemische Effekt durch Acrylnitril könnte eine Rolle bei der Entstehung von Harnblasenkrebs durch das Rauchen von Zigaretten spielen.

Es erscheint somit wahrscheinlich für diese Substanzen mit geringem Molekulargewicht (Dimethylnitrosamin und Acrylnitril), dass sie aufgrund ihrer systemischen Verfügbarkeit auch für genotoxische Effekte in der Harnblase in Frage kommen.

Basierend auf diesen Grundlagen wurden die folgenden Kanzerogene als Leitsubstanzen für die Untersuchungen ausgewählt:

- 4-Aminobiphenyl – als Vertreter für aromatische Amine
- Benzo[a]pyren – als Vertreter für polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
- Dimethylnitrosamin – als Vertreter für flüchtige Nitrosamine
- Acrylnitril – eine organische Substanz mit geringem Molekulargewicht und aktivierter Doppelbindung

Darüber hinaus wurde die Genotoxizität von 4-Aminobiphenyl in Kombination mit Benzo[a]pyren und die des komplexen Gemisches Zigarettenrauchkondensat mit dem Zellkulturmodell PUBEC untersucht.

## 1.4 Aufgabenstellung der Dissertation

Ausgehend von dem allgemeinen Rahmen des Verbundprojektes (siehe 1.3), in welches die vorliegende Arbeit eingebettet ist, wurden für die hier vorliegende Dissertation folgende Aufgabenstellungen abgeleitet.

Der erste Teil dieser Arbeit sollte darin bestehen, genotoxische Wirkungen von Einzelkomponenten und Substanzgemischen aus dem Zigarettenrauch in Schweineharnblasenepithelzellen zu untersuchen. Hierzu wurden zwei Testmethoden ausgewählt, mit Hilfe derer genotoxische Effekte in individuellen Zellen nachgewiesen werden konnten: der COMET Assay und der Mikronukleus-Test. Der COMET Assay ist ein Indikator-test für Genotoxizität, mit dessen Hilfe DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie alkalilabile Stellen erfasst werden können (COLLINS et al. 1997). Über Abwandlungen dieses Tests ist es darüber hinaus möglich, gezielt präneoplastischen Läsionen wie z. B. oxidative Basenmodifikationen in der DNA nachzuweisen (COLLINS et al. 1993, 1996). Der Mikronukleus-Test, der von der Postdoktorandin Dr. Claudia Behm (IfADo) parallel hierzu durchgeführt und ausgewertet wurde, erfasst genotoxische Schäden in proliferierenden Zellen auf chromosomaler Ebene. Mikrokerne können sowohl aufgrund von Chromosomenbrüchen als auch durch Fehlverteilung von Chromosomen während der Mitose gebildet werden. Die Entstehung von Mikronuklei wird u. a. durch Substanzen ausgelöst, die DNA- oder Protein-Addukte bilden. Die für die vorliegende Dissertation ausgewählten Genotoxizitätstests sind empfindlich für den Nachweis genotoxischer Effekte durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe. Benzo[a]pyren wurde in zahlreichen Publikationen als Positivkontrolle für den Nachweis genotoxischer Wirkungen von Substanzen verwendet, die metabolisch aktiviert werden müssen. Dies gilt sowohl für den COMET Assay, was u. a. in den von TICE et al. (2000) veröffentlichten Leitfaden-Vorschlägen zur Durchführung dieses Tests empfohlen wurde, als auch für den Mikrokern-Test (ISHIDATE et al. 1988, MATSUOKA et al. 1992, 1999, MATSUSHIMA et al. 1999, WU et al. 2003). Durch die Verwendung dieser beiden Testmethoden wurden genotoxische Effekte auf DNA- und chromosomaler Ebene in individuellen Zellen erfasst.

Im Rahmen des Verbundprojektes hatte sich bereits zu einem frühen Zeitpunkt gezeigt, dass die Genexpression von CYP1A1 besonders stark nach Behandlung mit Benzo[a]pyren gesteigert war (WOLF et al. 2005). Die Hochregulation von CYP1A1 kann sekundär zu einer Verstärkung der metabolischen Aktivierung polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe und damit zu verstärkten genotoxischen Effekten führen. Da nur Daten auf mRNA-Ebene vorlagen, sollte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit ergänzend die Induktion von CYP1A1 auf Proteinebene untersucht werden. Ziel dieser Untersuchungen war es herauszufinden, ob genotoxische Effekte der untersuchten Zigarettenrauch-Inhaltsstoffe mit der Enzyminduktion korrelieren. Zum Nachweis von CYP1A1-Induktion auf Proteinebene durch Benzo[a]pyren, einem binären Gemisch aus Benzo[a]pyren und 4-Aminobiphenyl sowie dem

---

komplexen Gemisch Zigarettenrauchkondensat, wurden zwei Methoden verwendet, die auf Antigen-Antikörper-Reaktionen beruhen und somit einen spezifischen Nachweis von CYP1A1 erlauben. Mittels Western Blot Analyse wurde die gesamte CYP1A1-Induktion innerhalb einer Zellpopulation untersucht. Für den Nachweis von CYP1A1-Proteinexpression auf Einzelzellniveau wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine durchflusszytometrische Methode etabliert, mit deren Hilfe es möglich war, den prozentualen Anteil CYP1A1-induzierter Zellen innerhalb einer Zellpopulation zu bestimmen.

Die Untersuchungen von Einzel- und Kombinationseffekten von Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen im primären Zellkulturmodell PUBEC sollten aufklären, welchen Beitrag verschiedene Substanzklassen, insbesondere jedoch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, zur Blasenkanzerogenese leisten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Probenmaterial

Schweineharnblasen wurden vom Schlachthof in Lünen bezogen. Bei den verwendeten Spendertieren handelte es sich um Hausschweine (*Sus domesticus*). Die zur Mast verwendeten Tiere waren zumeist Kreuzungen aus insgesamt drei oder vier verschiedenen Schweinerassen. Zu den im Allgemeinen verkreuzten Grundrassen gehörten die „Deutsche Landrasse“, das „Belgische“ bzw. „Deutsche Edelschwein“, sowie „Piétrain“ und „Duroc“. Es wurden ausschließlich mit Urin gefüllte Harnblasen von Börgen verwendet.

#### 2.1.2 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma
3,5-Di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxybenzyl Alkohol	Aldrich
4-Aminobiphenyl (4-ABP)	Sigma
Acridinorange	Sigma
Acrylamid	Amresco®
Acrylnitril (AN)	Fluka
Agarose	Gibco® Invitrogen
Agarose LMP ultrapure	Gibco® Invitrogen
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Benzo[a]pyren (B[a]P)	Fluka
Bromphenolblau	Sigma
Cyclophosphamid (CP)	Sigma
Dimethylnitrosamin (DMN)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Ethidiumbromid (500 µg/ml)	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Sigma
Hydrocortison	Sigma
Methylen-Bisacrylamid	Amresco®
Methylmethansulfonat (MMS)	Merck
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Riedel-de-Haën
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Neutralrot	Sigma

N-Lauroylsarkosin Natriumsalz	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck
Triton® X-100	Fluka
Tween® 20	Sigma
Vincristin (VCR)	Sigma

Weitere Chemikalien wurden in p. a.-Qualität von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Serva (Heidelberg) bezogen.

### 2.1.3 Gesamtpartikelmasse aus Zigarettenrauchkondensat

Gesamtpartikelmasse aus Zigarettenrauchkondensat – CSC TPM (*cigarette smoke condensate total particulate matter*), im Folgenden auch als „Kondensat“ oder mit CSC bezeichnet – wurde von der Philip Morris Research Laboratories GmbH in Köln zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung des CSC TPM waren Standard Referenzzigaretten „2R4F“ der Universität von Kentucky in einer automatischen Rauchmaschine mit 20 Anschlüssen (Borgwaldt), den Anforderungen und Spezifikationen der ISO-Norm 3308 entsprechend (1 Zug von 35 ml in 2 s; 1 Zug pro min), abgeraucht worden. Die Gesamtpartikelmasse des Hauptstromrauches wurde auf Cambridge Glasfaserfiltern eingefangen und mit DMSO extrahiert. Die hieraus resultierende Suspension mit einer Endkonzentration von 18,58 mg/ml wurde direkt nach der Präparation aliquotiert und bei –20°C gelagert.

### 2.1.4 Antikörper, Enzyme und andere Proteine

anti-Maus IgG1-FITC („A85-1“, Ratte)	BD Pharmingen™
anti-Maus IgG-Biotin (Ziege, polyklonal)	Sigma
Avidin	Sigma
Biotin (Vitamin H)	Sigma
Collagen R	Serva
EGF ( <i>long epidermal growth factor</i> )	GroPep, ibt GmbH
Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg) aus <i>E. coli</i>	New England BioLabs
Fötale Kälberserum (FCS)	Seromed® Biochrom AG
Insulin, Zn-Salz (Rind, 10 mg/ml)	Seromed® Biochrom AG
Laufmarker ~10 – 180 kDa „ <i>prestained protein ladder</i> “	Fermentas
Serumalbumin (Rind)	Sigma
Streptavidin-Peroxidase Konjugat aus <i>Streptomyces a.</i>	Sigma
Transferrin (Rind, holo)	Gibco® Invitrogen

Der monoklonale anti-CYP1A1 Antikörper („MAB1A3-03“, Maus IgG1, miniPERM™-Überstand vom 09.11.1998, CYP2000, Bochum) und Western Blot Standard „3-MC Mikrosomen“ (Roos 2002) wurden von Herrn Dr. P. H. Roos (IfADo) zur Verfügung gestellt.

### 2.1.5 Kits

BD Cytotfix/Cytoperm™ Kit	Pharmingen™ BD Biosciences
BCA „Uptima“ Assay Kit	Interchim
ECL™ Western Blot Detection Kit	Amersham Biosciences

### 2.1.6 Verbrauchsmaterial

Deckgläser (24 mm x 60 mm)	Menzel-Gläser
Gewebekulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner
Gewebekulturplatten (96-, 24- und 6-Depots), „ <i>low evaporation lid</i> “	Falcon™ Becton Dickinson
Injektionsspritze (5 ml, 10 ml und 20 ml)	Omnifix
Protran® Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell
Objektträger mit Mattrand	Menzel-Gläser
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Greiner
quadriPERM™ Platten	Vivascience
Röntgenfilm Hyperfilm™ ECL™	Amersham Biosciences
Rundboden-Röhrchen aus Polystyren (5 ml, 12 x 75 mm)	Falcon™ Becton Dickinson
Sterilfilter Millex™ (Ø 0,22 µm)	Millipore
Zentrifugenröhrchen (12 ml, 50 ml)	Falcon™ Becton Dickinson

### 2.1.7 Geräte

Acht-Kanal-Multistepper Finnpipette® 50 / 100 / 150 / 200 µl	Labsystems
Acht-Kanal-Photometer SLT 340 ATC	SLT Labinstruments
Acht-Kanal-Pipette Finnpipette® 5 – 50 µl,	Labsystems
Acht-Kanal-Pipette Finnpipette® 50 – 200 µl	Labsystems
Analysenwaage AE 240	Mettler
Blottingkammer Hoefer™, TE Series, Tank Transporter Unit	Pharmacia
Brutschrank IG 150	Jouan
CCD-Kamera CS 1	Cybertech
Cryotank RS Series	Taylor-Wharton
Dampfsterilisator Varioklav®	H + P Labortechnik AG

---

Digitale Fotokamera DSC-S75	Sony
Durchflussszytometer FACSCalibur™	Becton Dickinson
Durchlichteinheit mini 5000	Just Normlicht
Eismaschine Scotsman® AF 100	Frimont
Elektrophoresekammer Mighty Small II	Hoefer
Elektrophoresekammer Sub-Cell® Model 192	BioRad
Fluoreszenzmikroskop DMLB	Leica
Fluoreszenzmikroskop DMRB	Leica
Gefrierschrank (-20°C) Öko Plus	Siemens
Hämozytometer Neubauer <i>improved</i>	Brand
Hoefer™ Multiple Gel Caster	Amersham Biosciences
inverses Lichtmikroskop IM 35	Zeiss
Kühlschrank <i>profi line</i>	Liebherr
Kühlzentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus
Laborwaage PB602	Mettler Toledo
Magnetrührer	IKA® Labortechnik
Mikrowelle	Panasonic
Mini-Taumel-Wipptisch WT 17	Biometra®
Pellet Pestle® Cordless Motor und Adapter	Sigma
pH-Meter CG 825	Schott
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Gilson
Pipettierhilfe pipetus® akku	Hirschmann
Plattenschüttler MTS 2	IKA® Labortechnik
Röntgenfilmkassette Hyperfilmcassette™ (18 x 24 cm)	Amersham Life Sciences
Spannungsgeber LBK Multidrive X2	Pharmacia
Spannungsgeber Power Pac 300	BioRad
sterile Werkbank HERAsafe	Kendro
Tiefkühlgefrierschrank (-80°C)	Revko
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Ultraschallgerät Sonoplus HD 200 mit Stab UW 200	Bandelin
Ultraschall-Wasserbad Laboson 200	Bender & Hobein
Videokamera Modell PE-2020P	Pulnix
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein
Wasserbad 1083	GFL

## 2.1.8 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders erwähnt, wurde zur Herstellung der Pufferlösungen und Verdünnung von Stammlösungen Aqua bidest. verwendet.

### 2.1.8.1 Gebrauchsfertige Lösungen

Dulbecco's PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> (10x)	Gibco® Invitrogen
F-12 (Ham) „Nutrient Mixture“ mit GlutaMAX™ I	Gibco® Invitrogen
Fungizone, Amphotericin B (250 µg/ml)	Gibco® Invitrogen
nicht-essentielle Aminosäuren (MEM 100x)	Gibco® Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml / 10000 µg/ml)	Gibco® Invitrogen
Trypanblau (0,5 %)	Serva
Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin, 1 mM EDTA)	Gibco® Invitrogen

### 2.1.8.2 Zellkultur

#### Zellkulturmedium

Als Grundmedium diente F-12 (Ham) „Nutrient Mixture“ mit GlutaMAX™, welches wie folgt supplementiert wurde:

100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
1,25 µl/ml Amphotericin B
5 µg/ml Transferrin
10 µg/ml Insulin
0,1 mM nichtessentielle Aminosäuren MEM
2,7 mg/ml Glucose (40%ig (w/v))
1 µg/ml Hydrocortison
20 ng/ml EGF („epidermal growth factor“)

#### Deaktivierungsmedium

Zellkulturmedium mit 40% (v/v) FCS

Da PUBEC in serumfreiem Zellkulturmedium kultiviert wurden, kam ein serumhaltiges Medium zum Einsatz, um die Aktivität von Trypsin bei der Passage der Zellen abzustoppen.

### 2.1.8.3 Neutralrot-Test

#### Neutralrot-Lösung

**Stammlösung:** 4 mg/ml Neutralrot

Das Neutralrot wurde durch mindestens 1 h langes Schütteln im Wasserbad (37°C) gelöst, bis bei mikroskopischer Kontrolle keine kristallinen Nadeln mehr sichtbar waren. Die Stammlösung wurde abgedunkelt bei 4°C gelagert und für maximal 4 Wochen im Neutralrot-Test verwendet.

**Gebrauchslösung:** 50 µg/ml Neutralrot in Zellkulturmedium (serumfrei)

Die Gebrauchslösung wurde ca. 18 h vor Einsatz im Test in einem sterilen Erlenmeyerkolben angesetzt, mit steriler Alufolie locker abgedeckt und im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Es wurde stets frisch zubereitetes Zellkulturmedium (siehe 2.1.8.2) verwendet. Vor dem endgültigen Einsatz im Test wurde die Gebrauchslösung auf evtl. ausgefallene Kristalle optisch geprüft und nochmals steril filtriert.

### 2.1.8.4 COMET Assay (alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese)

#### Lysepuffer

**Stammlösung:** 2,5 M NaCl  
100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
10 mM Tris  
1% (v/v) N-Lauroylsarkosinat-Lösung (aus 10% (w/v) Stammlösung)

Der pH-Wert wurde vor der Zugabe der N-Lauroylsarkosinat-Lösung mit NaOH-Plätzchen auf 10 eingestellt. Die Stammlösung wurde auf 89% des Endvolumens (in Bezug auf die Molarität) mit Aqua bidest. aufgefüllt und anschließend bei 4 – 8°C aufbewahrt.

**Gebrauchslösung:** 1% (w/v) Triton X-100  
10% (v/v) DMSO  
in Stammlösung

Die Gebrauchslösung wurde vor Versuchsbeginn immer frisch angesetzt und im Kühlschrank mindestens 1 h vor Gebrauch gekühlt.

#### Elektrophoresepuffer

**Stammlösungen:** A. 10 N NaOH  
B. 200 mM Na<sub>2</sub>-EDTA

Der pH-Wert der Na<sub>2</sub>-EDTA-Lösung wurde mit NaOH auf 10 eingestellt.

**Gebrauchslösung:** 300 mM NaOH  
1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA

Der pH-Wert sollte bei  $\geq 13$  liegen (Leitfähigkeit 60 – 65 mS) und wurde vor Gebrauch kontrolliert. Der Elektrophoresepuffer wurde vor Verwendung über Nacht auf 4 – 8°C gekühlt.

#### **Neutralisationspuffer**

400 mM Tris

Der pH-Wert wurde mit rauchender HCl auf 7,5 eingestellt.

#### **Färbelösung**

**Stammlösung:** 200 µg/ml Ethidiumbromid

Die Stammlösung, die bei 4°C im Dunkeln gelagert werden muss, wurde vor der Auswertung der Objektträger 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt.

### **2.1.8.5 Modifizierter COMET Assay mit Reparaturenzym**

#### **Enzympuffer**

100 mM NaCl  
20 mM Tris  
1 mM Na<sub>2</sub>EDTA

Der pH wurde mit rauchender HCl auf 7,5 eingestellt. Für die Waschschritte wurde der Puffer in der o. g. Zusammensetzung verwendet. Zur Inkubation mit dem Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg) wurden 0,2 mg/ml BSA zugefügt, um eine Adhäsion des Enzyms an Reaktionsgefäße oder Pipettenspitzen zu vermeiden und um das Enzym während der Behandlung zu stabilisieren.

### **2.1.8.6 Mikrokern-Test (*in vitro*)\***

#### **Acridinorange-Färbelösung**

**A. Stammlösung:** 1 mg/ml Acridinorange

---

\* Der Mikrokern Test (*in vitro*) wurde von der Postdoktorandin Dr. Claudia Behm (IfADo) durchgeführt und ausgewertet.

**B. Gebrauchslösung:** 5 ml Acridinorange-Stammlösung  
7 ml 0,3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
7 ml 0,3 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 100 ml Aqua bidest.

### Fixierlösungen

**Fixierlösung A:** 67% (v/v) Methanol  
33% (v/v) Essigsäure

**Fixierlösung B:** 80% (v/v) Methanol  
20% (v/v) Essigsäure

Die Fixierlösungen wurden 24 h vor der Test-Aufarbeitung hergestellt und bei -20°C gelagert.

### 2.1.8.7 Zellhomogenisierung

#### Homogenisierungspuffer

100 mM Tris  
100 mM KCl  
1 mM EDTA

Der pH wurde mit rauchender HCl auf 7,4 eingestellt. Zur Inhibierung von Proteaseaktivität wurden unmittelbar vor Gebrauch eine Tablette „complete“ Protease-Inhibitor (Roche) pro 50 ml Puffer sowie 23 µM 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl Alkohol zugegeben.

### 2.1.8.8 SDS PAGE

#### Trenngelpuffer

1,5 M Tris

Der pH wurde mit rauchender HCl auf 8,8 eingestellt.

#### Sammelgelpuffer

0,5 M Tris

Der pH wurde mit rauchender HCl auf 6,8 eingestellt.

**Ammoniumpersulfat-Lösung**

100 mM APS

**Trenngel**

Acrylamid (A), 100 ml:

62,5 ml Acrylamid (40%ig)

22,5 ml Methylen-Bisacrylamid (2%ig)

15,0 ml Aqua bidest.

**Sammelgel**

Acrylamid (B), 100 ml:

62,5 ml Acrylamid (40%ig)

33,5 ml Methylen-Bisacrylamid (2%ig)

4,0 ml Aqua bidest.

**Kammerpuffer**

20 mM Tris

190 mM Glycin

3 mM SDS

Der pH wurde mit rauchender HCl auf 8,3 eingestellt.

**Probenpuffer**

Der Probenpuffer wurde aus drei Stammlösungen (A, B und C, Tab. 2 ) angesetzt.

**Tab. 2:** Stammlösungen für den Probenpuffer

<b>Lösung A</b>	<b>Lösung B</b>	<b>Lösung C</b>
3,8 g Tris (0,5 M, pH 6,8)	5 mg Bromphenolblau	1 g SDS
50 ml Glycerin	5 ml Glycerin	
ad 100 ml Aqua bidest.	ad 10 ml Aqua bidest.	ad 10 ml Aqua bidest.

Der Probenpuffer wurde wie folgt angesetzt:

1 ml Lösung A
250 µl Lösung B
1 ml Lösung C
250 µl 2-Mercaptoethanol

### 2.1.8.9 Western Blot

#### Transferpuffer

4,55 g/l Tris pH 8,3  
15,00 g/l Glycin  
133 ml/l Methanol

### 2.1.8.10 Durchflusszytometrie

#### Färbepuffer

2% (v/v) FCS  
0,1% (w/v) Natriumazid  
in PBS

### 2.1.9 Software

Comet Assay II	Perceptive Instruments
Cell Quest Pro®	BD Biosciences
SPSS 13.0 für Windows	SPSS Inc.
WinCam 2.1	Cybertech

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung der Schweineharnblasenepithelzellen (PUBEC)

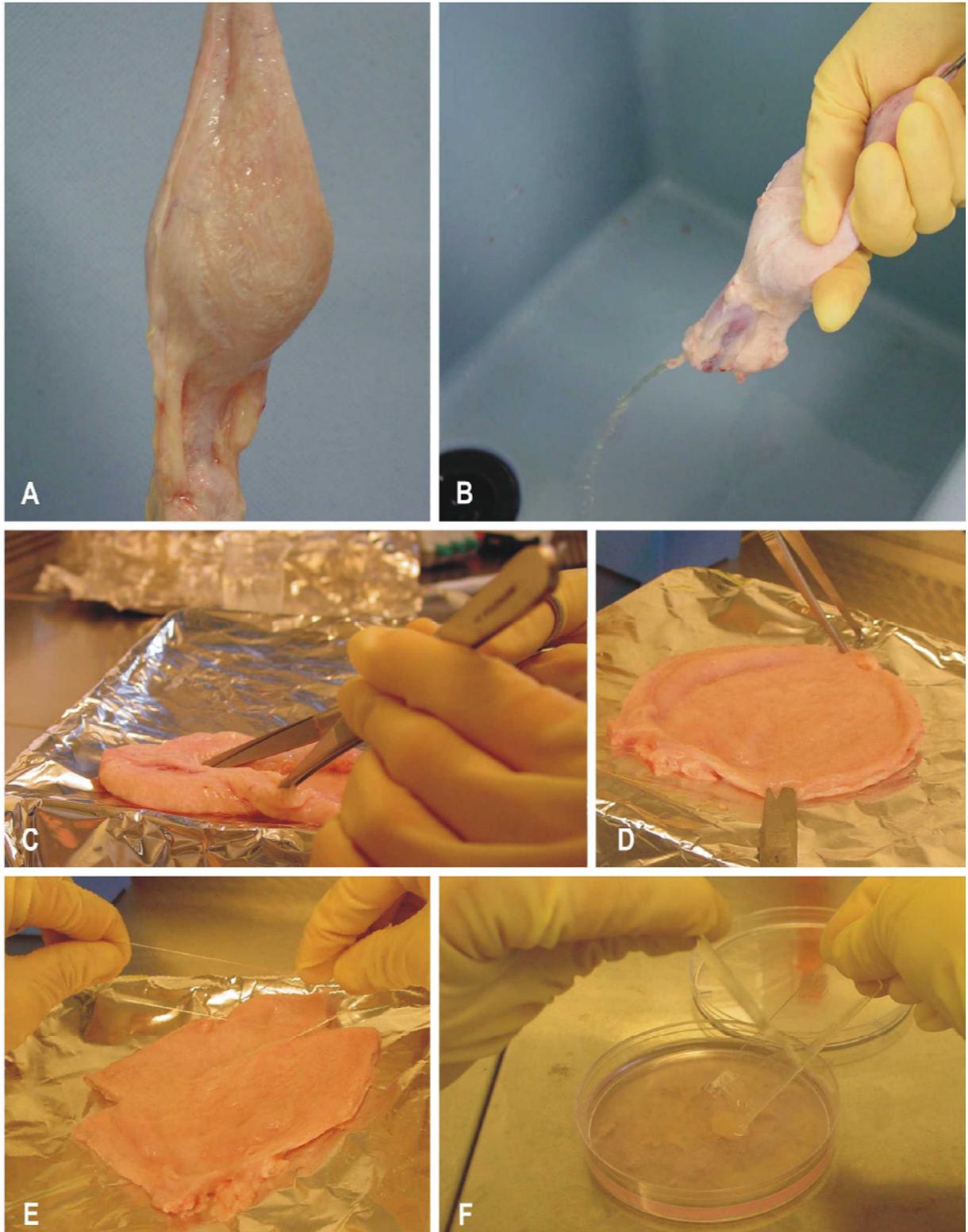
#### 2.2.1.1 Probengewinnung

Für die Kultivierung von PUBEC wurden Harnblasen von Börgen verwendet. Die Organe wurden am Schlachthof während des Prozesses der Eingeweideentnahme ca. 20 min nach Tötung der Schweine vom Personal des Schlachthofes entnommen. Hierbei wurden mit Urin gefüllte Harnblasen ausgewählt, da sich diese für die folgende Aufarbeitung besser eigneten. Die frisch entnommenen Organe wurden in einem Becherglas (5 l), welches mit 1 l eiskaltem, sterilem PBS (supplementiert mit 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin und 2,5 µg/ml Amphotericin) befüllt war, überführt und unter Eiskühlung möglichst schnell zur Präparation ins Labor transportiert. Zwischen dem Zeitpunkt der Schlachtung, der Entnahme von Schweineharnblasen und der anschließenden Aufarbeitung im Labor lag ein Zeitraum von maximal 90 min.

#### 2.2.1.2 Zellpräparation - Isolierung der Epithelzellen

Die Isolierung der Epithelzellen sowie sämtliche anderen Arbeiten an Zellkulturen wurden ohne Ausnahme unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Präparation und Kultivierung der PUBEC erfolgten in Anlehnung an die von GUHE und FÖLLMANN (1994) beschriebene Methode.

Direkt vor der Präparation wurde jeweils eine mit Urin gefüllte Schweineharnblase (Abb. 7 A) über dem Spülstein entleert (Abb. 7 B) und danach von basal nach apical mit einer sterilen Schere aufgeschnitten (Abb. 7 C). Anschließend wurde das Organ auf einer mit Eis gefüllten und mit Alufolie abgedeckten flachen Styroporbox ausgebreitet (Abb. 7 D). Mit Hilfe steriler Objektträger wurden Zellen der Epithelschicht abgeschabt (Abb. 7 E) und direkt in eine mit Zellkulturmedium oder PBS gefüllte Petrischale gegeben (Abb. 7 F). Die Zellen jeweils einer Harnblase wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein 50 ml fassendes Zentrifugenröhrchen überführt und das Gesamtvolumen mit PBS auf 20 – 25 ml eingestellt. Im Anschluss wurden die Zellen 5 min lang bei 50 g zentrifugiert, um Zelltrümmer von intakten Zellen zu trennen. Die Zellen wurden dreimal gewaschen, bis der Überstand klar war. Nach jeder Zentrifugation wurde der Überstand mit Hilfe einer auf eine Absaugvorrichtung aufgesteckten Kanüle abgenommen und das verbleibende Zellsediment in 20 – 25 ml PBS resuspendiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellsedimente in ca. 10 – 15 ml Medium aufgenommen und vereinigt. Es wurden jeweils die Zellen aus insgesamt 4 – 6 verschiedenen Schweineharnblasen vereinigt.



**Abb. 7:** Schema des Präparationsablaufs. Eine mit Urin gefüllte Schweineharnblase (A) wurde entleert (B) und anschließend unter sterilen Bedingungen von basal nach apical aufgeschnitten (C). Das Organ wurde auf einer mit Eis gefüllten und mit Alufolie abgedeckten flachen Styroporbox ausgebreitet (D). Mit Objektträgern wurden Epithelzellen abgeschabt (E) und direkt in eine Petrischale überführt (F).

### 2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Zellen wurden zur Festlegung einer definierten Anzahl von Einzelzellen (z.B. bei der Subkultivierung, siehe 2.2.1.7) mit Hilfe eines Hämocytometers unter dem Mikroskop gezählt. Hierzu wurde die Anzahl der Zellen in den vier äußeren Gruppenquadranten ermittelt. Nach Bildung des Mittelwertes wurde unter Berücksichtigung des Kammerfaktors von  $10^4$  und der Verdünnung die Zellzahl pro ml berechnet.

### 2.2.1.4 Trypanblaufärbung

Die Anzahl vitaler Zellen innerhalb einer Zellprobe wurde mit Hilfe der Trypanblaufärbung ermittelt. Trypanblau ist ein Vitalfarbstoff, der bei lebenden Zellen nicht in das Zellinnere gelangen kann, tote Zellen jedoch blau anfärbt, sodass eine Differenzierung zwischen vitalen und toten Zellen möglich ist.

Zu 900  $\mu$ l einer 0,1%igen Trypanblau-Lösung (in PBS; pH 7,5) wurden 100  $\mu$ l Zellsuspension gegeben, mit einer Pipette gut durchmischt und zwei Minuten lang inkubiert. Anschließend wurde der Testansatz in ein Hämocytometer gegeben und unter dem Mikroskop ausgezählt.

### 2.2.1.5 Beschichtung der Gewebekulturgefäßoberflächen

Für die Anheftung und Kultivierung der Epithelzellen war es notwendig, die Oberflächen der Gewebekulturgefäße mit Kollagen zu beschichten. Das extrazelluläre Matrix-Protein wurde in einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml (in Aqua bidest. verdünnt) eingesetzt. Die im Folgenden aufgeführten Volumina (Tab. 3) wurden in die jeweiligen Gewebekulturgefäße pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken der Gefäße gleichmäßig auf der zu beschichtenden Oberfläche verteilt. Nach wenigen Minuten wurde das Kollagen mit Hilfe einer Pipette abgenommen. Die verbliebenen Flüssigkeitsmengen (u. a. auch größere Tropfen Kollagen) wurden vorsichtig mit einer auf eine Kanüle aufgesteckten gelben Pipettenspitze mit Hilfe einer Absaugvorrichtung abgesaugt. Anschließend verblieben die Gewebekulturgefäße geöffnet in der sterilen Werkbank, bis die Oberfläche getrocknet war. Die Gewebekulturgefäße wurden drei Tage vor Gebrauch beschichtet.

**Tab. 3:** Eingesetzte Kollagen-Volumina zur Beschichtung von Gewebekulturgefäßen

Gewebekulturgefäß	Größe	Eingesetzte Kollagen-Volumina
Gewebekulturflasche	25 cm <sup>2</sup>	1 ml pro Flasche
Gewebekulturflasche	75 cm <sup>2</sup>	3 ml pro Flasche
Gewebekulturplatte	6 Depots	200 $\mu$ l pro Depot
Gewebekulturplatte	24 Depots	60 $\mu$ l pro Depot
Gewebekulturplatte	96 Depots	40 $\mu$ l pro Depot

### 2.2.1.6 Kulturbedingungen

Frisch isolierte Epithelzellen aus der Schweineharnblase wurden am Tag der Präparation in einer Dichte von  $12 \times 10^6$  Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen ausgesät. Diese waren zuvor mit Kollagen beschichtet worden (siehe 2.2.1.5). Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, um nicht angewachsene und abgestorbene Zellen zu entfernen. Die Kulturen wurden stets lichtmikroskopisch auf mögliche Kontaminationen mit Bakterien, Pilzen und Hefen untersucht. Im Falle einer Kontamination wurden die befallenen Proben verworfen. Die Kulturgefäße mit den Epithelzellen wurden in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre aufbewahrt.

### 2.2.1.7 Subkultivierung

Die Epithelzellen wurden am Tag 2 zur weiteren Kultivierung in anderen Gewebekulturgefäßen (für nachfolgende Inkubationsversuche) mittels Trypsin-EDTA-Lösung vom Substrat abgelöst. Das serumfreie Medium wurde abgenommen und 5 ml der auf 37°C vortemperierten proteolytischen Lösung pro 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 8 – 10 min bei 37°C im Brutschrank unter Beobachtung des Ablöseprozesses. Das Ablösen der Zellen wurde durch vorsichtiges Schütteln der Kulturflasche zusätzlich verstärkt. Durch Zugabe von 5 ml Deaktivierungsmedium wurde die Aktivität des Trypsins gestoppt. Die Zellsuspensionen aus mehreren Gewebekulturflaschen wurden in 50 ml-Zentrifugenröhrchen vereinigt und 5 min lang bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 20 ml Medium aufgenommen. Da PUBEC dazu neigen, Zellaggregate zu bilden, wurde die Zellsuspension für ca. 2 – 5 min stehen gelassen. Hierdurch konnten größere Zellklumpen zu Boden sinken, welche die Ermittlung der Zellzahl beeinträchtigen und die Aussaat vereinzelter Zellen erschweren. Der aus vereinzelter Zellen bestehende Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, von dem anschließend ein Aliquot für die Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität im Hämozytometer (siehe 2.2.1.3 und 2.2.1.4) entnommen wurde. Die Zellen wurden anschließend in gewünschter Dichte in neue Kulturgefäße ausgesät (Tab. 4). Nach 24 h Anwachzeit wurde das Medium in den Gewebekulturgefäßen gewechselt, um nicht angewachsene oder abgestorbene Zellen zu entfernen bzw. um PUBEC mit Testsubstanzen zu inkubieren (siehe 2.2.1.8).

Tab. 4: Eingesetzte Anzahl an PUBEC in Gewebekulturgefäßen unterschiedlicher Größe.

Gewebekulturgefäß	Größe	Eingesetzte Anzahl an PUBEC
Gewebekulturflasche	25 cm <sup>2</sup>	$2,5 \times 10^6$ Zellen pro Flasche
Gewebekulturplatte	6 Depots	$5,0 \times 10^5$ Zellen pro Depot
Gewebekulturplatte	24 Depots	$10^5$ Zellen pro Depot
Gewebekulturplatte	96 Depots	$2,0 \times 10^4$ Zellen pro Depot

### 2.2.1.8 Inkubation mit Testsubstanzen

PUBEC wurden am Tag 3 (für 24 h Inkubation) oder Tag 4 (für 3 oder 5 h Inkubation) nach Kulturbeginn in verschiedenen Inkubationsversuchen (Neutralrot-Test, COMET Assay, Mikrokern-Test und Induktion von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen) eingesetzt. Zuvor waren die Zellen in neue Gewebekulturgefäße überführt worden (siehe 2.2.1.7). Die Testsubstanzen 4-Aminobiphenyl (4-ABP), Acrylnitril (AN), Benzo[a]pyren (B[a]P) und Zigarettenrauchkondensat (CSC) waren in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst worden. Die maximale DMSO-Endkonzentration in den Inkubationsversuchen betrug 0,1% (v/v) für AN und CSC bzw. 0,2% (v/v) für 4-ABP und B[a]P sowie für die Co-Inkubation von 4-ABP und B[a]P. Dimethylnitrosamin (DMN) war in Aqua bidest. gelöst worden. Sämtliche Inkubationsversuche wurden ohne Zusatz von S9 Mix durchgeführt, da PUBEC über fremdstoffmetabolisierende Enzyme der Phase I und II verfügen (GUHE et al. 1996) und davon ausgegangen wurde, dass sie die verwendeten indirekten Kanzerogene in reaktive Metaboliten umwandeln können.

### 2.2.2 Neutralrot-Test

Der Neutralrot-Test (entwickelt von BORENFREUND & PUERNER 1984) ist ein Assay zur Messung von Zytotoxizität in Monolayer-Kulturen. Das Testprinzip basiert darauf, dass nur vitale Zellen den wasserlöslichen, schwach basischen Farbstoff Neutralrot aufnehmen, transportieren und in ihren Lysosomen speichern können. Das Neutralrot kann durch die Plasmamembran diffundieren und sich in den Lysosomen konzentrieren (BITENSKY 1963, NEMES et al. 1979). Man nimmt an, dass die Akkumulation des Farbstoffes innerhalb der Lysosomen durch Abfangen der protonierten Form des Neutralrots im sauren Milieu dieser Organellen erfolgt sowie teilweise auch durch die Bindung des Farbstoffes an saure Ladungen innerhalb der Lysosomen, wie z. B. an saure Polysaccharide (BULYCHEV et al. 1978). Änderungen der Zelloberfläche oder der sensiblen lysosomalen Membran scheinen zur Fragilität der Organellen und anderen Veränderungen zu führen, die fortschreitend irreversibel werden (BITENSKY 1963). Bei beginnender Zytotoxizität kommt es zunächst durch eine Steigerung der Stoffwechselaktivität der Zellen kurzfristig zur verstärkten Einlagerung des Neutralrots. Werden die Zellen durch toxische Substanzen jedoch in stärkerem Maße geschädigt, wird der Farbstoff nicht länger von den Membranen der Lysosomen zurückgehalten, und auch die Barrierefunktion der Plasmamembran geht verloren (FILMAN et al. 1975). In Folge der Inkubation mit Substanzen in stark zytotoxischen Konzentrationen kommt es somit zur Reduktion der Farbstoffeinlagerung und schließlich zum Zelltod. Die Einlagerung des Farbstoffes kann nach seiner Freisetzung aus den Zellen und Fixierung photometrisch bestimmt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Neutralrot-Test zur Ermittlung der Konzentrationsbereiche eingesetzt, in denen die zu untersuchenden Testsubstanzen zytotoxische Effekte in kultivierten PUBEC hervorrufen.

### 2.2.2.1 Testdurchführung

Der Neutralrot-Test wurde in Anlehnung an die Vorschrift von BABICH und BORENFREUND (1992) durchgeführt. Parallel zur Neutralrot-Aufnahme wurde die Zellproliferation anhand des Proteingehaltes bestimmt.

Der Zytotoxizitätstest wurde in 96-Depot-Platten angesetzt (siehe 2.2.1.7), in denen PUBEC 24 h lang in Achtfachbestimmung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen (siehe 2.2.1.8) behandelt wurden. Anschließend wurde das Inkubationsmedium entfernt und durch 200 µl Neutralrot-Lösung ersetzt. Nach einer weiteren Behandlungszeit von 3 h wurden die Zellen dreimal mit 37°C warmem PBS gewaschen. Durch Zugabe von 200 µl Fixierlösung (50% (v/v) Ethanol, 1% (v/v) Essigsäure) pro Vertiefung und 20 min andauernder, ständiger Bewegung auf einem Schüttler (600 rpm) wurde der von den Zellen aufgenommene Farbstoff solubilisiert. Im Anschluss daran wurde die Extinktion in einem Achtkanal-Photometer bei einer Wellenlänge von 540 nm erfasst. Direkt im Anschluss an diese Messung wurde das Neutralrot aus den Mikrotiterplatten entfernt, und die Depots wurden fünfmal mit 200 µl PBS (37°C) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Gewebekulturplatte auf Zellstoff ausgeklopft, und pro Vertiefung wurden 10 µl 0,1% (v/v) Triton X-100 zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Platten mindestens 30 min lang bei -70°C bis zur Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure Assay (siehe 2.2.7) eingefroren.

### 2.2.2.2 Auswertung

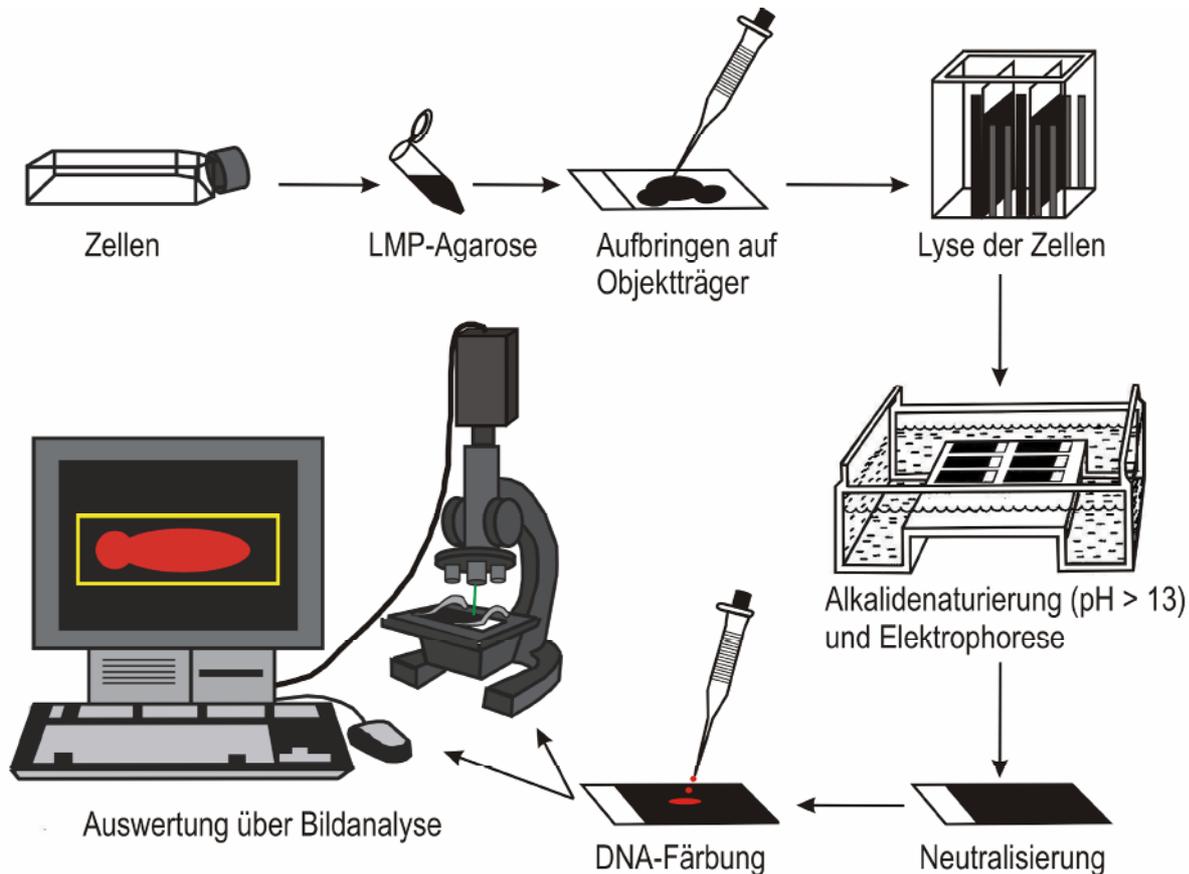
Von jeweils acht Depots einer Konzentration pro Test wurde der Mittelwert bestimmt. Jeder Versuch wurde mindestens einmal wiederholt. Aus den Werten der einzelnen Wiederholungsversuche wurden Mittelwert und Standardabweichung für jede Konzentration der Testsubstanz berechnet.

Die Neutralrot-Aufnahme wurde in Prozent der Lösemittelkontrolle (DMSO bzw. Aqua bidest. bei DMN) angegeben: Der Mittelwert dieser Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Davon ausgehend wurde die Neutralrot-Aufnahme der Zellen bei Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz berechnet. Aus der graphischen Darstellung der Test-Ergebnisse wurden für jede Substanz – sofern möglich – die IC<sub>20</sub>-, IC<sub>50</sub>- und IC<sub>80</sub>-Werte (inhibitorische Konzentrationen, bei denen die Neutralrot-Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle um 20%, 50% bzw. 80% reduziert ist) ermittelt.

### 2.2.3 COMET Assay (alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese)

Mit Hilfe der alkalischen Einzelzell-Gelelektrophorese (entwickelt von SINGH et al. 1988) lassen sich DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie alkalilabile Stellen in individuellen Zellen detektieren. In diesem Assay macht man sich zunutze, dass die elektrophoretische Beweglichkeit der DNA von der Konformation des DNA-Moleküls abhängt (ANDRAE 1996). Je stärker die DNA einer Zelle fragmentiert

ist, desto weiter wandern die DNA-Bruchstücke im elektrischen Feld vom Zellkern in Richtung der Anode, während ungeschädigte DNA aufgrund ihrer Komplexität in der Kernregion verbleibt und nicht wandert. Einzelzellen (behandelt oder unbehandelt) werden in Agarose eingebettet, auf Objektträger aufgebracht, zur Freisetzung der DNA in Detergenzienlösung mit hohem Salzgehalt lysiert und anschließend unter alkalischen Bedingungen ( $\text{pH} > 13$ ) einem elektrischen Feld ausgesetzt (Abb. 8).



**Abb. 8:** Schematischer Ablauf des COMET Assay (entnommen aus SPEIT & HARTMANN 1999 und leicht modifiziert)

Die in Agarose eingebetteten Zellen bilden im Gel einen Hohlraum, der nach der Lyse der Zellen von der DNA besetzt wird. Während andere Biomoleküle leicht aus der Agarose in die Lyselösung diffundieren, verbleibt die DNA aufgrund ihres sehr großen Molekulargewichtes in dem entstandenen Hohlraum (OSLTING & JOHANSON 1984). Im Verlaufe der alkalischen Behandlung kommt es durch Strangbrüche und alkalilabile Stellen zu einer partiellen Entspannung der kompakten DNA-Struktur und einer teilweisen Entwindung der DNA-Stränge (ANDRAE 1996). DNA-Fragmente können aus dem Zellkern austreten und durch das Anlegen einer Spannung im elektrischen Feld zur Anode wandern, während ungeschädigte DNA hingegen im Hohlraum des Gels verbleibt. Nach der Elektrophorese wird die DNA mit einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, wie z. B. Ethidiumbromid, angefärbt und das Wanderungsverhalten der DNA einzelner Zellen im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die teilweise aus dem Kern

migrierte, angefärbte DNA hat die Form eines Kometen, was namensgebend für diesen Test war (COMET Assay).

### 2.2.3.1 Testdurchführung

Der COMET Assay wurde in Anlehnung an die Methode von SINGH et al. (1998) mit einigen Veränderungen, unter Berücksichtigung der Leitfaden-Vorschläge von TICE et al. (2000), durchgeführt. PUBEC wurden in 24-Depot-Platten ausgesät (siehe 2.2.1.7) und 24 h lang kultiviert. Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgte wie unter 2.2.1.8 beschrieben. Der Test wurde mindestens zweimal durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden PUBEC mit Kaliumdichromat (10, 50 und 100  $\mu\text{M}$ ) und Benzo[a]pyren (50 und 100  $\mu\text{M}$ ) inkubiert. Zur Negativkontrolle wurden Zellen nur mit DMSO oder Aqua bidest. behandelt.

### Präparation der Objektträger

Um das Haften der Mikrogele aus Zellen und LMP-Agarose auf Objektträgern zu ermöglichen, war es notwendig, diese zuvor mit Agarose zu beschichten. Objektträger mit Mattrand wurden zunächst durch 60minütige Inkubation in Diethylether/Ethanol (1:2) und folgender 30minütiger Behandlung in 70% (v/v) Ethanol entfettet und anschließend bei RT getrocknet. Zur Beschichtung wurde eine 1,5%ige (w/v) Agarose-Lösung in PBS angesetzt. Diese wurde 2 – 3 Mal in der Mikrowelle aufgeköcht und anschließend auf einer Heizplatte auf ca. 60°C temperiert. Die Objektträger wurden durch Eintauchen in die Agarose bis zur Hälfte des Mattrandes mit einer Basalschicht versehen. Die Unterseite wurde direkt nach dem Eintauchen mit einem Tuch aus Zellstoff abgewischt. Zum Aushärten der Agarose-Schicht wurden die Objektträger über Nacht horizontal bei Raumtemperatur gelagert.

### Herstellung von LMP („low melting point“) Agarose-Aliquots

LMP-Agarose (0,5% (w/v) in PBS) wurde zweimal in der Mikrowelle aufgeköcht. Jeweils 500  $\mu\text{l}$  Aliquots wurden in Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert und bis zum Einsatz im COMET Assay bei 4°C gelagert. Vor Versuchsbeginn wurde die benötigte Menge an LMP-Agarose-Portionen in einer mit Wasser gefüllten Glasschüssel in der Mikrowelle (ca. 3 min, 600 W) geschmolzen und bis zur Verwendung im Wasserbad bei 37°C aufbewahrt.

### Zellpräparation

Zum Ende der Behandlungsperiode wurde das Inkubationsmedium mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen. Die Zellen wurden zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 200  $\mu\text{l}$  Trypsin-EDTA-Lösung vom Substrat abgelöst. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$

Deaktivierungsmedium wurden die Zellen in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (200 g, 5 min bei 4 – 8°C). Das Sediment wurde in PBS resuspendiert und eine Zellzahl von  $2 \times 10^6$  pro ml eingestellt. Zu 500 µl auf 37°C temperierter LMP-Agarose wurden 50 µl der Zellsuspension gegeben und sehr vorsichtig durchmischt. Pro Behandlungsansatz wurden je 200 µl der Lösung auf zwei beschichtete Objektträger pipettiert. Eine ebene Oberfläche des Mikrogels wurde durch Auflegen eines Deckglases geschaffen. Die Objektträger wurden, um das Erstarren der Agarose zu beschleunigen, horizontal auf einer eisgekühlten Metallplatte gelagert. Nach ca. 5 min wurde das Deckglas vorsichtig von den Gelen abgezogen und die Objektträger mindestens 2 h lang (oder über Nacht) bei 4 – 8°C in eine mit vorgekühltem Lysepuffer befüllte Hellendahl-Küvette gestellt. Die auf die Lyse folgenden Schritte des COMET Assay (bis inklusive der Elektrophorese) wurden ohne direkten Lichteinfall durchgeführt, um das Entstehen UV-induzierter DNA-Strangbrüche zu verhindern.

### **Alkalidenaturierung und Elektrophorese**

Nach der Lyse der Zellen wurden die Objektträger kurz in Aqua bidest. getaucht und anschließend mit dem Mikrogel nach oben und dem Mattrand in Richtung Kathodeweisend auf die Plattform der Elektrophoresekammer gelegt. Diese wurde mit gekühltem Elektrophoresepuffer (4 – 8°C) aufgefüllt, sodass die Objektträger ca. 2 – 3 mm hoch bedeckt waren. Zur Alkalidenaturierung der DNA wurden die Proben 30 min lang in diesem alkalischen Puffer (pH > 13) belassen. Direkt im Anschluss an diese Behandlung wurde eine 30minütige Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 25 V und einem Stromfluss von 300 mA bei 4 – 8°C durchgeführt. Der Stromfluss wurde über das Volumen des Elektrophoresepuffers reguliert.

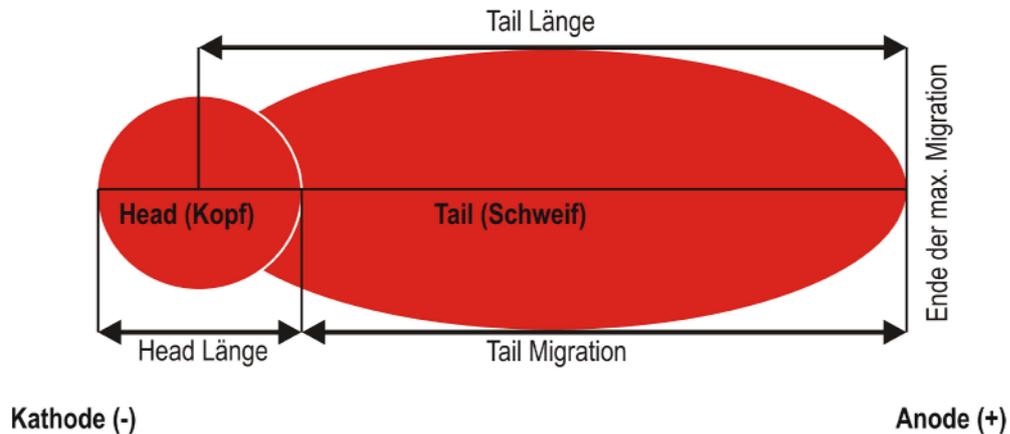
### **Neutralisierung und Dehydrierung der Gele**

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Objektträger vorsichtig aus der Kammer genommen und in Aqua bidest. getaucht. Im Folgenden wurden die Mikrogele 15 min lang im Neutralisationspuffer in Hellendahl-Küvetten neutralisiert und danach durch eine aufsteigende Alkoholreihe (jeweils 5 min lang 50% (v/v), 75% (v/v) und 100% (v/v) Ethanol) entwässert. Die dehydrierten Gele konnten für mehrere Monate bis zur Färbung und Auswertung (staubfrei, im Dunkeln) gelagert werden.

#### **2.2.3.2 Auswertung**

Für die Analyse der Strangbrüche wurde die DNA in den dehydrierten Mikrogelen mit Ethidiumbromid angefärbt (30 µl pro Objektträger), mit einem Deckglas bedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop zunächst bei 100facher Vergrößerung betrachtet. Für die Erfassung der DNA-Schäden wurden 50 Zellkerne pro Objektträger und jeweils zwei Objektträger pro Konzentration bei 400facher Vergrößerung mit

Hilfe einer Videokamera und der Analysesoftware „Comet Assay II“ ausgewertet. Hierbei wurden die Objektträger mäanderförmig durchmustert. Zellkerne, die sich im Randbereich der Objektträger befanden, oder solche, die zu dicht nebeneinander lagen, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Man unterteilt die Kometen in Kometenschweif (Tail) und -kopf (Head). Zur Auswertung wird im Allgemeinen der Kometenschweif vermessen (Abb. 9).



**Abb. 9:** Schematische Darstellung der Vermessungsparameter der Kometenauswertung

Mit Hilfe der Auswertesoftware „Comet Assay II“ wurde der Schädigungsgrad als Tail Länge, Tail Moment und Tail Intensität (Tab. 5) erfasst.

**Tab. 5:** Parameter, die zur Auswertung des COMET Assay herangezogen wurden

Auswertungsparameter	Definition	Maßeinheit
<b>Tail Länge</b>	Entfernung von der halben Head Länge bis zum Ende der maximalen Migration	µM
<b>Tail Intensität</b>	Summe aller Intensitätswerte im Tail abzüglich derer der halben Head Länge (Verhältnis von DNA im Tail zu DNA im Head)	%
<b>Tail Moment</b>	Produkt von DNA im Tail (Tail Intensität) und der mittleren Entfernung der Migration im Tail (~ Tail Intensität x Tail Länge)	dimensionslos

Von jeweils 100 analysierten Zellkernen pro Konzentration wurde für jeden Versuch der Medianwert ermittelt. Aus den Medianwerten der mindestens zwei unabhängig durchgeführten Versuche wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Zum besseren Vergleich der relativen DNA-Schädigung zwischen den unterschiedlichen Versuchen wurden zusätzlich die erhaltenen Medianwerte nach Behandlung mit einer Testsubstanz auf die DMSO-

Kontrolle des jeweiligen Versuches bezogen. Aus den so erhaltenen relativen Tail Intensitäten wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

## 2.2.4 Modifizierter COMET Assay mit Reparaturenzym zur Bestimmung oxidativer Basenveränderungen

Mit Hilfe eines modifizierten COMET Assay können oxidative Basenveränderungen der DNA sichtbar gemacht werden. Hierbei wird die nach der Zellyse freigesetzte DNA in den Mikrogelen mit einem Reparaturenzym behandelt, welches oxidative Basenmodifikationen erkennt und ausschneidet. Ein solches Enzym ist die Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg). Es handelt sich hierbei um ein bakterielles Reparaturenzym, dessen Aufgabe darin besteht, die promutagene DNA Läsion 8-Oxoguanin (8-oxoG; Abb. 10) in der DNA zu entfernen (BOITEUX et al. 1987). Fpg fungiert sowohl als N-Glykosylase als auch als AP-Lyase. Durch die N-Glykosylase-Aktivität werden beschädigte Purine aus der doppelsträngigen DNA freigesetzt, wobei apurinische Stellen (AP-Stellen) entstehen, die alkaliabil sind und nach der Alkalidenaturierung als DNA-Strangbruch sichtbar werden. Die AP-Lyase-Aktivität des Enzyms spaltet sowohl 3' als auch 5' der AP-Stelle, wobei es die AP-Stelle entfernt und eine Lücke von einer Base hinterlässt.

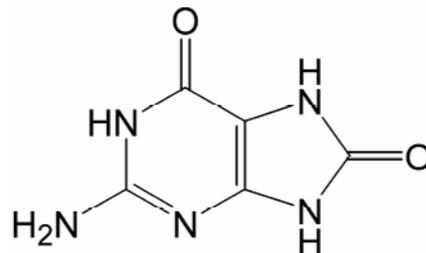


Abb. 10: Strukturformel von 8-Oxoguanin (8-oxoG).

### 2.2.4.1 Testdurchführung

Zur Untersuchung oxidativer DNA-Schäden wurde der modifizierte COMET Assay mit dem Reparaturenzym Fpg in Anlehnung an die Methode von COLLINS et al. (1993, 1996) durchgeführt.

Bis auf die folgenden Ausnahmen wurde der modifizierte COMET Assay bis zum Schritt der Zellyse genauso durchgeführt wie unter 2.2.3.1 beschrieben: Die Einzelversuche wurden als Doppelbestimmung (jeweils 2 Objektträger pro Konzentration und Behandlung mit entweder Fpg oder Enzympuffer) angesetzt. Als Positivkontrolle für oxidative DNA-Schäden wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  verwendet. Hierzu wurden Mikrogele mit unbehandelten Zellen vor der Lyse 10 min lang mit 10 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  (in PBS) in quadriPERM™ Platten auf Eis inkubiert. Für die folgende Behandlung mit Enzympuffer wurden die Zellen mit 10 und 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , für die Fpg-Inkubation nur mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelt. Anschließend wurden die

Mikrogele zweimal mit eiskaltem PBS Puffer gewaschen und in gesonderten Hellendahl-Küvetten lysiert. Sämtliche auf die Lyse folgenden Schritte wurden in abgedunkelten Räumen durchgeführt.

Nach mindestens 2 h andauernder Lyse wurden die Objektträger dreimal 5 min lang in eiskaltem Enzympuffer gewaschen. Die Objektträger wurden nach dem letzten Waschschrift auf ihrer Unterseite trocken gewischt und in quadriPERM™ Platten platziert. Anschließend wurden 200 µl eisgekühlter Enzympuffer mit 0,2 mg/ml BSA oder 200 µl eisgekühltes Fpg (8000 U/ml, 1:3000 in Enzympuffer mit 0,2 mg/ml BSA verdünnt) auf die Mikrogele pipettiert, und ein Deckglas wurde aufgelegt. Nach 30 min langer Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Deckgläser vorsichtig von den Gelen abgezogen. Die Objektträger wurden kurz in Aqua bidest. getaucht und mit dem Mikrogel nach oben und dem Matt- rand in Richtung Kathode zeigend auf die Plattform der Elektrophoresekammer gelegt. Die folgenden Schritte (Alkalidenaturierung, Elektrophorese, Neutralisierung, Dehydrierung und Analyse der DNA-Strangbrüche) wurden wie unter 2.2.3.1 beschrieben durchgeführt.

#### 2.2.4.2 Auswertung

Die Analyse der DNA-Strangbrüche erfolgte mit Hilfe der Auswertesoftware „Comet Assay II“. Wie unter 2.2.3.2 beschrieben, wurden die Tail Intensitäten von insgesamt 100 Zellkernen pro Konzentration ermittelt. Für die Quantifizierung spezifischer oxidativer Schäden ( $\Delta$  Tail Intensität [%]) wurde für jede untersuchte Konzentration der Testsubstanz die Differenz der Tail Intensitäten nach Pufferinkubation (DNA Strangbrüche im konventionellen COMET Assay) und nach Enzymbehandlung (Gesamt-DNA-Schäden inklusive oxidativer DNA Schäden, die durch Fpg detektiert werden) gebildet.

#### 2.2.5 Mikrokern-Test (*in vitro*)\*

Mit Hilfe des Mikrokern-Tests können genotoxische Effekte in proliferierenden Zellen untersucht werden. Bei Mikrokernen handelt es sich um Chromosomenfragmente oder vollständige Chromosomen, die von einer Kernmembran umgeben sind. Lokalisiert sind sie im Zytosol außerhalb des eigentlichen Zellkerns, dem Hauptkern. Mikronuklei entstehen während der Mitose aufgrund von Chromosomenbrüchen (klastogener Effekt) oder Fehlverteilungen von Schwesterchromatiden auf die Tochterzellen (aneugener Effekt), die z. B. durch Behandlung mit Xenobiotika herbeigeführt werden können (Abb. 11).

---

\* Der Mikrokern-Test (*in vitro*) wurde von der Postdoktorandin Dr. Claudia Behm (IfADo) durchgeführt und ausgewertet.

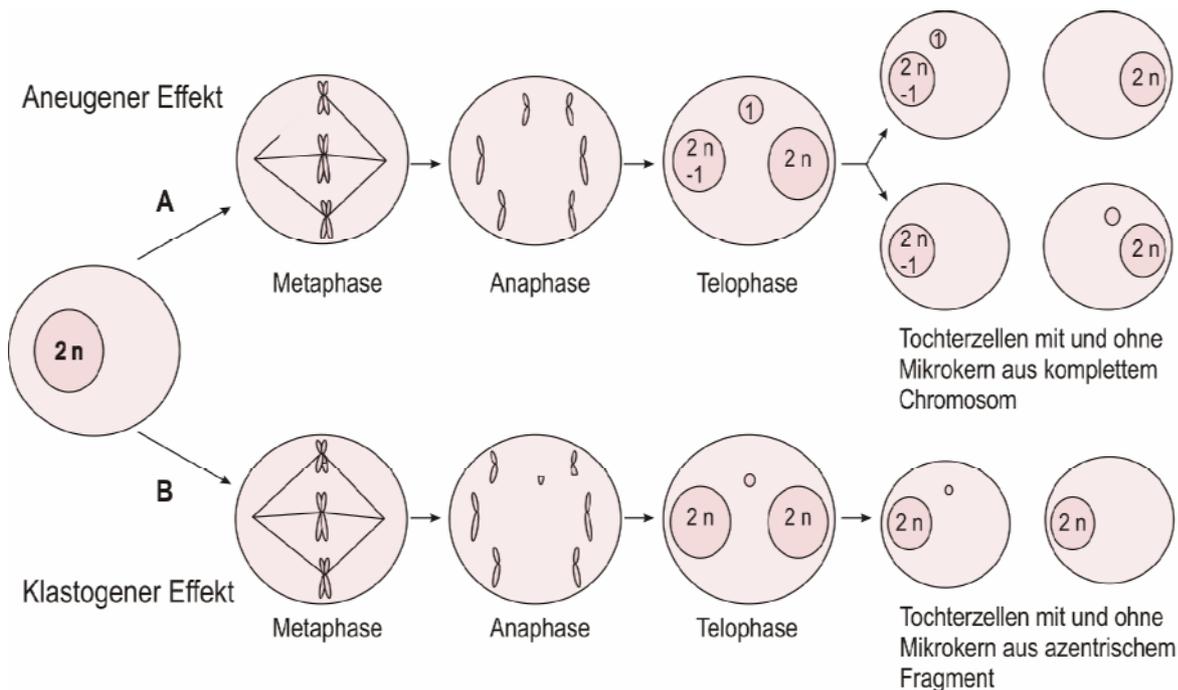


Abb. 11: Schema der Mikrokernstehung (modifiziert nach ANDRAE 1996).

### 2.2.5.1 Testdurchführung

Der Mikrokern-Test wurde nach der *in vitro* Methode von MATSUOKA et al. (1992) mit einigen Modifikationen durchgeführt.

$10^6$  frisch isolierte PUBEC wurden in mit 100  $\mu$ l Kollagen (2 mg/ml) beschichtete 25 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurde das Kulturmedium gewechselt, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Nach zwei Tagen in Kultur wurde das Zellkulturmedium entfernt und durch frisches ersetzt, welches mit den Testsubstanzen supplementiert war. Die DMSO-Endkonzentrationen in diesen Versuchen betrug 1% (v/v) für B[a]P oder 4-ABP, 0,2% (v/v) für die Co-Inkubation von 4-ABP und B[a]P und 0,1% (v/v) für AN oder CSC. DMN wurde in Aqua bidest. gelöst. Nach einer 30-stündigen Behandlungszeit wurde das Inkubationsmedium entfernt und die Zellen mit Hilfe von Trypsin-EDTA vom Substrat abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden bei RT mit 0,4% (w/v) Natriumzitratlidhydrat hypoton behandelt und anschließend zentrifugiert (130 g, 10 min). Der Überstand wurde abgenommen, das Sediment in 5 ml eisgekühlter Fixierlösung A resuspendiert und 15 min lang bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Dieser Fixationsschritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand entfernt und das Sediment in 0,5 ml frischer Fixierlösung B resuspendiert. Einige Tropfen der Suspension wurden anschließend auf Objektträger überführt und durch Auflegen des Objektträgers auf eine heiße Heizplatte fixiert. Die Objektträger wurden mit Acridinorange-Lösung gefärbt und unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops Leica DMLB ausgewertet. Als Positivkontrollen wurden 25 nM Vincristin, 33 und 100  $\mu$ M Cyclophosphamid sowie in einigen Versuchen 2,5 mM Methylmethansulfonat eingesetzt.

### 2.2.5.2 Auswertung

Für jede Konzentration wurde die Anzahl an Zellen mit Mikrokernen innerhalb von mindestens 2000 Zellen mit gut erhaltenem Zytoplasma nach folgenden Kriterien analysiert (COUNTRYMAN & HEDDLE 1976):

- Die Fläche des Mikrokerns betrug weniger als ein Drittel des Hauptkerns.
- Die Mikronuklei waren innerhalb des Zytoplasmas der Zelle lokalisiert.
- Die Mikrokerne waren nicht über nukleoplasmatische Brücken mit dem Hauptkern verbunden.
- Die Mikronuklei hatten dieselbe Farbe wie der Hauptkern.

Es wurden ausschließlich Zellen mit einem Hauptkern gezählt. Multinukleäre Zellen und solche, die mehr als vier Mikrokerne enthielten, wurden nicht berücksichtigt.

### 2.2.6 Zellhomogenisierung

Vor der Messung der Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme in Zellen war es notwendig, diese zu homogenisieren. Die Zellen wurden nach der Inkubation mit verschiedenen Testsubstanzen zweimal mit PBS gewaschen und wie unter 2.2.1.7 beschrieben mit Trypsin-EDTA vom Substrat abgelöst. Nach der Zentrifugation (5 min, 200 g) wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in 2 ml PBS resuspendiert und 5 – 10 min lang bei 1300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Frische PUBEC wurden nach dem letzten Waschschrift der Präparation (siehe 2.2.1.2) verwendet und wie oben beschrieben prozessiert und gelagert.

Sämtliche im Folgenden aufgeführten Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Jedem Zellsediment wurden 100  $\mu\text{l}$  Homogenisierungspuffer zugegeben, und die Zellen wurden mit Hilfe eines motorbetriebenen Stößels „*Pellet Pestle*®“ in einem Eppendorfreaktionsgefäß ca. 1 min lang homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension in ein 12 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und das Eppendorfreaktionsgefäß mit 50  $\mu\text{l}$  Homogenisierungspuffer nachgespült. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Ultraschallstabes bei einer maximalen Amplitude von 40% weiter lysiert. Die Ultraschallbehandlung erfolgte im Intervallmodus von 3 – 5 x 10 s.

### 2.2.7 Bicinchoninsäure Assay

Der Bicinchoninsäure (BCA) Assay zur Proteinbestimmung wurde 1985 von SMITH et al. entwickelt. In dieser Untersuchungsmethode wird das Natriumsalz der BCA als Detektionssystem in Kombination mit der Biuret-Reaktion verwendet.

Das Testprinzip basiert darauf, dass zunächst  $\text{Cu}^{2+}$  durch Peptidbindungen von Proteinen in alkalischer Lösung zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert wird. Die BCA reagiert spezifisch mit den  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen im Verhältnis 2:1 und bildet mit ihnen einen stabilen, wasserlöslichen violetten Komplex. Die Absorption des erhaltenen Farbkomplexes, die direkt proportional zur Proteinkonzentration ist, kann photometrisch bestimmt werden.

### 2.2.7.1 Testdurchführung

Die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Zellhomogenate wurden mit Hilfe eines Kits bestimmt. Als Standardprotein mit bekannter Konzentration wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

Für die Proteinbestimmung von Zellhomogenaten (siehe 2.2.6) wurde in Homogenisierungspuffer gelöstes BSA im Konzentrationsbereich zwischen 0,25 mg/ml und 2 mg/ml (in äquidistanten Abstufungen) eingesetzt. Jeweils 10  $\mu\text{l}$  eines 1:10 und 1:20 in Homogenisierungspuffer verdünnten Zellhomogenats bzw. 10  $\mu\text{l}$  der BSA-Standardlösung wurden in die Vertiefungen der Platte pipettiert. Das Standardprotein wurde in Doppel-, die Proben mit unbekanntem Proteingehalt wurden in Dreifachbestimmung eingesetzt.

Für die Proteinbestimmung von Zelllysaten aus dem Neutralrot-Test (siehe 2.2.2) wurde in Aqua bidest. verdünntes BSA im Konzentrationsbereich zwischen 0,2 mg/ml und 2,0 mg/ml eingesetzt. Im Konzentrationsbereich zwischen 0,2 und 1,0 mg/ml waren die Abstufungen 0,2 mg/ml. Zwischen 1,0 und 2,0 mg/ml lagen keine weiteren Konzentrationen. Für die Proteinbestimmung wurden die bei  $-70^\circ\text{C}$  eingefrorenen 96-Depot-Platten wieder aufgetaut. Jeweils 10  $\mu\text{l}$  der BSA-Standardlösung wurden in Doppelbestimmung in Vertiefungen der Platte pipettiert, die keine Zellen enthielten.

Die Reagenzien A und B wurden nach Vorschrift des Herstellers im Verhältnis 50:1 zusammengegeben und gut miteinander vermischt. Jeweils 200  $\mu\text{l}$  des Reagenzgemisches wurden zu den Proben pipettiert, und die Mikrotiterplatte wurde 30 s lang auf dem Plattenschüttler bei 600 rpm geschüttelt. Danach wurde der Ansatz 30 min lang bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank inkubiert. Im direkten Anschluss daran wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 570 nm im Achtkanal-Photometer gemessen.

### 2.2.7.2 Auswertung

Die Proteinkonzentrationen der Zellhomogenate wurden anhand einer mit Hilfe des BSA ermittelten Standardkurve berechnet.

Die Proteinbestimmung von Zelllysaten aus dem Neutralrot-Test wurde analog dem Neutralrot-Test ausgewertet (siehe 2.2.2.2). Der Proteinwert wurde in Prozent der Lösemittelkontrolle angegeben.

## 2.2.8 SDS PAGE („sodium dodecyl sulfate polyacrylamide-gel electrophoresis“)

Proteine können mit Hilfe der SDS PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Bei dieser Methode dient ein Gel aus Polyacrylamid als chemisch inerte Matrix, durch die aufgetragene Proteine im elektrischen Feld wandern können. Unter Verwendung des stark anionischen Detergenz SDS werden Proteine denaturiert und bilden mit ihm einen negativ geladenen Komplex, der im elektrischen Feld in Richtung Anode migriert. Die Porengröße des Gels bestimmt hierbei die Auftrennungsschärfe.

### 2.2.8.1 Durchführung

Mit Hilfe der SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese wurden Zellysate aus frisch isolierten oder mit Testsubstanzen behandelten PUBEC der Größe nach separiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen nach der Methode von LAEMMLI (1970).

### Herstellung der Gele

Diskontinuierliche Polyacrylamidgele (je 8 x 10 cm) von 1 mm Dicke wurden in einer Hoefer™ Gießkammer, die für zehn Gele ausgerichtet war, gegossen. Die Zutaten (bis auf APS und TEMED) für Trenn- und Sammelgele wurden wie in Tab. 6 beschrieben gemischt und entgast. Unmittelbar vor dem Gießen der Gele wurden APS und TEMED zum Auslösen der Polymerisation von Acrylamid und Methylen-Bisacrylamid zugegeben. Die fertigen Gele wurden bis zu ihrem Gebrauch in feuchten Tüchern eingewickelt bei 4 – 8°C gelagert.

**Tab. 6:** Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen (beide 10%ig), die Angaben sind für 10 kleine Gele

Trenngel		Sammelgel	
Acrylamid A	35,35 ml	Acrylamid B	7,20 ml
Trenngelpuffer	45,00 ml	Sammelgelpuffer	18,75 ml
10% SDS	1,08 ml	10% SDS	375 µl
Aqua bidest.	5,35 ml	Aqua bidest.	7,35 ml
APS	2,28 ml	APS	750 µl
TEMED	191,25 µl	TEMED	75 µl

### Vorbereitung der Proben

Die Zellysate wurden zu gleichen Teilen mit Probenpuffer vermischt, anschließend 5 min lang aufgeköcht und im Folgenden auf Eis gestellt. Entweder wurden Proben direkt auf Gele aufgetragen oder für eine spätere Verwendung bei –20°C gelagert.

## **Elektrophoretische Auftrennung der Proteine**

Pro Spur wurden 2 - 10 µg Protein in einem Probenvolumen von 10 µl in die Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer vertikalen Apparatur in Laufpuffer. Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte 10 – 15 min lang (220 V und 20 mA pro Gel). Die Proteine wurden ca. 45 min lang bei einer konstanten Spannung von 220 V und einem Stromfluss von 40 mA pro Gel separiert. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und verworfen. Das Trenngel wurde im Western Blot verwendet (siehe 2.2.9).

## **2.2.9 Western Blot**

Die Western Blot Methode wurde von TOWBIN et al. (1979) entwickelt. Sie basiert auf dem elektrophoretischen Transfer von aufgetrennten Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrozellulosemembranen und ihrem Nachweis mittels spezifischer Antikörper.

### **2.2.9.1 Durchführung**

Die Western Blot Methode wurde eingesetzt, um spezifische Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme in behandelten sowie in frisch präparierten Zellen zu untersuchen. Es wurden Zelllysate verwendet, die zuvor in einer SDS PAGE der Größe nach getrennt wurden (siehe 2.2.8). Als Standard für den CYP1A1-Nachweis wurden Lebermikrosomen von Ratten, die gegen 3-Methylcholanthren (3-MC) exponiert worden waren (ROOS 2002), verwendet. Im Folgenden wird dieser Standard, von dem der genaue Anteil an CYP1A1-Protein nicht bekannt ist, als „3-MC Mikrosomen“ bezeichnet.

### **Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran**

Die in der SDS PAGE aufgetrennten Proteine wurden in einem Nassverfahren in einer Transferpuffergefüllten Blottingkammer vom Polyacrylamidgel auf eine Protran® Nitrozellulosemembran transferiert, die zuvor in Transferpuffer äquilibriert wurde. Für den Proteintransfer wurde ein „Sandwich“ aus Faserschwamm, Filterpapier, Gel, Nitrozellulosemembran, Filterpapier und Faserschwamm in einer Transferkassette in die Blottingkammer eingehängt. Der elektrophoretische Transfer erfolgte vom Gel (Kathode) auf die Nitrozellulosemembran (Anode) unter Kühlung 1 h lang bei einer Spannung von 220 V und einem Stromfluss von 400 mA. Nach der Proteinübertragung wurde der Blot zur Absättigung freier Bindungsstellen über Nacht (4 – 8 °C) in PBS mit 0,1% (v/v) Tween und 5% (w/v) Magermilchpulver belassen.

### **Proteinnachweis mit spezifischen Antikörpern**

Sämtliche im Folgenden aufgeführten Behandlungsschritte wurden bei RT in einem Kunststoffkästchen auf einem Wipptisch mit einer Schüttelfrequenz von 50/min durchgeführt. Zwischen den jeweiligen Inkubationsschritten wurden die Blots wie folgt mit PBS mit 0,1% (v/v) Tween gewaschen:

- 2 x kurzes Abspülen
- 1 x 15 min
- 2 x 5 min

Vor der Inkubation mit Antikörpern wurden die Blots 15 min lang mit Avidin (2 µg/ml in PBS) und danach 10 min lang mit Biotin (40 ng/ml in PBS) behandelt. Anschließend wurden die Blots wie folgt inkubiert:

- 60 min Inkubation mit dem Primärantikörper (anti-CYP1A1 1:300 in PBS)
- 90 min Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus IgG, 1:1000 in PBS mit 0,1% (v/v) Tween)
- 90 min Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase (2 µg/ml in PBS)

Die Antigen-Antikörper-Reaktion wurde mit Hilfe von ECL™ Detektionsreagenz nach Vorschrift des Herstellers detektiert. Nach Inkubation mit dem Detektionsreagenz (1 min) wurde die Nitrozellulosemembran luftblasenfrei mit Frischhaltefolie überzogen, auf einen Röntgenfilm aufgebracht und in der Dunkelkammer 3, 10 und 30 min lang in einer Röntgenfilmkassette belichtet. Anschließend wurde der belichtete Film 90 s lang entwickelt und fixiert. Der entwickelte Röntgenfilm wurde, nachdem er an der Luft getrocknet war, auf eine Durchlichteinheit gelegt und mit einer CCD-Kamera fotografiert und digitalisiert (TIFF-Datei).

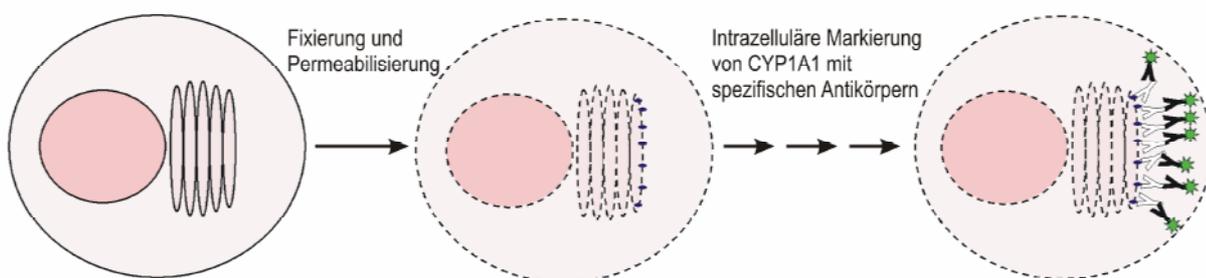
#### **2.2.9.2 Auswertung**

Die Proteinbanden auf dem digitalisierten Röntgenfilm wurden mit Hilfe der Software „WinCam 2.1“ densitometrisch vermessen und in Relation zur Proteinmenge des „3-MC Mikrosomen“ Standards gesetzt. Die so erhaltenen Werte wurden auf die eingesetzte Proteinmenge des Zellysats bezogen. Zur Darstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung wurde die relative Enzyminduktion in einem Diagramm gegen die zur Induktion verwendete Konzentration der Testsubstanz aufgetragen.

#### **2.2.10 Durchflusszytometrie: Intrazellulärer Nachweis von Enzyminduktion**

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Charakterisierung von verschiedenen Zellen (bzw. Partikeln mit einem Durchmesser von 0,4 – 120 µm) in einer Einzelzellsuspension. Von einem Flüssigkeitsstrom getragen und durch die sog. hydrodynamische Fokussierung vereinzelt, können Zellen den Strahlen-

gang eines eingebauten Lasers passieren. Während dieser Passage wird das Laserlicht abgelenkt und mittels verschiedener Detektoren erfasst. Das Vorwärts- (*forward scatter*, FSC) und Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) erlauben eine Aussage über relative Größe bzw. Granularität (innere Komplexizität) der gemessenen Einzelzellen. Simultan zu diesen Ereignissen können außerdem Fluoreszenzsignale erfasst werden, wie z. B. mittels fluorochromkonjugierter Antikörper markierte zelluläre Proteine. Auf diese Weise ist es möglich, die Induktion von Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) auf Einzelzellniveau nachzuweisen und zu quantifizieren. Allerdings ist es notwendig, aufgrund der intrazellulären Lokalisation des Enzyms in der Membran des endoplasmatischen Retikulum, die Zellen vor der spezifischen Antikörpermarkierung zu fixieren und zu permeabilisieren (Abb. 12).



**Abb. 12:** Schema der intrazellulären Markierung von CYP1A1

Das für die Messungen in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer (FACSCalibur™) war mit einem Argon- ( $\lambda = 488 \text{ nm}$ ) und einem Dioden-Laser ( $\lambda = 530 \text{ nm}$ ) ausgestattet. Für die Messungen in der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich der Argonlaser eingesetzt.

### 2.2.10.1 Durchführung

Zellen wurden zunächst in 6-Depot-Gewebekulturplatten mit Testsubstanzen behandelt (siehe 2.2.1.8). Nach Inkubationsende wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA vom Gefäßboden abgelöst, in Suspension gebracht und unter Verwendung des BD Cytofix/Cytoperm™ Kits fixiert und permeabilisiert. Die Behandlung der Zellen erfolgte unter Berücksichtigung der Anleitung des Herstellers.

#### Fixierung, Permeabilisierung und Markierung der Zellen

Pro eingesetzter Konzentration der Testsubstanz wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in ein Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und 5 min lang bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die sedimentierten Zellen in 50  $\mu\text{l}$  BD Cytofix/Cytoperm™ resuspendiert. Nach 30 min langer Inkubation im Dunkeln bei RT wurden zu jedem Ansatz 100  $\mu\text{l}$  Perm/Wash-Lösung (1:10 in Aqua bidest. Verdünnt) gegeben. Die Suspension wurde kräftig durchmischt und anschließend zentrifugiert (5 min, 200 g). Der Überstand wurde entfernt und das Zellsediment in 100  $\mu\text{l}$  Perm/Wash-Lösung aufgenommen und zu gleichen

Teilen auf zwei Eppendorfreaktionsgefäße verteilt. Anschließend wurden die Proben ein weiteres Mal zentrifugiert (5 min, 200 g) und der Überstand verworfen. Von den beiden Proben wurde eine als Negativkontrolle, die andere als Messprobe verwendet.

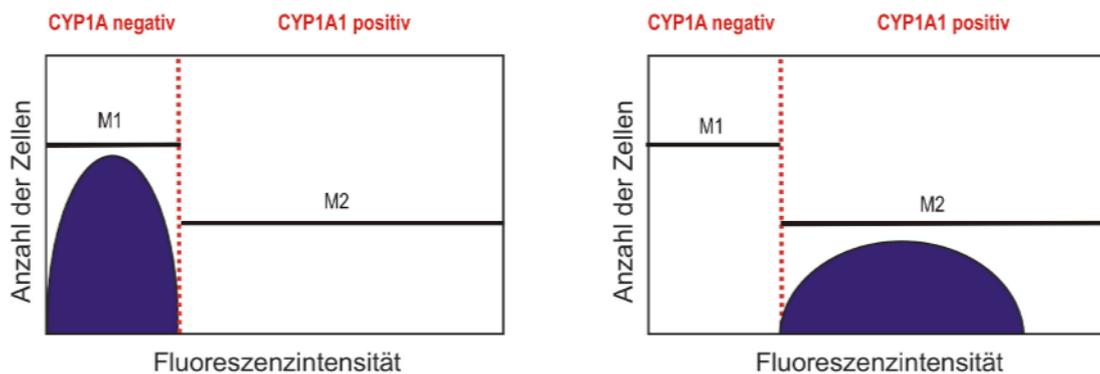
Die Zellen der Messprobe wurden 1 h lang bei RT mit 50 µl Primärantikörper (anti-CYP1A1, 1:300 in Perm/Wash verdünnt) inkubiert und anschließend 2 x mit 100 µl Perm/Wash gewaschen. Die Zellen der Negativprobe wurden in 50 µl Perm/Wash ohne Primärantikörper resuspendiert. Sowohl die Zellen der Mess- als auch die der Negativprobe wurden 1 h lang mit 100 µl Sekundärantikörper (anti-Maus IgG1-FITC, 1:300 in Perm/Wash verdünnt) behandelt und anschließend 2 x mit Perm/Wash gewaschen. Für die durchflusszytometrische Messung wurden die markierten Zellen in 500 µl Färbepuffer aufgenommen.

### Messung der Zellen

Die Messung der Zellen erfolgte mit Hilfe des Programms „CellQuest Pro“. Vor der Akquisition der Messprobe wurde stets die Negativprobe gemessen, um die Hintergrund- bzw. Autofluoreszenz der Zellen zu erfassen.

#### 2.2.10.2 Auswertung

Die Anzahl CYP1A1-positiver Zellen wurde mit Hilfe der Software „CellQuest Pro“ aus Histogrammen ermittelt, in denen die Fluoreszenzintensität und die Anzahl akquirierter Zellen („Counts“) einander gegenübergestellt waren (Abb. 13).



**Abb. 13:** Schematische Darstellung von Histogrammen, mit deren Hilfe die Anzahl CYP1A1-positiver Zellen ermittelt wurde. Links ist eine Negativprobe abgebildet, mit deren Hilfe die Auswertungsmarker M1 und M2 gesetzt wurden. Mit Hilfe der Messprobe (rechts) wurde der Anteil CYP1A1-positiver Zellen (im Bereich des Auswertungsmarkers M2) ermittelt.

Zur Bestimmung der Anzahl eindeutig CYP1A1-positiver bzw. -negativer Zellen wurden mit Hilfe der Negativprobe entsprechende Auswertungsmarker (M1 für CYP1A1-negative und M2 für CYP1A1-positive Zellen) gesetzt. Der Auswertungsmarker M2 wurde so gesetzt, dass sich ca. 0,5% (0,48 – 0,52%) der Gesamtzellen in diesem Bereich befanden. Diese hatten pro Versuchsansatz für die Negativ- und

Messprobe identische Koordinaten im Histogramm. Für die Erfassung eventuell positiver Zellen war eine Anpassung der Auswertemarker notwendig (siehe Diskussion).

### 2.2.11 Statistische Auswertung der Inkubationsversuche

Für die Berechnung der statistischen Signifikanz der Ergebnisse aus den verschiedenen Inkubationsversuchen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Dieser nicht-parametrische Test eignet sich für den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben (einzelne Konzentrationen im Vergleich zur Lösemittelkontrolle), wenn die Probenwerte der Größe nach geordnet und mit Rängen versehen werden. Die Signifikanzwerte wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS (Version 13.0) für Windows berechnet. Die statistische Signifikanz der Test-Ergebnisse im Vergleich zur Lösemittelkontrolle wird in den Abbildungen im Ergebnisteil (siehe Kapitel 3) mit Sternchen gekennzeichnet (Tab. 7).

**Tab. 7:** Unterteilung von p-Werten, die mit Hilfe statistischer Tests berechnet wurden, in Signifikanz-Kategorien

<b>p-Wert</b>	<b>Art der Signifikanz</b>	<b>Kennzeichnung im Diagramm</b>
> 0,050	nicht signifikant	keine
0,010 – 0,050	signifikant	*
0,001 – 0,010	sehr signifikant	**
< 0,001	hoch signifikant	***

Die mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 13.0 errechneten p-Werte für den Mann-Whitney-U-Test befinden sich in einer Tabelle im Anhang an diese Arbeit.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Toxikologische Aspekte von Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen: Untersuchungen zur Zytotoxizität und Genotoxizität in PUBEC**

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden zytotoxische und genotoxische Effekte von Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen auf primäre Zellen der Schweineharnblase (PUBEC) untersucht. Zu den getesteten Einzelsubstanzen gehören die bekannten Kanzerogene 4-Aminobiphenyl (4-ABP), Benzo[a]pyren (B[a]P), Dimethylnitrosamin (DMN) und Acrylnitril (AN). Außerdem wurden Zigarettenrauchkondensat (CSC) sowie 4-ABP in Kombination mit einer konstanten B[a]P-Konzentration untersucht.

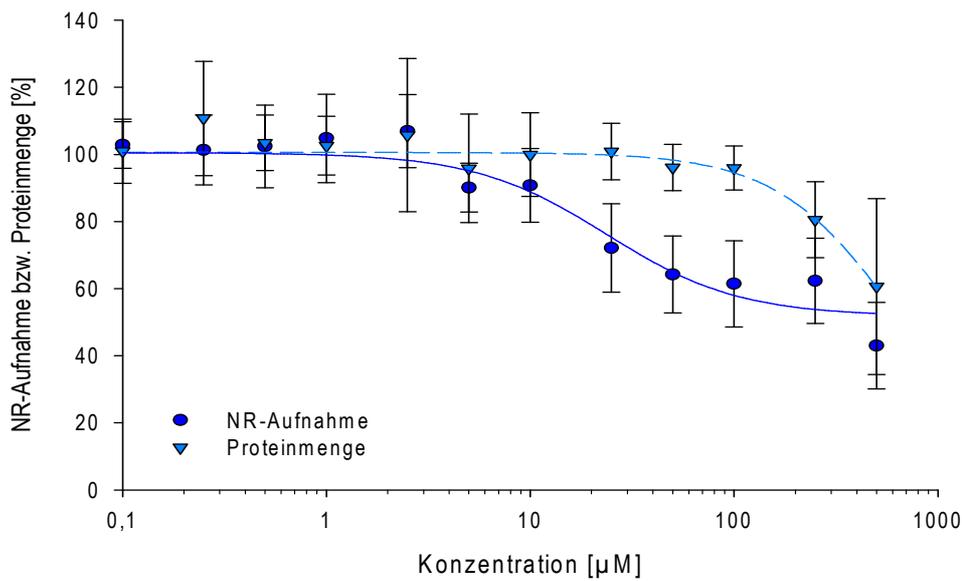
#### **3.1.1 Zytotoxizität von Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen in PUBEC – Neutralrot-Testergebnisse**

Zunächst wurde die Zytotoxizität ausgewählter Zigarettenrauch-Inhaltsstoffe mit dem Neutralrot-Test in PUBEC untersucht. Die aus diesem Test gewonnene Information über zytotoxische Konzentrationen wurde zur korrekten Beurteilung anschließend durchgeführter Genotoxizitätstests verwendet. Bei zytotoxischen Effekten kann es unter anderem zur Fragmentierung der DNA kommen, was einen genotoxischen Effekt vortäuschen und damit zur falsch positiven Beurteilung führen könnte.

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der Neutralrot-Aufnahme und der Zellproteinbestimmung nach Behandlung mit den verschiedenen Testsubstanzen dargestellt. Die Werte sind in Prozent der Lösemittelkontrolle angegeben.

##### **3.1.1.1 Zytotoxizität von 4-Aminobiphenyl in PUBEC**

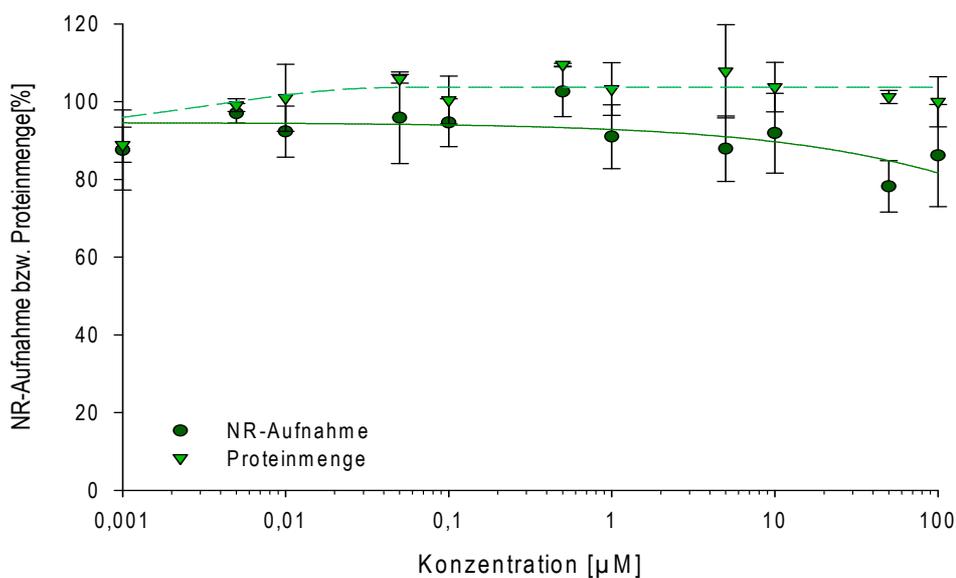
Für 4-Aminobiphenyl wurde zunehmende Zytotoxizität ab 25  $\mu\text{M}$  beobachtet (Abb. 14). Die maximal eingesetzte Konzentration (500  $\mu\text{M}$ ) führte zu einer Reduktion der Neutralrot-Aufnahme im Mittel um 50%. Die parallel hierzu untersuchte Veränderung der Zellzahl mittels Proteinbestimmung nahm erst bei 4-ABP-Konzentrationen über 100  $\mu\text{M}$  ab. Bei der maximal eingesetzten Konzentration des aromatischen Amins war die Zellzahl im Vergleich zur Lösemittelkontrolle um 40% reduziert. Wie man Abb. 14 entnehmen kann, war die verringerte Neutralrot-Aufnahme in zytotoxischen Konzentrationen nicht direkt mit der Abnahme der Zellzahl korreliert, die als Zellproteinmenge gemessen wurde.



**Abb. 14:** Veränderung der Neutralrot-Aufnahme und Proteinmenge durch Inkubation mit 4-Aminobiphenyl. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen ( $n = 5 - 9$ ).

### 3.1.1.2 Zytotoxizität von Benzo[a]pyren in PUBEC

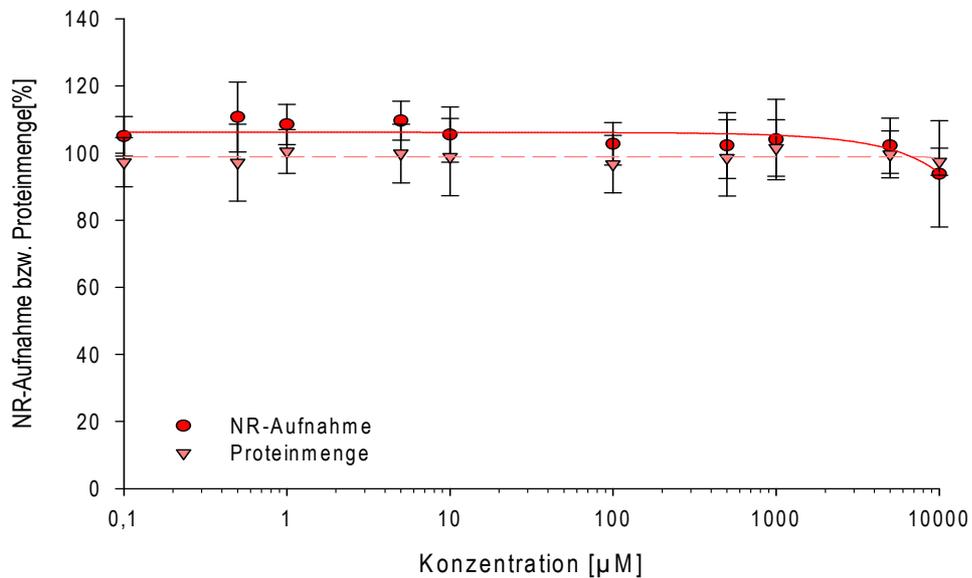
Mit dem Neutralrot-Test konnte für B[a]P bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  keine Zytotoxizität im Vergleich zur Lösemittelkontrolle nachgewiesen werden (Abb. 15). Die Behandlung mit 50 oder 100  $\mu\text{M}$  des polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffs (PAK) führte zu einer geringfügigen Reduktion der Neutralrot-Aufnahme, nicht jedoch der Proteinmenge. Insgesamt betrachtet resultierte die 24stündige Behandlung mit Benzo[a]pyren jedoch in keinen auffälligen zytotoxischen Effekten.



**Abb. 15:** Veränderung der Neutralrot-Aufnahme und Proteinmenge durch Inkubation mit Benzo[a]pyren. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen ( $n = 2 - 8$ ).

### 3.1.1.3 Zytotoxizität von Dimethylnitrosamin in PUBEC

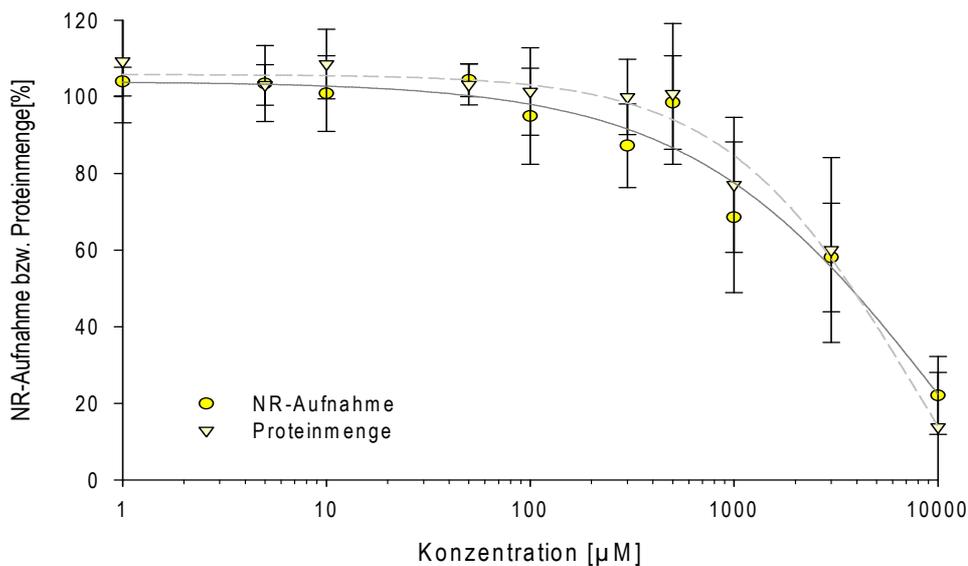
Bis zu einer Konzentration von 10 mM konnten für Dimethylnitrosamin keine zytotoxischen Effekte in PUBEC nachgewiesen werden (Abb. 16). Sämtliche Werte, sowohl aus dem Neutralrot-Test als auch aus der Proteinbestimmung, lagen im Bereich des zur Lösung verwendeten Aqua bidest.



**Abb. 16:** Veränderung der Neutralrot-Aufnahme und Proteinmenge durch Inkubation mit Dimethylnitrosamin. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen ( $n = 2 - 7$ ).

### 3.1.1.4 Zytotoxizität von Acrylnitril in PUBEC

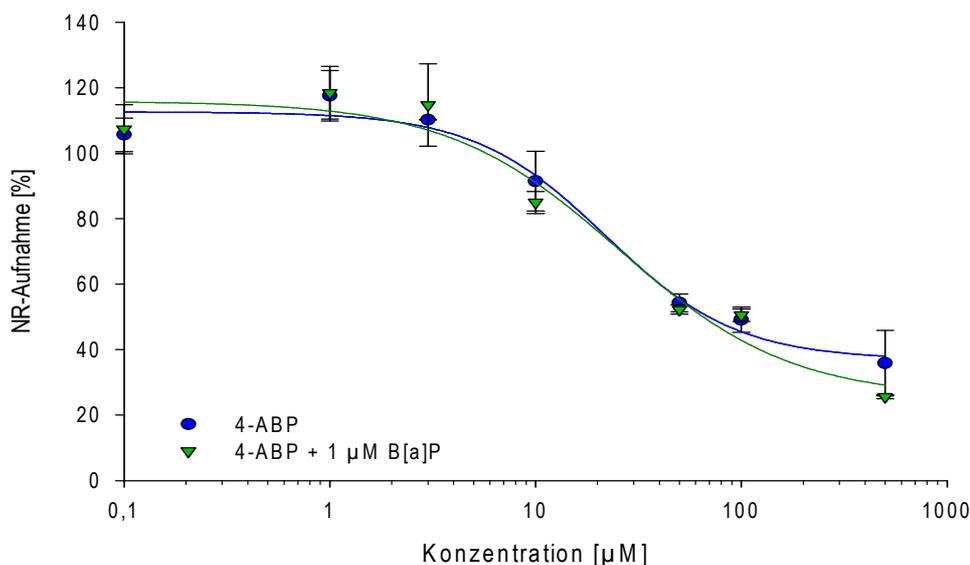
Für AN wurde ab 1 mM Zytotoxizität beobachtet (Abb. 17). Bei der maximal eingesetzten AN-Konzentration (10 mM) war die Neutralrot-Aufnahme in PUBEC um mehr als 60% im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert. Darüber hinaus zeigte sich für die Behandlung der Zellen mit der Testsubstanz eine hohe Korrelation zwischen abnehmender Neutralrot-Aufnahme und Verringerung der gemessenen Proteinmenge.



**Abb. 17:** Veränderung der Neutralrot-Aufnahme und Proteinmenge durch Inkubation mit Acrylnitril. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen ( $n = 3 - 10$ ).

### 3.1.1.5 Zytotoxizität von 4-Aminobiphenyl in Kombination mit Benzo[a]pyren in PUBEC

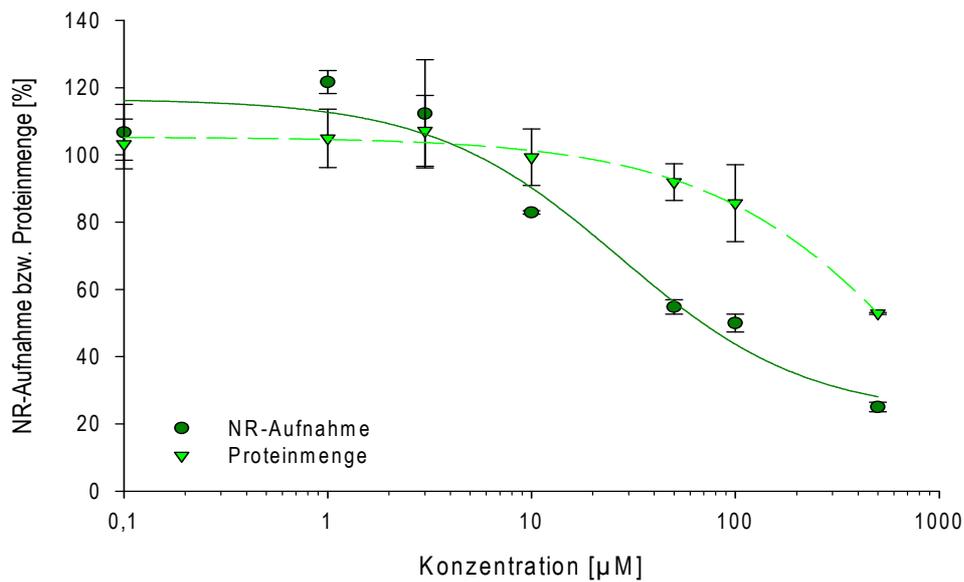
Zytotoxische Effekte von 4-ABP in Kombination mit  $1 \mu\text{M}$  B[a]P wurden in zwei Versuchen untersucht. Parallel zur Co-Inkubation mit beiden Substanzen wurden PUBEC mit 4-Aminobiphenyl alleine behandelt, um Effekte der kombinierten Behandlung besser mit denen der alleinigen 4-ABP-Inkubation vergleichen zu können. Sowohl die Behandlung mit dem aromatischen Amin alleine als auch die kombinierte Behandlung mit beiden Substanzen führten zu einem fast identischen Verlauf der Kurve der Neutralrot-Aufnahme (Abb. 18).



**Abb. 18:** Neutralrot-Aufnahme in PUBEC nach Behandlung mit 4-Aminobiphenyl oder Co-Inkubation mit 4-Aminobiphenyl und  $1 \mu\text{M}$  Benzo[a]pyren. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen ( $n = 2$ ).

Im Vergleich zu den zuvor gezeigten Ergebnissen für 4-ABP (Abb. 14) führte die Behandlung mit dem aromatischen Amin (bzw. auch in Kombination mit B[a]P) in diesen Versuchen insgesamt zu stärkeren zytotoxischen Effekten. Bei 15  $\mu\text{M}$  der Testsubstanz war die Neutralrot-Aufnahme um 20%, bei ca. 130  $\mu\text{M}$  jedoch schon um 50% im Vergleich zur Lösemittelkontrolle reduziert.

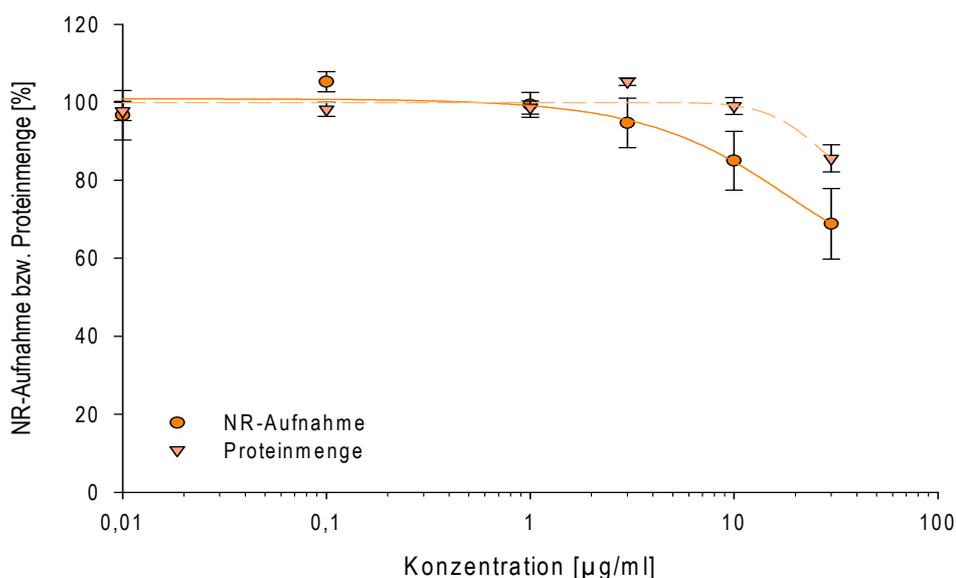
In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse aus dem Neutralrot-Test und der Proteinbestimmung für co-inkubierte PUBEC dargestellt. Wie zuvor für das aromatische Amin beobachtet (siehe Abb. 14), korrelieren auch für die Co-Inkubation mit Benzo[a]pyren und 4-Aminobiphenyl Neutralrot-Aufnahme und Zellzahl im zytotoxischen Bereich nicht miteinander (Abb. 19).



**Abb. 19:** Veränderung der Neutralrot-Aufnahme und Proteinmenge durch Co-Inkubation mit 4-Aminobiphenyl und 1  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen ( $n = 2$ ).

### 3.1.1.6 Zytotoxizität von Zigarettenrauchkondensat in PUBEC

In mit Zigarettenrauchkondensat behandelten PUBEC wurde ab ca. 15  $\mu\text{g/ml}$  Zytotoxizität nachgewiesen (Abb. 20). Die maximal eingesetzte Konzentration (30  $\mu\text{g/ml}$ ) führte im Vergleich mit dem Lösemittel zu 70% Neutralrot-Aufnahme. Während die Aufnahme des Farbstoffes bereits ab 10  $\mu\text{g/ml}$  abnahm, war die parallel hierzu erfasste Menge an Zellprotein noch nicht verändert: Bei Behandlung der Zellen mit 30  $\mu\text{g/ml}$  CSC betrug die Zellproteinmenge noch 80% der Lösemittelkontrolle. Wie schon für das aromatische Amin 4-ABP gezeigt (Abb. 14), korrelierte auch für diese Testsubstanz die verringerte Neutralrot-Aufnahme in zytotoxischen Konzentrationen nicht direkt mit der Abnahme der Zellzahl.



**Abb. 20:** Veränderung der Neutralrot-Aufnahme und Proteinmenge durch Inkubation mit Zigarettenrauchkondensat. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 3).

### 3.1.1.7 Zusammenfassung der Zytotoxizitätstestergebnisse

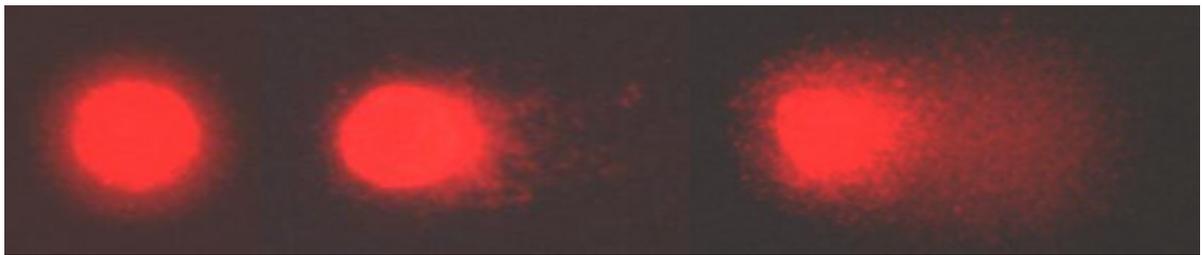
Mit Hilfe der gezeigten Diagramme (Abb. 14 - Abb. 18) wurden aus den Mittelwerten die IC<sub>20</sub>-, IC<sub>50</sub>- und IC<sub>80</sub>-Werte zur Bestimmung der Zytotoxizität ermittelt. Hierbei handelt es sich um die inhibitorischen Konzentrationen, bei denen die Neutralrot-Aufnahme im Vergleich zur Lösemittelkontrolle um 20%, 50% bzw. 80% vermindert ist (Tab. 8).

**Tab. 8:** Bestimmung der Zytotoxizität mit Hilfe des Neutralrot-Tests. Angegeben sind die IC<sub>20</sub>, IC<sub>50</sub> und IC<sub>80</sub>-Werte.

Testsubstanz	max. eingesetzte			
	Konzentration	IC <sub>20</sub>	IC <sub>50</sub>	IC <sub>80</sub>
4-Aminobiphenyl	500 µM	20 µM	300 µM	—
Benzo[a]pyren	100 µM	—	—	—
Dimethylnitrosamin	10 mM	—	—	—
Acrylnitril	10 mM	1 mM	4,7 mM	> 10 mM
4-Aminobiphenyl + 1 µM Benzo[a]pyren	500 µM	15 µM	130 µM	—
Zigarettenrauchkondensat	30 µg/ml	15 µg/ml	—	—

### 3.1.2 Genotoxizität von Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen in PUBEC – COMET Assay Ergebnisse (konventionelle Methode)

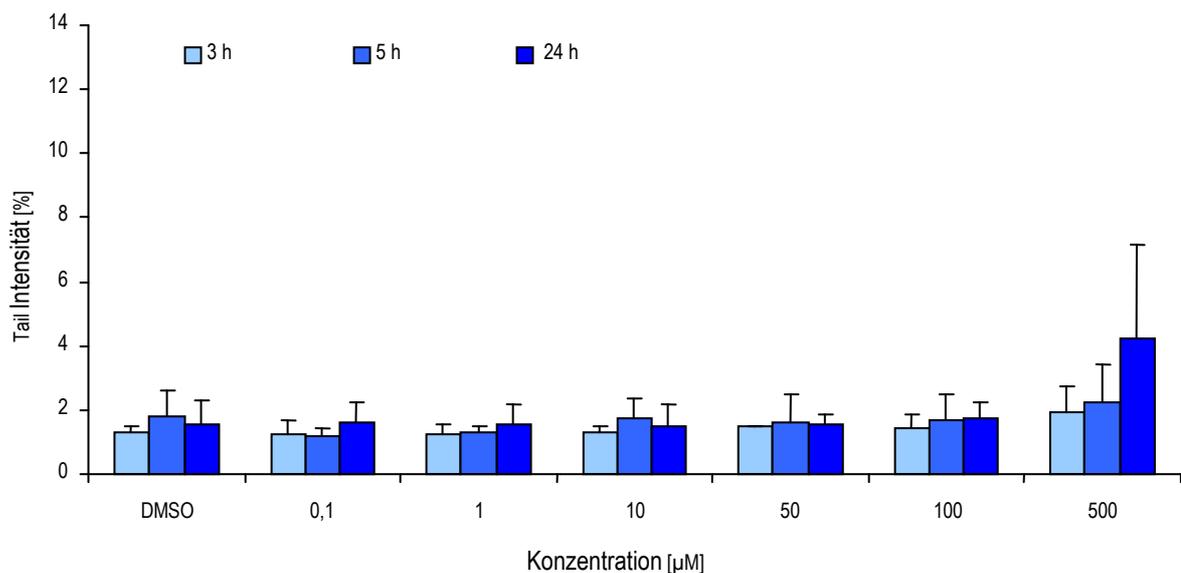
Der COMET Assay wurde angewandt, um das zeitabhängige Entstehen von DNA-Strangbrüchen durch Zigarettenrauch-Inhaltsstoffe in PUBEC auf Einzelzellebene zu erfassen. In Abb. 21 sind „Kometen“ von PUBEC mit unterschiedlichem Schädigungsgrad abgebildet. Für die Auswertung dieser Versuche wurde die Tail Intensität als Maß zur Quantifizierung der Schädigung herangezogen. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten für jede Testsubstanz einzeln graphisch dargestellt.



**Abb. 21:** Unterschiedlich stark geschädigte DNA von PUBEC, wie sie im COMET Assay zu sehen ist, mit steigendem Schädigungsgrad von links nach rechts.

#### 3.1.2.1 Genotoxizität von 4-Aminobiphenyl in PUBEC

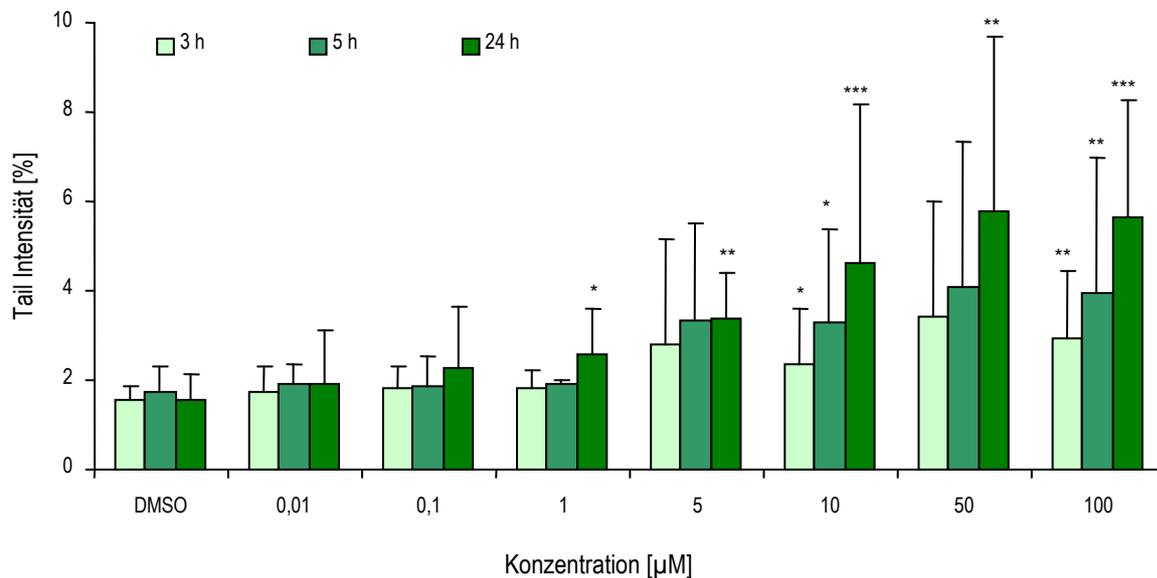
Die Inkubation mit dem aromatischen Amin 4-ABP führte im sub-zytotoxischen Bereich unabhängig von der Inkubationsdauer zu keinen mit dem COMET Assay detektierbaren Effekten (Abb. 22). Lediglich bei einer stark zytotoxischen Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  4-ABP, bei der sowohl Neutralrot-Aufnahme als auch die Zellzahl deutlich reduziert waren (siehe Kapitel 3.1.1.1), wurde nach 24 h langer Inkubation eine Zunahme der DNA-Fragmentierung beobachtet.



**Abb. 22:** COMET Assay Ergebnisse für die Inkubation mit 4-ABP (3 h, 5 h und 24 h). Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung der Tail Intensität ( $n = 2 - 6$ ).

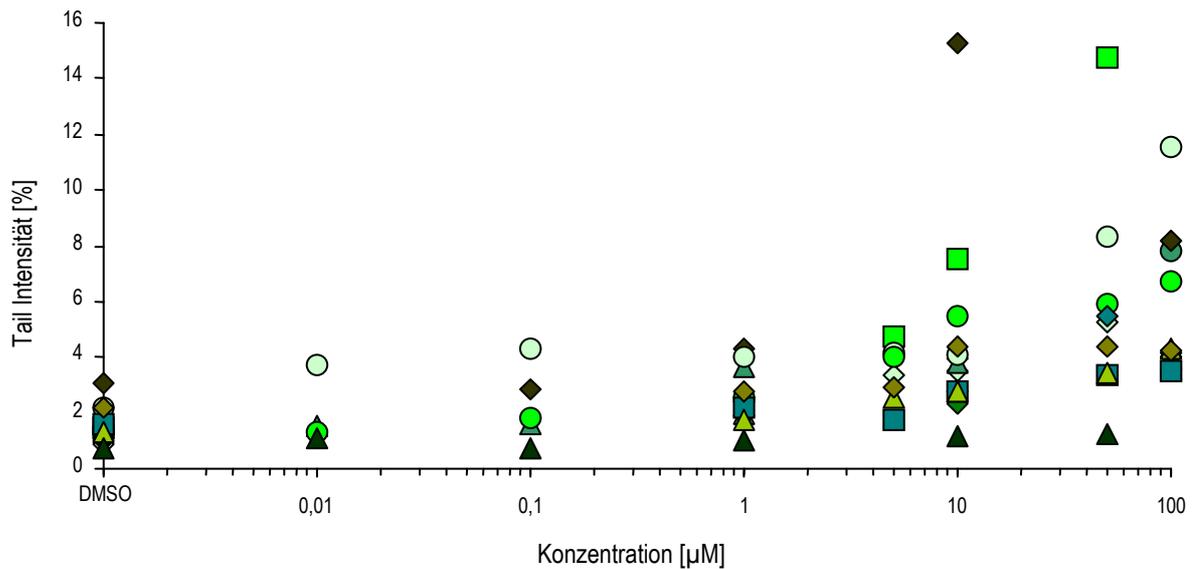
### 3.1.2.2 Genotoxizität von Benzo[a]pyren in PUBEC

Für B[a]P wurde sowohl eine zeit- als auch konzentrationsabhängige Zunahme der DNA-Strangbrüche beobachtet (Abb. 23). Bereits nach kurzer Inkubation (3 und 5 h) mit der Testsubstanz wurden im Konzentrationsbereich zwischen 10 – 100  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren vermehrt DNA-Strangbrüche nachgewiesen. Die Tail Intensitäten unterschieden sich ab 10  $\mu\text{M}$  B[a]P signifikant von denen der Lösemittelkontrolle. Nach 24 h langer Behandlung waren die DNA-Schäden bereits ab 1  $\mu\text{M}$  B[a]P signifikant im Vergleich zur Lösemittelkontrolle. Die stärksten genotoxischen Effekte wurden zwischen 5 und 100  $\mu\text{M}$  gefunden. Allerdings muss hierbei angemerkt werden, dass für die höchste B[a]P-Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) in einigen Fällen beobachtet wurde, dass der PAK im Kulturmedium ausfiel. Vermutlich erklärt das auch den in Abb. 23 zu beobachtenden Sättigungseffekt im Bereich von 50 – 100  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren.



**Abb. 23:** COMET Assay Ergebnisse für die Inkubation mit B[a]P (3 h, 5 h und 24 h). Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung der Tail Intensität ( $n = 4 - 13$ ). Die Signifikanz der Ergebnisse ist mit Sternchen wie folgt gekennzeichnet: \* signifikant, \*\* sehr signifikant und \*\*\* hoch signifikant.

Die COMET Assay Ergebnisse für die verschiedenen Versuche mit B[a]P variieren sehr stark, was besonders an den großen Standardabweichungen deutlich wird. Die gezeigten Ergebnisse wurden in mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen erhalten, in denen Urothelzellen aus fünf verschiedenen Spenderorganen miteinander vermischt kultiviert wurden. In Abb. 24 sind die Tail Intensitäten für die verschiedenen Versuche und für jede untersuchte Konzentration nach 24 h langer Inkubation als einzelne Werte aufgetragen.



**Abb. 24:** Einzelpunktdarstellung der COMET Assay Ergebnisse für 24 h lange Inkubation mit B[a]P (n = 4 – 13). Die Tail Intensitäten (Medianwerte) pro Konzentration aus jedem Versuch sind mit einem Symbol in einer anderen Farbe abgebildet.

Bei Betrachtung der einzelnen Tail Intensitäten nach 24 h langer Inkubation mit Benzo[a]pyren (Abb. 24) fällt Folgendes auf:

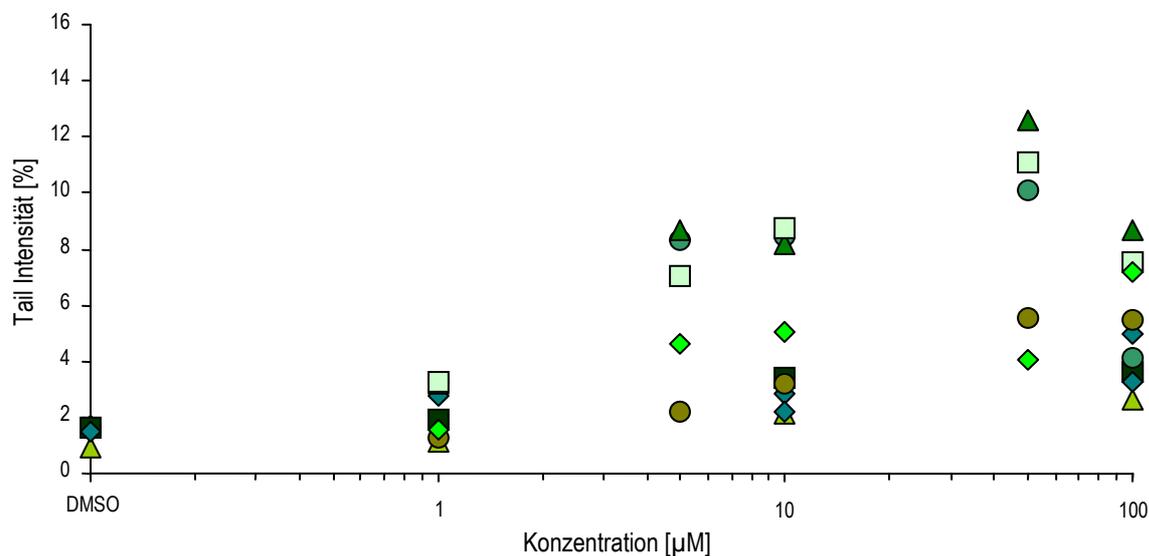
1. In einigen Versuchen (z. B. dunkelgrünes Dreieck) wurden durch die Behandlung mit B[a]P (24 h) offensichtlich nur sehr geringe DNA-Schäden induziert.
2. In anderen Versuchen wurden durch die 24 h lange Inkubation mit Benzo[a]pyren sehr starke DNA-Schäden induziert. Die Tail Intensität betrug z. B. nach Inkubation mit 50 µM B[a]P in einem Versuch annähernd das Zehnfache der Lösemittelkontrolle (grellgrünes Quadrat).
3. In fast allen Versuchen wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme der Genotoxizität beobachtet, unabhängig davon ob starke oder schwache DNA-Schäden durch B[a]P induziert wurden.

Offensichtlich gibt es deutliche individuelle Unterschiede zwischen den für die verschiedenen Versuche verwendeten Zellen in Bezug auf die Empfindlichkeit gegenüber der Induktion von DNA-Strangbrüchen durch B[a]P.

### Genotoxizität von Benzo[a]pyren in PUBEC aus individuellen Blasen

In Abb. 25 sind COMET Assay Ergebnisse dargestellt, die mit PUBEC erhalten wurden, welche aus 9 individuellen Blasen (an zwei unterschiedlichen Präparationstagen) gewonnen wurden. Die Zellen waren nicht miteinander vermischt worden, um in PUBEC aus individuellen Spendertieren zu untersuchen, ob mit dem COMET Assay nach Benzo[a]pyren-Behandlung auch in diesem

Versuchsansatz heterogene Ergebnisse erhalten werden. Nach 24 h langer Inkubation mit Benzo[a]pyren waren die Resultate auch in diesen Versuchen insbesondere zwischen 5 und 100  $\mu\text{M}$  B[a]P heterogen (Abb. 25).



**Abb. 25:** COMET Assay Ergebnisse für PUBEC aus 9 unterschiedlichen Schweineharnblasen nach Inkubation mit Benzo[a]pyren (24 h). Angegeben sind die jeweiligen Medianwerte von jeweils 100 ausgewerteten Kometen pro Individuum und Konzentration.

### 3.1.2.3 Genotoxizität von Dimethylnitrosamin in PUBEC

Für DMN konnte mit dem COMET Assay im Konzentrationsbereich zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 10 mM keine Genotoxizität nachgewiesen werden. Die ermittelten Tail Intensitäten lagen weitestgehend im Bereich der Aqua bidest.-Kontrolle (siehe Anhang).

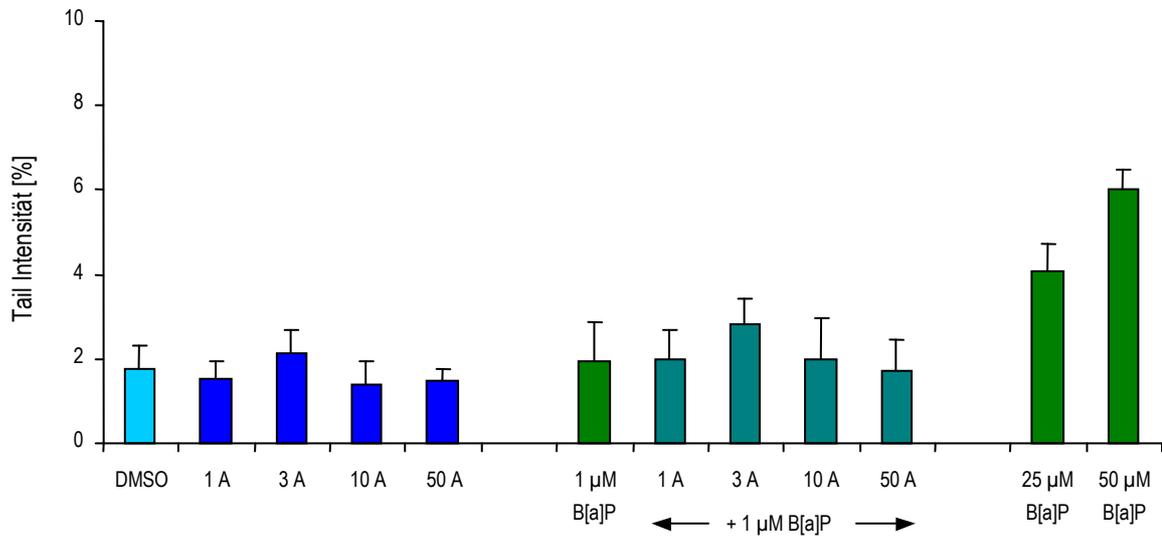
### 3.1.2.4 Genotoxizität von Acrylnitril in PUBEC

Acrylnitril wurde im Konzentrationsbereich von 1  $\mu\text{M}$  bis 1 mM untersucht. Die Tail Intensitäten unterschieden sich im Mittel kaum von denen der Lösemittelkontrolle (siehe Anhang). Lediglich für einen von drei Versuchen wurde nach 24 h langer Behandlung eine Erhöhung der Tail Intensität um den Faktor 1,7 bis 2 gefunden.

### 3.1.2.5 Genotoxizität von 4-Aminobiphenyl in Kombination mit Benzo[a]pyren in PUBEC

Die 24 h lange Inkubation mit 4-ABP alleine sowie in Kombination mit 1  $\mu\text{M}$  B[a]P führte zu sehr schwachen, kaum mit dem COMET Assay detektierbaren Effekten (Abb. 26). Nach Co-Inkubation

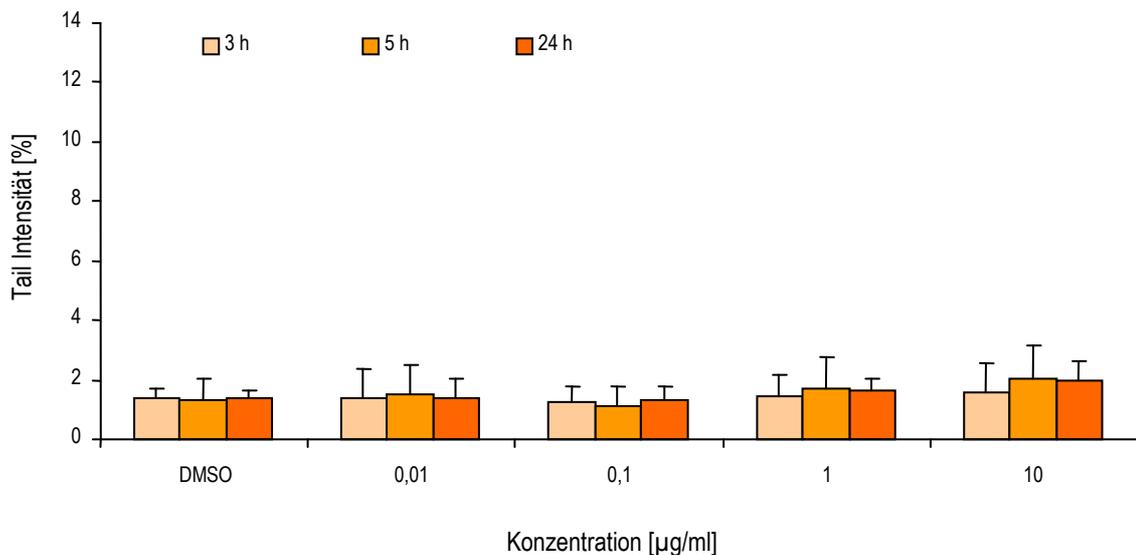
konnten mit dem COMET Assay nur geringfügig größere DNA-Schäden im Vergleich zur Lösemittelkontrolle und 4-ABP beobachtet werden.



**Abb. 26:** COMET Assay Ergebnisse für 24 h lange Inkubation mit 4-ABP bzw. Co-Inkubation mit 1 µM B[a]P. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung der Tail Intensität (n = 3 – 6). Beschriftung: 1 A: 1 µM 4-ABP, 3 A: 3 µM 4-ABP, 10 A: 10 µM 4-ABP und 50 A: 50 µM 4-ABP.

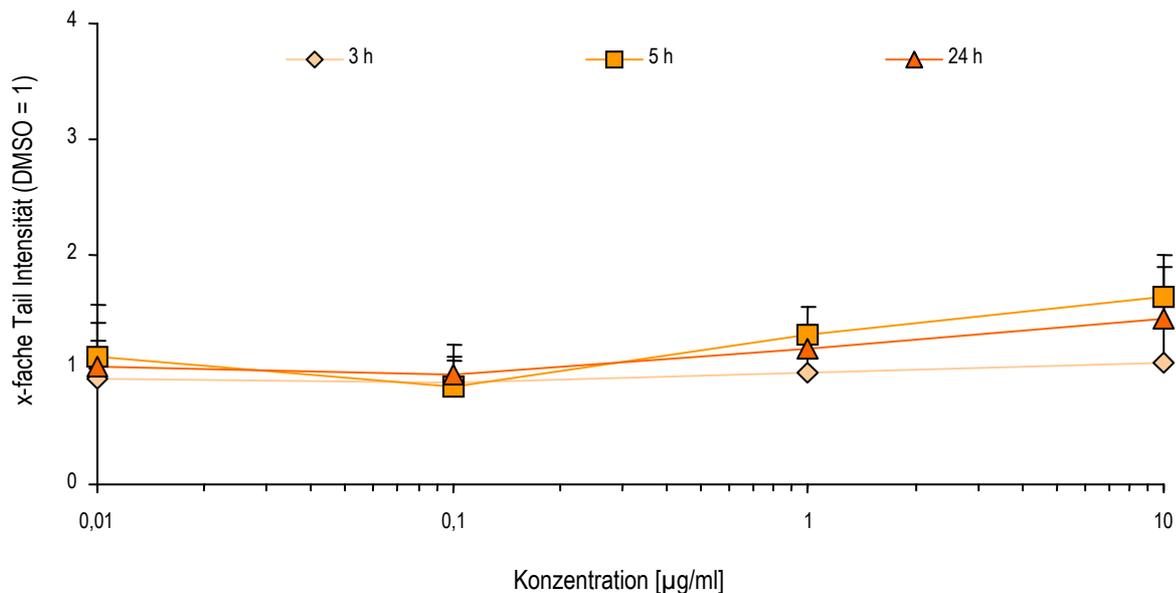
### 3.1.2.6 Genotoxizität von Zigarettenrauchkondensat in PUBEC

Die Behandlung von PUBEC mit CSC führte nur zu geringen Effekten im COMET Assay (Abb. 27). Eine äußerst schwache konzentrationsabhängige Zunahme der DNA-Schäden wurde nach 5 und 24 h langer Inkubation mit dem Substanzgemisch beobachtet. Diese Effekte unterschieden sich jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant von der Lösemittelkontrolle.



**Abb. 27:** COMET Assay Ergebnisse für die Inkubation mit CSC (3 h, 5 h und 24 h). Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung der Tail Intensität (n = 3 – 5).

Bezieht man die gemessenen Tail Intensitäten auf die jeweilige Lösemittelkontrolle, erhält man folgendes Bild (Abb. 28): Nach 3 h langer Inkubation mit CSC wurden im Vergleich zur Kontrolle keine DNA-Schäden induziert. Nach 5 und 24 h langer Behandlung konnte man eine schwache konzentrationsabhängige Zunahme der normierten Tail Intensitäten beobachten, die nach 5 h etwas stärker zu sein schien als nach 24 h. Vermehrte DNA-Strangbrüche wurden in PUBEC gefunden, die mit 1 und 10  $\mu\text{g/ml}$  CSC inkubiert worden waren.



**Abb. 28:** COMET Assay Ergebnisse für die Inkubation mit CSC (3 h, 5 h und 24 h). Die Tail Intensitäten wurden auf die entsprechenden Lösemittelkontrollen bezogen. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung ( $n = 3 - 5$ ).

### 3.1.2.7 Zusammenfassung der COMET Assay Ergebnisse (konventionelle Methode)

Ingesamt war nur für Benzo[a]pyren eindeutig Genotoxizität mit dem COMET Assay im Testsystem PUBEC nachweisbar. Für alle anderen Substanzen wurden entweder keine DNA-Strangbrüche detektiert oder die gefundenen Effekte waren sehr schwach, wie z. B. nach Inkubation mit Zigarettenrauchkondensat. Die COMET Assay Ergebnisse mit PUBEC, welche mit verschiedenen Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen inkubiert wurden, sind im Folgenden (Tab. 9) zusammengefasst.

**Tab. 9:** Zusammenfassung der COMET Assay Ergebnisse: Eindeutig positive Effekte wurden je nach Stärke mit +, ++ oder +++, schwach positive Resultate mit (+) und negative entsprechend mit — gekennzeichnet. „n. d.“ gibt an, dass Versuche für diese Inkubationszeiten nicht durchgeführt wurden.

Testsubstanz	Konzentrations- abhängigkeit	Effekte nach x h langer Inkubation			COMET Assay Ergebnis
		3 h	5 h	24 h	
4-Aminobiphenyl	nein	—	—	—	—
Benzo[a]pyren	ja	+	++	+++	+++
Dimethylnitrosamin	nein	n. d.	n. d.	—	—
Acrylnitril	nein	n. d.	n. d.	—	—
4-Aminobiphenyl	nein	n. d.	n. d.	—	—
+ 1 µM Benzo[a]pyren					
Zigarettenrauchkondensat	ja (schwach)	—	(+)	(+)	(+)

### 3.1.3 Oxidative DNA-Schäden durch Zigarettenrauch-Inhaltsstoffe in PUBEC – COMET Assay Ergebnisse (modifizierte Methode mit Reparaturenzym)

Zur Detektion oxidativer DNA-Schäden in PUBEC, die durch Inkubation mit verschiedenen Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen hervorgerufen wurden, wurde der modifizierte COMET Assay unter Verwendung des Reparaturenzyms Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg) eingesetzt. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse für parallel durchgeführte Versuche mit der konventionellen (DNA Strangbrüche im Allgemeinen) und der modifizierten Methode (detektiert zusätzlich zu den allgemeinen noch oxidative DNA-Schäden) dargestellt.

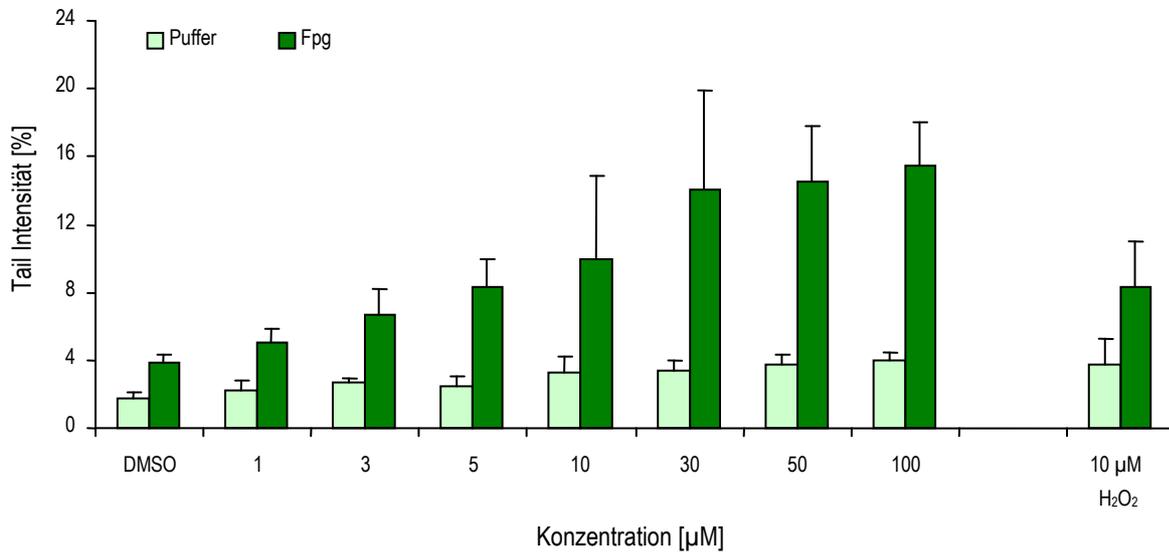
#### 3.1.3.1 Oxidative DNA-Schäden in PUBEC durch 4-Aminobiphenyl

Nach 24 h langer Inkubation mit 1 – 10 µM 4-ABP konnten mit Hilfe des modifizierten COMET Assay keine oxidativen DNA-Schäden nachgewiesen werden (siehe Anhang). Diese Ergebnisse sind Teile der in Kapitel 3.1.3.4 gezeigten Ergebnisse für die Co-Inkubation von PUBEC mit 4-Aminobiphenyl und Benzo[a]pyren.

#### 3.1.3.2. Oxidative DNA-Schäden in PUBEC durch Benzo[a]pyren

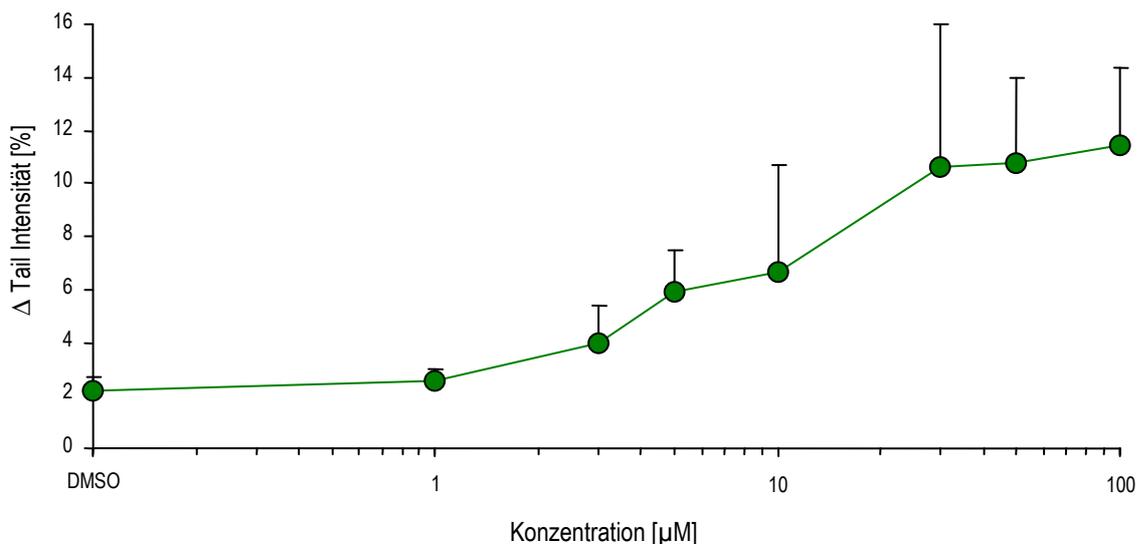
Nach 24 h langer Inkubation mit B[a]P waren die allgemeinen DNA-Schäden nur sehr moderat (Abb. 29). Dies fällt insbesondere beim Vergleich dieser mit den zuvor gezeigten Ergebnissen für den konventionellen COMET Assay auf (vgl. Kapitel 3.1.2.2, Abb. 23). Mit Hilfe der modifizierten Methode konnten jedoch, zusätzlich zu den geringen allgemeinen DNA-Schäden, konzentrationsabhängig

deutlich vermehrt oxidative DNA-Schäden beobachtet werden. Im Bereich von 30 – 100  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren wurden die maximalen gemessenen DNA-Schäden inklusive oxidativer Basenmodifikationen gefunden.



**Abb. 29:** Gegenüberstellung von allgemeinen DNA-Schäden („Puffer“) und zusätzlichen oxidativen DNA-Basenmodifikationen („Fpg“) nach Inkubation mit Benzo[a]pyren. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung der Tail Intensität ( $n = 3$ ).

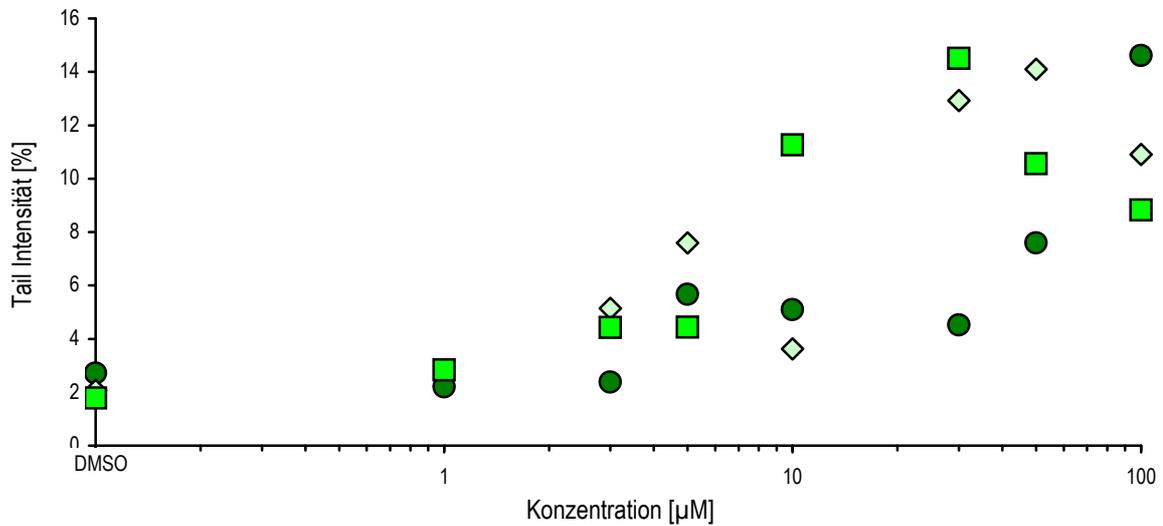
Spezifische oxidative DNA-Schäden wurden ab Konzentrationen größer als 1  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren gefunden. Diese nahmen konzentrationsabhängig bis 100  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren zu, wobei diese Zunahme zwischen 30 und 100  $\mu\text{M}$  B[a]P nur noch sehr gering war (Abb. 30).



**Abb. 30:** Oxidative DNA-Schäden in PUBEC ( $\Delta$  Tail Intensität [%]) nach Inkubation mit Benzo[a]pyren ( $n = 3$ ).

Betrachtet man die einzelnen Werte für spezifische oxidative DNA-Schäden, die mit Hilfe des modifizierten COMET Assay detektiert wurden, fällt auch hierbei auf, dass die Ergebnisse zwischen den

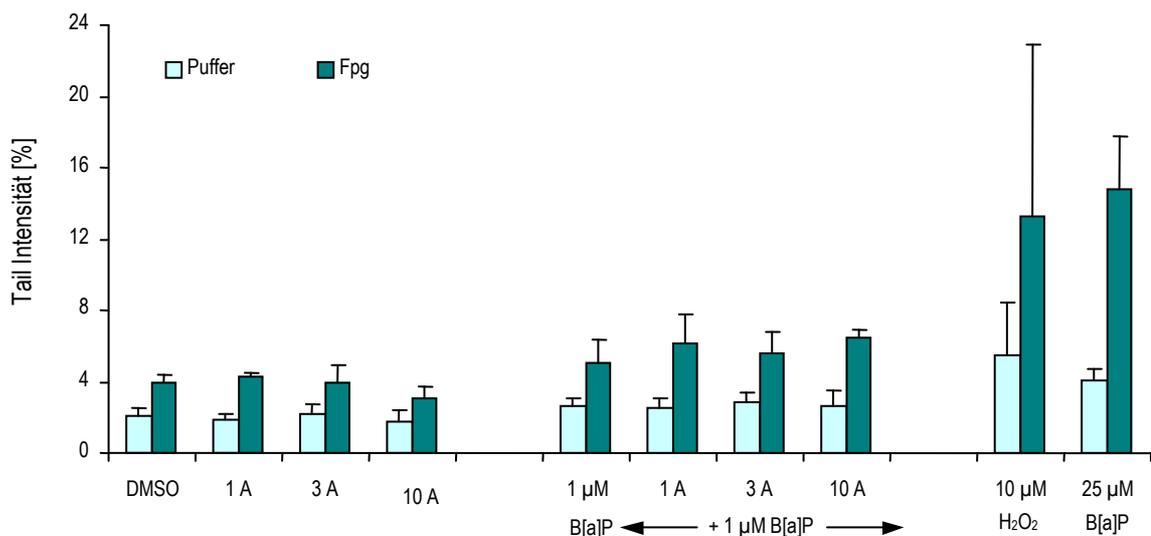
verschiedenen Ansätzen stark variieren (Abb. 31). Dies gilt besonders für den Konzentrationsbereich zwischen 10 und 100  $\mu\text{M}$  B[a]P.



**Abb. 31:** Einzelpunkt darstellung oxidativer DNA-Schäden in PUBEC ( $\Delta$  Tail Intensität [%]) nach Inkubation mit Benzo[a]pyren. Die Ergebnisse sind für jeden Versuch mit einem unterschiedlichen Symbol und einer anderen Farbe abgebildet.

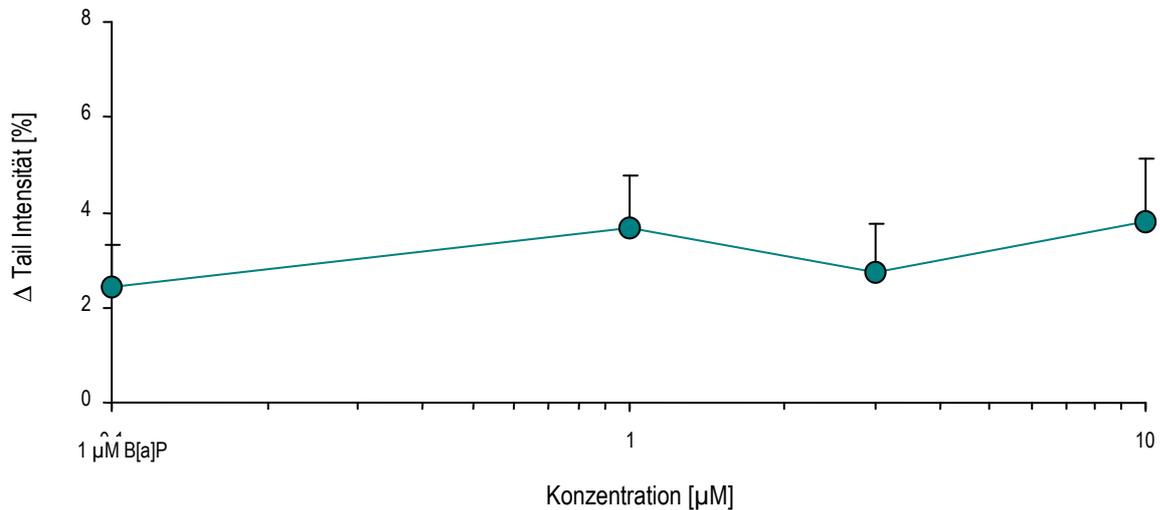
### 3.1.3.3 Oxidative DNA-Schäden in PUBEC durch 4-Aminobiphenyl in Kombination mit Benzo[a]pyren

Die nach Co-Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  B[a]P und verschiedenen 4-ABP-Konzentrationen in PUBEC gemessenen allgemeinen und zusätzlichen DNA-Schäden lagen im Bereich der durch 1  $\mu\text{M}$  B[a]P allein verursachten DNA-Schäden (Abb. 32).



**Abb. 32:** Gegenüberstellung von allgemeinen DNA-Schäden („Puffer“) und zusätzlichen oxidativen DNA-Basenmodifikationen („Fpg“) nach Inkubation (24 h) mit 4-ABP oder Co-Inkubation mit 4-ABP und 1  $\mu\text{M}$  B[a]P. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung der Tail Intensität ( $n=3$ ). Beschriftung: 1 A: 1  $\mu\text{M}$  4-ABP, 3 A: 3  $\mu\text{M}$  4-ABP und 10 A: 10  $\mu\text{M}$  4-ABP.

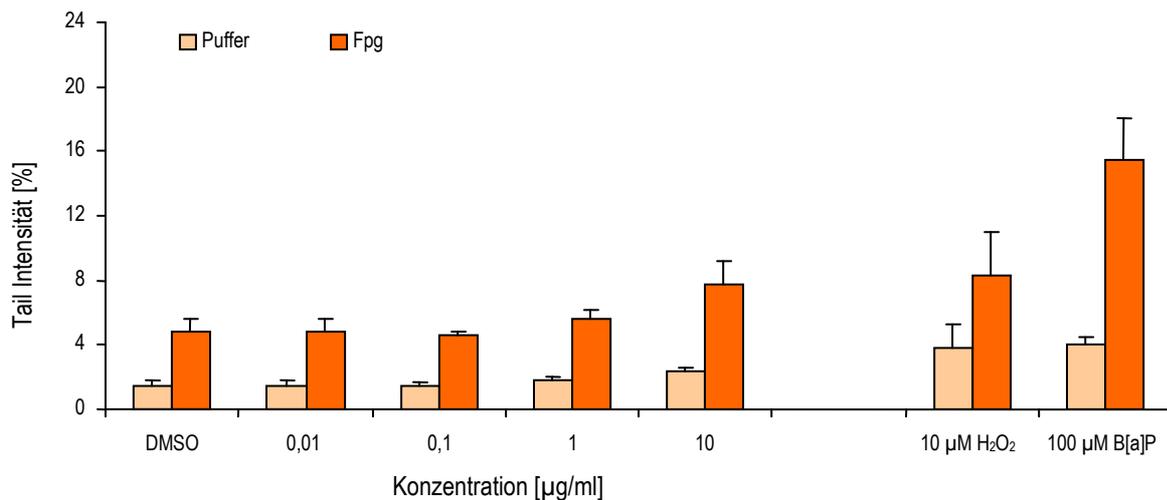
Nach 24 h langer Inkubation von PUBEC mit 4-ABP wurden keine oxidativen Basenmodifikationen gefunden (siehe 3.1.3.1). Die Co-Inkubation mit 4-ABP und 1  $\mu\text{M}$  B[a]P führte im Vergleich dazu zwar zu vermehrter Entstehung oxidativer DNA-Schäden (Abb. 33), diese lagen aber nur geringfügig über den Schäden durch 1  $\mu\text{M}$  B[a]P allein.



**Abb. 33:** Oxidative DNA-Schäden in PUBEC ( $\Delta$  Tail Intensität [%]) nach Co-Inkubation mit 4-ABP und 1  $\mu\text{M}$  B[a]P (n = 3).

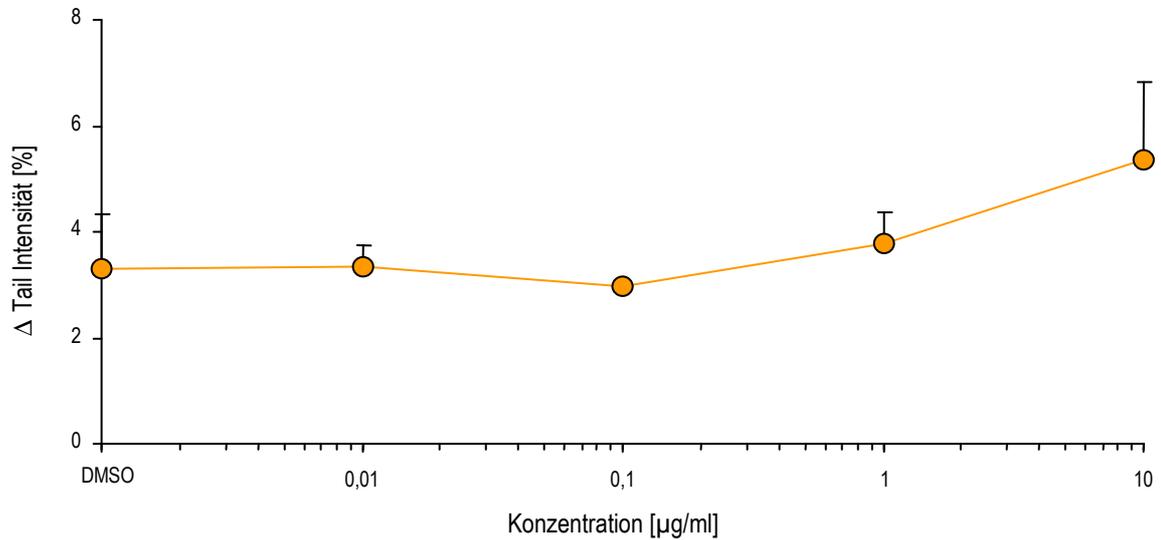
### 3.1.3.4 Oxidative DNA-Schäden in PUBEC durch Zigarettenrauchkondensat

Nach 24 h langer Inkubation von PUBEC mit CSC konnten zusätzlich zu geringen allgemeinen DNA-Schäden ab 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CSC auch noch oxidative DNA-Basenmodifikationen gemessen werden (Abb. 34).



**Abb. 34:** Gegenüberstellung von allgemeinen DNA-Schäden („Puffer“) und zusätzlichen oxidativen DNA-Basenmodifikationen („Fpg“) nach Inkubation mit Zigarettenrauchkondensat. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung der Tail Intensität (n = 3).

Bis zu einer Konzentration von 0,1 µg/ml CSC unterschieden sich die Δ Tail Intensitäten nicht von der Lösemittelkontrolle (Abb. 35). Erst ab 1 µg/ml Zigarettenrauchkondensat wurden spezifische oxidative DNA-Schäden gefunden, die bis 10 µg/ml CSC weiterhin zunahmen.



**Abb. 35:** Oxidative DNA-Schäden in PUBEC (Δ Tail Intensität [%]) nach Inkubation mit Zigarettenrauchkondensat (n = 3).

### 3.1.3.5 Zusammenstellung der Ergebnisse aus dem modifizierten COMET Assay

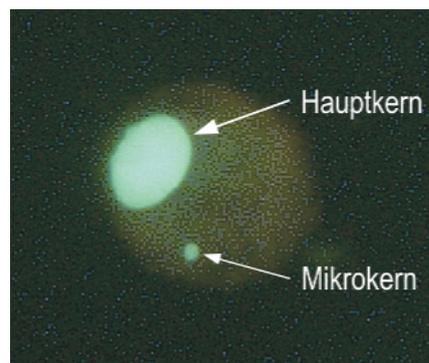
Nach Inkubation von PUBEC mit verschiedenen Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen konnten nach Behandlung mit Benzo[a]pyren und Zigarettenrauchkondensat zusätzlich zu den allgemeinen DNA-Schäden oxidative DNA-Basenmodifikationen detektiert werden. In Tab. 10 sind die Ergebnisse aus diesem Kapitel zusammengefasst.

**Tab. 10:** Zusammenfassung der COMET Assay Ergebnisse (modifizierte Methode): Eindeutig positive Effekte wurden je nach Stärke mit +, ++ oder +++, schwach positive Resultate mit (+) und negative entsprechend mit — gekennzeichnet.

Testsubstanz	Konzentrationsabhängigkeit	oxidative DNA-Schäden nach 24 h langer Inkubation	Ergebnis
4-Aminobiphenyl	nein	—	—
Benzo[a]pyren	ja	+++	+++
4-Aminobiphenyl + 1 µM Benzo[a]pyren	nein	(+)	(+)
Zigarettenrauchkondensat	ja	+	+

### 3.1.4 Genotoxizität von Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen in PUBEC – Mikrokern-Testergebnisse

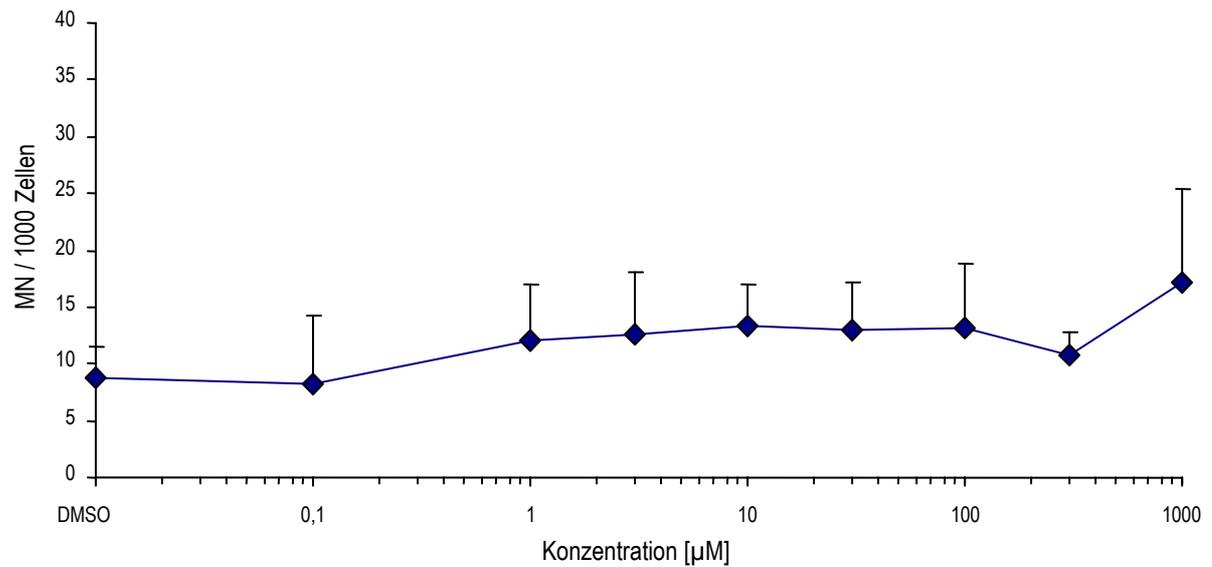
Der Mikrokern-Test mit PUBEC wurde zum Nachweis genotoxischer Effekte von Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen verwendet. Als Endpunkt wurde das vermehrte Entstehen von Mikronuklei durch die Behandlung mit verschiedenen Testsubstanzen pro 1000 Zellen erfasst. In Abb. 36 ist eine Schweineharnblasenepithelzelle (PUBEC) mit angefärbtem Haupt- und Mikrokern abgebildet. Die Versuche wurden von der Postdoktorandin Dr. Claudia Behm am IfADo durchgeführt und ausgewertet.



**Abb. 36:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Schweineharnblasenepithelzelle mit Haupt- und Mikrokern nach Färbung mit Acridinorange.

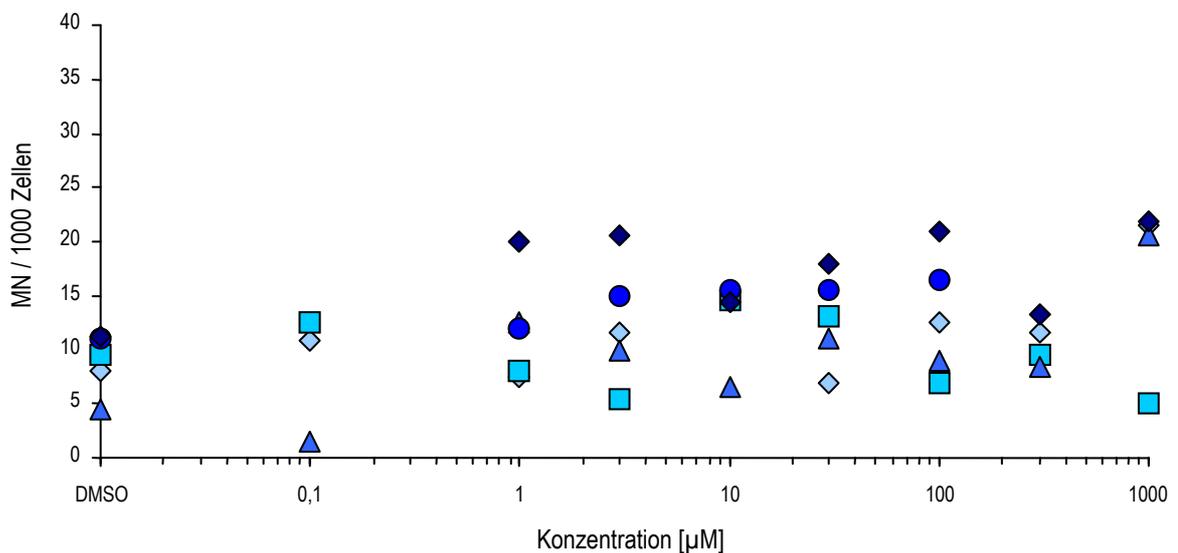
#### 3.1.4.1 Genotoxizität von 4-Aminobiphenyl in PUBEC

4-Aminobiphenyl führte im Bereich zwischen 0,1 – 3  $\mu\text{M}$  im Mittel aller Versuche zu einer schwachen konzentrationsabhängigen Zunahme der Mikrokernrate (Abb. 37). Ab 1  $\mu\text{M}$  4-ABP wurde eine leichte Erhöhung der Mikronukleusfrequenz um den Faktor 1,4 bis 1,5 im Vergleich zur Lösemittelkontrolle beobachtet. Diese Effekte waren jedoch sehr schwach und statistisch nicht signifikant. Lediglich bei einer stark zytotoxischen Konzentration (1 mM) kam es im Vergleich mit der Lösemittelkontrolle zu einer Erhöhung des Mikrokern-Anteils pro 1000 Zellen um den Faktor 1,9.



**Abb. 37:** Mittelwerte und Standardabweichung der Mikrokernfrequenz in PUBEC nach 30 h Inkubation mit 4-ABP (n = 3 – 5).

In Abb. 38 sind die Ergebnisse für die verschiedenen Versuche als einzelne Punkte dargestellt. Es zeigt sich insgesamt kein einheitliches Resultat. Dennoch kann man erkennen, dass für einige Konzentrationen annähernd eine Verdopplung der Hintergrundrate erreicht wurde (z. B. dunkelblaue Raute oder hellblaues Dreieck). In den meisten Versuchen war jedoch kein eindeutiger Trend zu beobachten.

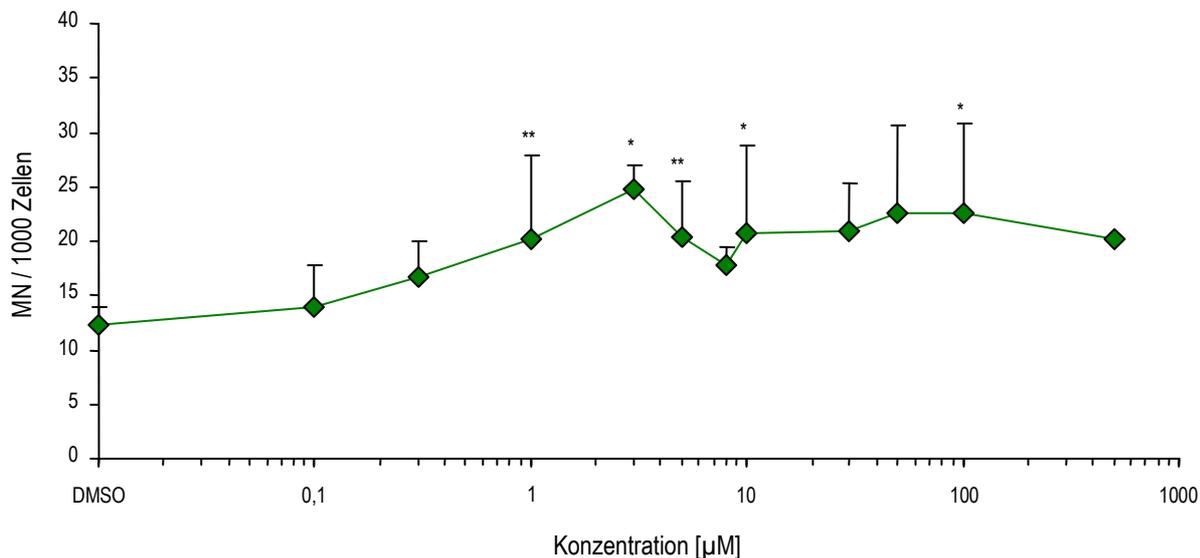


**Abb. 38:** Einzelpunktendarstellung der Mikrokern-Testergebnisse für 4-Aminobiphenyl (n = 3 – 5). Die einzelnen Werte aus jedem Versuch sind mit einem Symbol in einer anderen Farbe dargestellt.

### 3.1.4.2 Genotoxizität von Benzo[a]pyren in PUBEC

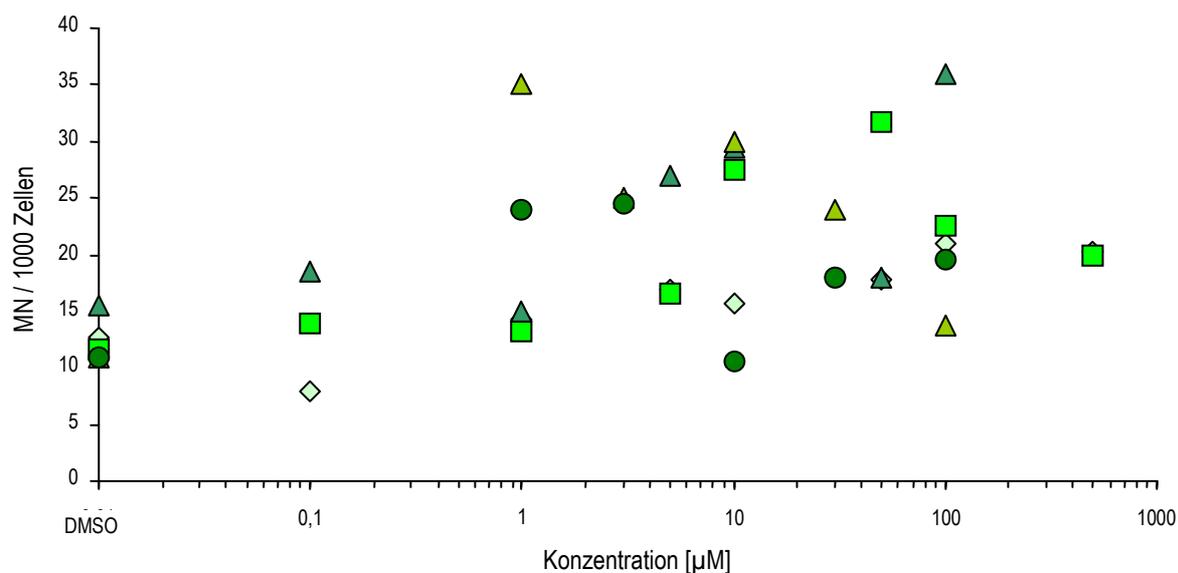
Die Behandlung der Zellen mit B[a]P führte zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Zunahme der Mikronukleusrate (Abb. 39). Die gemessenen Werte waren ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  von

denen der Lösemittelkontrolle statistisch signifikant verschieden. Den stärksten genotoxischen Effekt mit einer durchschnittlichen Verdopplung der Mikrokernrate der Lösemittelkontrolle wurde bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren beobachtet.



**Abb. 39:** Mittelwerte und Standardabweichung der Mikrokernfrequenz in PUBEC nach 30 h Inkubation mit B[a]P ( $n = 2 - 7$ ). Die Signifikanz der Ergebnisse ist mit Sternchen wie folgt gekennzeichnet: \* signifikant und \*\* sehr signifikant.

Die B[a]P-Behandlung resultierte in heterogenen Mikrokern-Testergebnissen, wie die Einzelpunkt-darstellung in Abb. 40 zeigt. Eine konzentrationsabhängige Zunahme der Mikrokernrate war in den einzelnen Versuchen, vor allem im Bereich zwischen 100 nM und 5  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren, zu erkennen.



**Abb. 40:** Einzelpunkt-darstellung der Mikrokern-Testergebnisse für Benzo[a]pyren. Die einzelnen Werte aus jedem Versuch sind mit einem Symbol in einer anderen Farbe dargestellt

### 3.1.4.3 Genotoxizität von Dimethylnitrosamin in PUBEC

DMN wurde bis 10 mM der Substanz auf die Induktion von Mikrokernen in PUBEC untersucht. Im Vergleich zur Kontrolle (Aqua bidest.) wurden im Konzentrationsbereich zwischen 1  $\mu$ M und 100  $\mu$ M DMN vermehrt Mikronuklei gefunden. Insgesamt waren die Testergebnisse jedoch sehr heterogen und nicht immer eindeutig positiv.

### 3.1.4.4 Genotoxizität von Acrylnitril in PUBEC

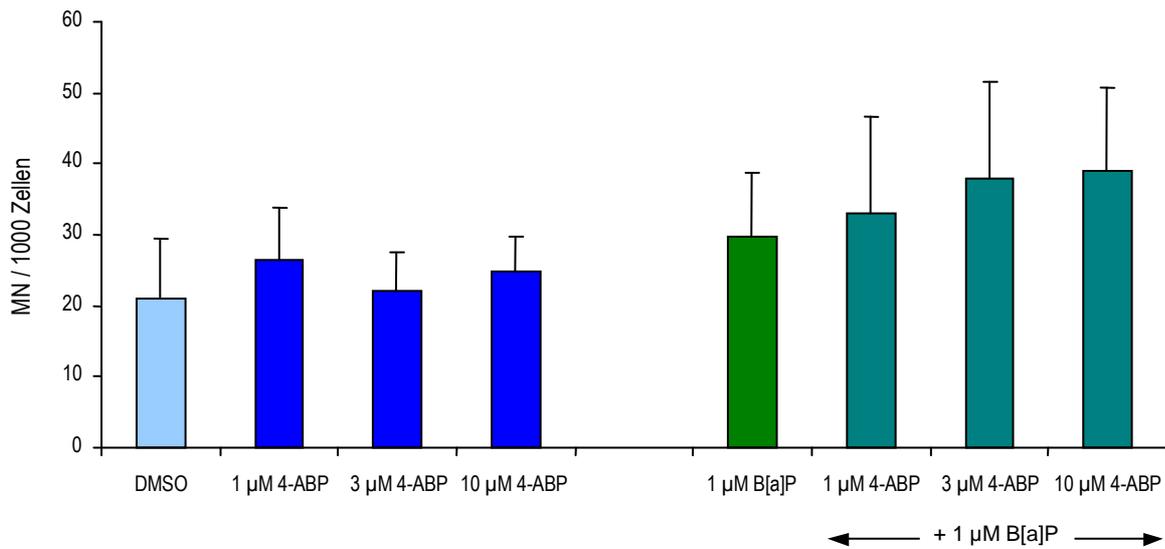
Die Behandlung mit AN führte im sub-zytotoxischen Bereich zwischen 10 nM und 10  $\mu$ M zu einer sehr schwachen, konzentrationsabhängigen Induktion von Mikrokernen. Im Vergleich zur Behandlung mit DMSO war die Mikronukleusrate nach Inkubation mit 1 mM AN um den Faktor 2,1 erhöht. Mit dem Neutralrot-Test war für diese Konzentration allerdings Zytotoxizität nachgewiesen worden.

### 3.1.4.5 Genotoxizität von 4-Aminobiphenyl in Kombination mit Benzo[a]pyren in PUBEC

PUBEC wurden mit 1  $\mu$ M B[a]P und verschiedenen 4-ABP-Konzentrationen sowohl alleine als auch in Kombination inkubiert (Abb. 41). Die Ergebnisse für die Behandlung mit den Einzelsubstanzen lagen in etwa in der gleichen Größenordnung wie die zuvor gezeigten Ergebnisse für die jeweiligen Testsubstanzen (siehe Abb. 37 und Abb. 39). Des Weiteren konnten folgende Beobachtungen gemacht werden (Abb. 41):

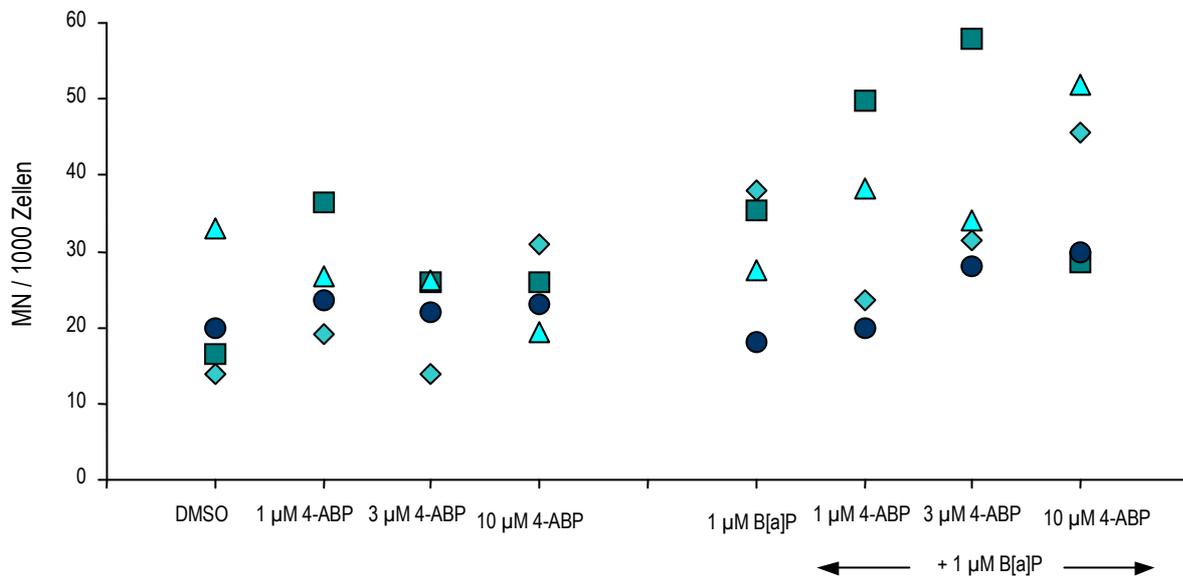
1. 4-ABP alleine führte im Mittel nur zu einer leichten Erhöhung der Mikrokernrate im Vergleich zur Lösemittelkontrolle.
2. Die Co-Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Arylamins und 1  $\mu$ M B[a]P hatte eine konzentrationsabhängige Zunahme der Mikrokernrate zur Folge.
3. Die durchschnittliche Mikronukleusrate für co-inkubierte PUBEC lag sowohl über der mit 4-ABP behandelten als auch über der mit 1  $\mu$ M B[a]P behandelten Zellen.

Offensichtlich ist der gefundene Effekt auf die kombinierte Behandlung mit dem polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff und dem aromatischen Amin zurückzuführen.



**Abb. 41:** Mittelwerte und Standardabweichung der Mikrokernrate nach Behandlung mit 4-ABP alleine oder in Kombination mit 1 µM B[a]P (n = 4).

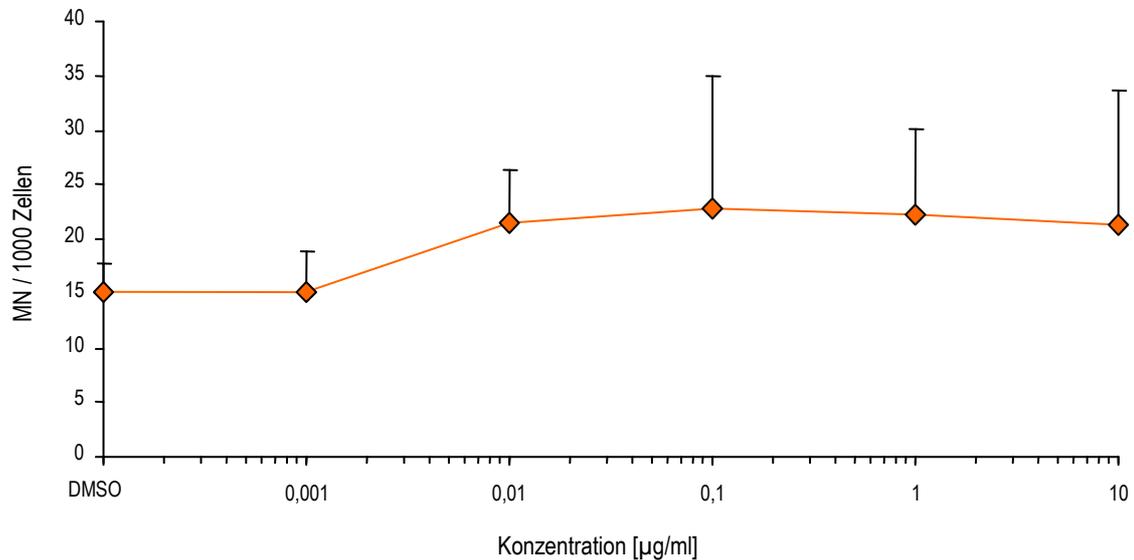
Im Folgenden sind die Ergebnisse als Einzelpunkte für die verschiedenen Wiederholungsversuche abgebildet (Abb. 42). Durch die Co-Inkubation mit 1 µM B[a]P und 4-ABP sind deutlich mehr Mikrokernkerne entstanden als durch die Behandlung mit DMSO oder 4-ABP alleine. Eine Tendenz zur konzentrationsabhängigen Zunahme der Mikrokernrate durch die kombinierte Behandlung ist für alle Versuche zu beobachten.



**Abb. 42:** Einzelpunktauftragung der Mikrokern-Testergebnisse mit 4-ABP alleine oder in Kombination mit 1 µM B[a]P (n = 4). Die einzelnen Werte aus jedem Versuch sind mit einem Symbol in einer anderen Farbe dargestellt.

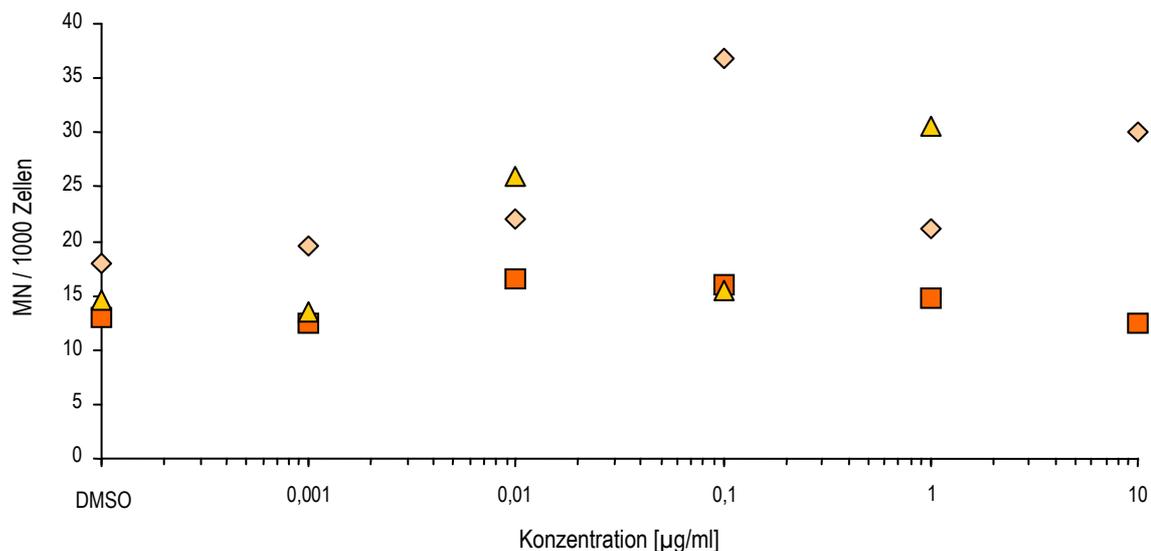
### 3.1.4.6 Genotoxizität von Zigarettenrauchkondensat in PUBEC

Nach der Inkubation von PUBEC mit CSC wurde eine leichte, konzentrationsabhängige Zunahme der Mikronukleusrate im Bereich von 1 bis 100 ng/ml beobachtet (Abb. 43).



**Abb. 43:** Mittelwerte und Standardabweichung der Mikrokernrate in PUBEC nach 30 h Inkubation mit CSC (n = 2 - 3).

Die Einzeldaten für die verschiedenen Experimente sind in Abb. 44 dargestellt. In einem Versuch (orangefarbenes Quadrat) führte die Behandlung mit Kondensat zu keiner Veränderung der Mikrokernhäufigkeit im Vergleich zur Lösemittelkontrolle. In den zwei weiteren Versuchen wurde sowohl eine konzentrationsabhängige Mikrokernentstehung als auch für einige Konzentrationen eine Verdopplung der Mikrokernrate im Vergleich zur DMSO-Kontrolle beobachtet. Diese Effekte wurden im subzytotoxischen Bereich zwischen 100 ng/ml und 10 µg/ml gefunden.



**Abb. 44:** Einzelpunktdarstellung der durchgeführten Mikrokern-Tests für Zigarettenrauchkondensat (n = 2 - 3). Die einzelnen Werte aus jedem Versuch sind mit einem Symbol in einer anderen Farbe dargestellt.

### 3.1.4.7 Zusammenfassung der Mikrokern-Testergebnisse

Nach 30 h langer Inkubation mit verschiedenen Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen wurden mit dem Mikrokern-Test in PUBEC nur sehr schwache genotoxische Effekte dokumentiert. Die auffälligste Ausnahme stellte hierbei Benzo[a]pyren dar. Im Folgenden sind die Mikrokern-Testergebnisse für die untersuchten Zigarettenrauch-Inhaltsstoffe tabellarisch zusammengefasst (Tab. 11). Hierbei wurden Konzentrationsabhängigkeit und das Erreichen einer Verdopplung der Mikrokernraten bei mindestens einer untersuchten Konzentration (im Vergleich mit der Lösemittelkontrolle) pro Versuch als Bewertungskriterium herangezogen. Das Erreichen einer Verdopplung der Mikrokern-Hintergrundrate wurde in 3 Kategorien eingeteilt (die entsprechenden Werte befinden sich im Anhang an diese Arbeit):

- ja für mindestens eine Konzentration der Testsubstanz wurde eine Erhöhung der MN-Rate der Lösemittelkontrolle um den Faktor  $\geq 2$  gefunden
- annähernd für mindestens eine Konzentration der Testsubstanz wurde eine Erhöhung der MN-Rate der Lösemittelkontrolle um den Faktor  $< 2 \geq 1,5$  gefunden
- nein für keine Konzentration der Testsubstanz wurde eine Erhöhung der MN-Rate der Lösemittelkontrolle um den Faktor  $\geq 1,5$  gefunden

**Tab. 11:** Zusammenfassung der Mikrokern-Testergebnisse: Eindeutig positive Ergebnisse wurden je nach Stärke des gefundenen Effektes mit +, ++ oder +++ und negative entsprechend mit — gekennzeichnet.

Testsubstanz	Konzentrationsabhängigkeit	Verdopplung der Hintergrundrate in % der Versuche erreicht			Mikrokern Testergebnis
		<i>ja</i>	<i>annähernd</i>	<i>nein</i>	
		4-Aminobiphenyl	ja (schwach)	20%	
Benzo[a]pyren	ja	86%	14%	0%	+++
Dimethylnitrosamin	ja (schwach)	40%	60%	0%	—
Acrylnitril	ja (schwach)	0%	67%	33%	—
4-Aminobiphenyl + 1 $\mu$ M Benzo[a]pyren	ja	50%	50%	0%	+
Zigarettenrauchkondensat	ja	67%	0%	33%	+

## 3.2 Biochemische Primäreffekte von Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen in PUBEC: Untersuchungen zur Cytochrom P450 1A1 Induktion

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Induktion des fremdstoffmetabolisierenden Enzyms Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) auf Proteinebene in PUBEC nach 24 h langer Behandlung mit 4-Aminobiphenyl, Benzo[a]pyren, Zigarettenrauchkondensat und 4-Aminobiphenyl in Kombination mit Benzo[a]pyren untersucht.

### 3.2.1 Induktion von CYP1A1 auf Proteinebene in PUBEC – Western Blot Ergebnisse

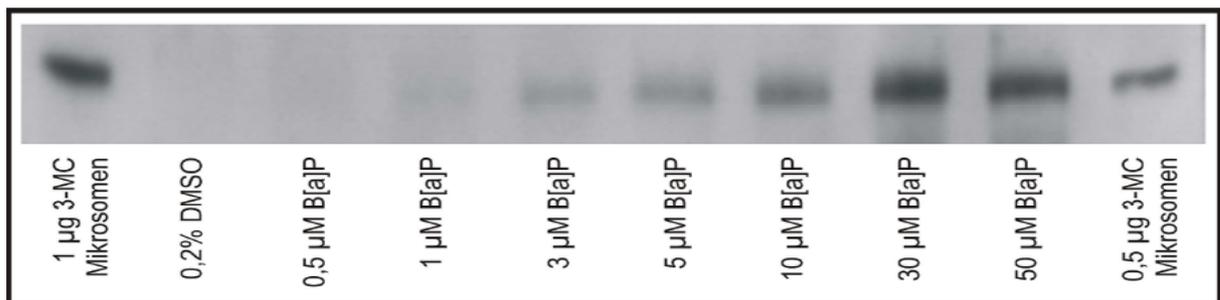
Mit Hilfe der Western Blot Technik wurde die CYP1A1- Proteinexpression in PUBEC-Zelllysaten nachgewiesen und quantifiziert. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse nach 24 h langer Behandlung mit verschiedenen Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen dargestellt.

#### 3.2.1.1 CYP1A1-Induktion in PUBEC durch 4-Aminobiphenyl

In PUBEC-Lysaten konnte nach 24 h langer Inkubation mit 1 – 50  $\mu\text{M}$  4-Aminobiphenyl keine CYP1A1-Induktion auf Proteinebene nachgewiesen werden (vgl. Abb. 48). Die alleinige Inkubation von PUBEC mit dem Lösemittel führte ebenfalls zu keiner mit dem Western Blot detektierbaren CYP1A1-Proteinexpression.

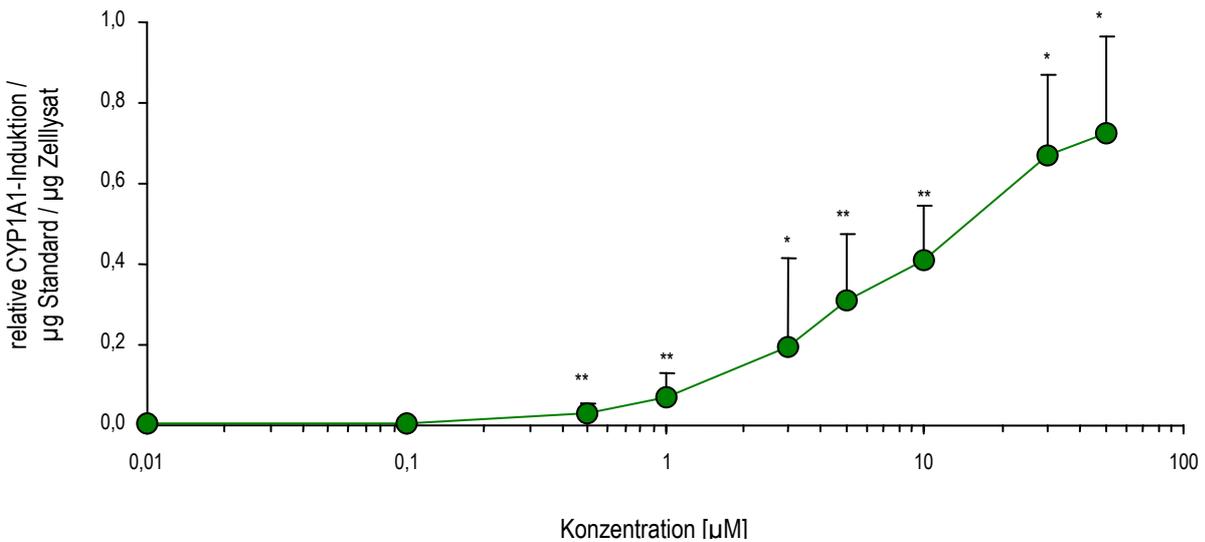
#### 3.2.1.2 CYP1A1-Induktion in PUBEC durch Benzo[a]pyren

Nach Inkubation (24 h) mit Benzo[a]pyren konnte in PUBEC-Zelllysaten konzentrationsabhängig zunehmende CYP1A1-Proteinexpression mittels Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 45).



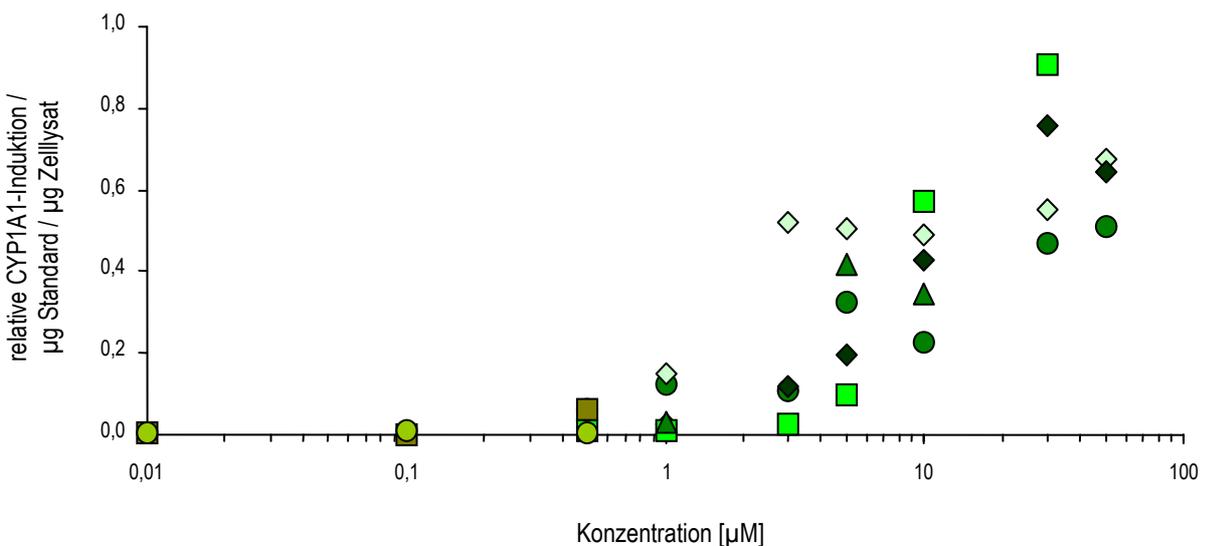
**Abb. 45:** Western Blot Ergebnis für 24 h lange Inkubation mit Benzo[a]pyren. In den Spuren 2 – 9 wurden jeweils 2  $\mu\text{g}$  Zellysate aufgetragen.

Bis zu einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  B[a]P konnte in den untersuchten Zelllysaten kein CYP1A1 nachgewiesen werden. Die Induktion des Proteins war erst ab einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren in PUBEC mittels Western Blot nachweisbar. Die relative Proteinexpression nahm zwischen 1 und 50  $\mu\text{M}$  B[a]P linear mit steigender Konzentration der Substanz zu (Abb. 46).



**Abb. 46:** Relative CYP1A1-Induktion bezogen auf die Proteinmenge des mitgeführten Standards („3-MC Mikrosomen“) und die Menge eingesetzten Zellysats nach 24 h langer Behandlung mit Benzo[a]pyren ( $n = 2 - 6$ ). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung. Die Signifikanz der Ergebnisse ist mit Sternchen wie folgt gekennzeichnet: \* signifikant und \*\* sehr signifikant.

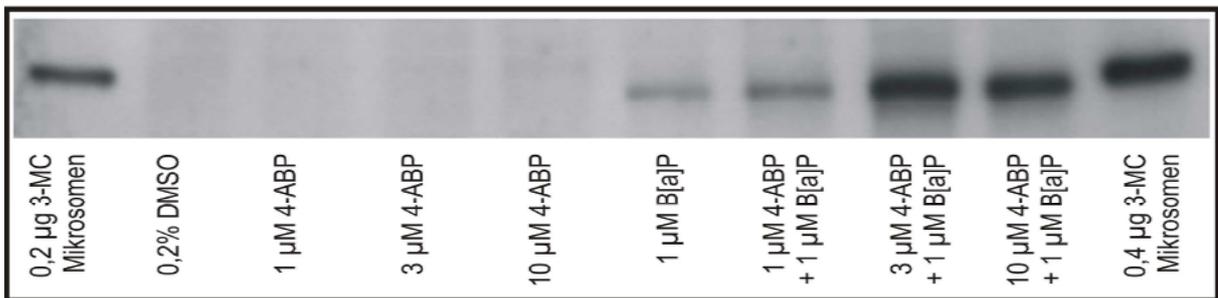
Bei Betrachtung der Einzeldaten aus 2 – 7 Versuchen erkennt man, dass die CYP1A1-Induktion durch Benzo[a]pyren für die einzelnen Versuche unterschiedlich stark ausgefallen ist (Abb. 47). Während in einem Versuch bereits bei 3 µM B[a]P sehr viel CYP1A1 Protein detektiert wurde, war in den meisten anderen Versuchen für die Konzentration nur ein sehr schwaches Signal zu messen. Insgesamt variieren die Induktionswerte für die einzelnen Versuche im Konzentrationsbereich von 1 bis 50 µM B[a]P.



**Abb. 47:** Einzelpunktdarstellung der relativen CYP1A1-Induktion in PUBEC nach 24 h langer Behandlung mit Benzo[a]pyren. Die CYP1A1-Induktion wurde bezogen auf die Proteinmenge des mitgeführten Standards („3-MC Mikrosomen“) und die Menge eingesetzten Zellysats. Die Ergebnisse aus individuellen Versuchen sind in unterschiedlichen Farben und mit verschiedenen Symbolen dargestellt.

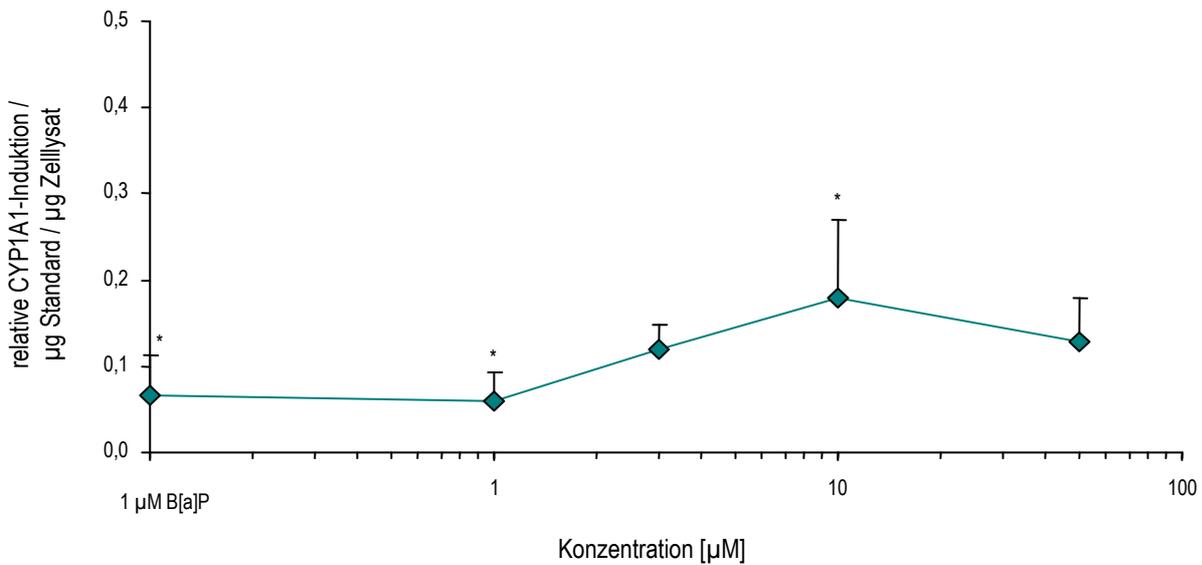
### 3.2.1.3 CYP1A1-Induktion in PUBEC durch 4-Aminobiphenyl in Kombination mit Benzo[a]pyren

Die Inkubation mit 4-ABP alleine führte, wie schon in Abschnitt 3.2.1.1 erwähnt, zu keiner CYP1A1-Induktion in PUBEC (siehe auch Abb. 48, Spuren 3 – 5). Wurden die Zellen jedoch mit verschiedenen Konzentrationen des aromatische Amins und 1  $\mu$ M Benzo[a]pyren co-inkubiert, war CYP1A1 in allen Proben messbar. Die Dichte der Proteinbanden nahm bei der Co-Inkubation deutlich mit steigenden Arylamin-Konzentrationen zu (Abb. 48, Spuren 7 – 9).



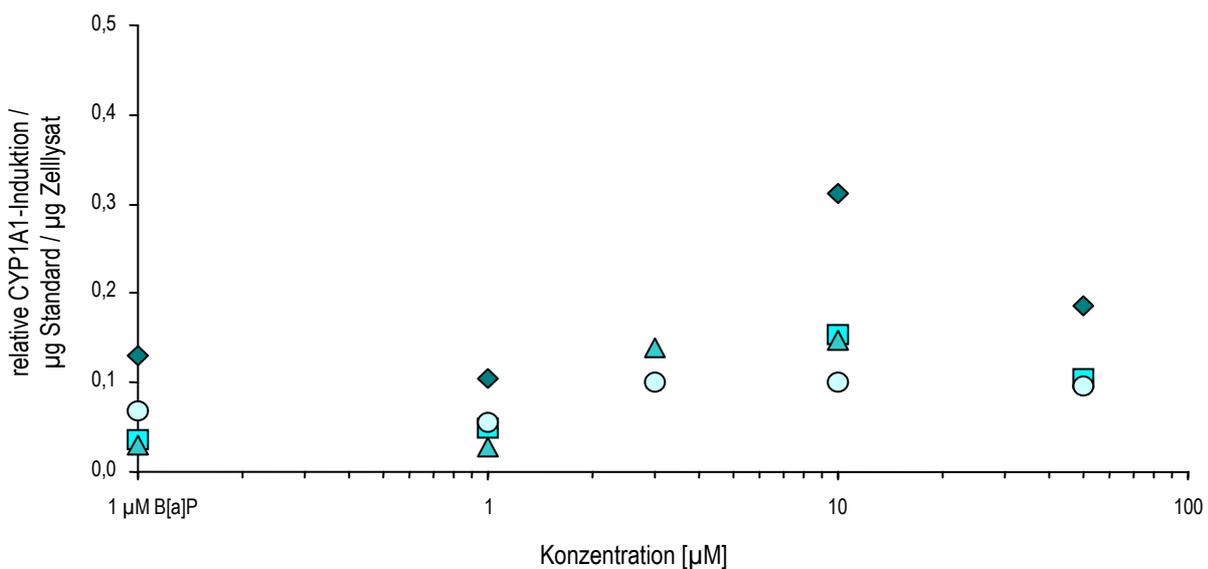
**Abb. 48:** Western Blot Ergebnis für 24 h lange Inkubation mit 4-Aminobiphenyl alleine oder in Kombination mit Benzo[a]pyren. In den Spuren 2 – 9 wurden jeweils 2  $\mu$ g Zellysate aufgetragen.

Die relative CYP1A1-Induktion lag für die Co-Inkubation von PUBEC mit 1  $\mu$ M 4-ABP und 1  $\mu$ M B[a]P in etwa dem gleichen Bereich wie für die Inkubation mit 1  $\mu$ M Benzo[a]pyren alleine. Eine überadditive Erhöhung der Proteinexpression wurde in Zellysaten von PUBEC gefunden, die mit 3 – 50  $\mu$ M 4-ABP und 1  $\mu$ M B[a]P in Kombination behandelt wurden (Abb. 49). Nach Inkubation mit 1  $\mu$ M Benzo[a]pyren sowie nach Co-Inkubation mit 1 oder 10  $\mu$ M 4-ABP und 1  $\mu$ M B[a]P war die CYP1A1-Induktion signifikant verschieden von der Lösemittelkontrolle. Die Abnahme des Effekts bei 50  $\mu$ M 4-ABP (im Vergleich zu 10  $\mu$ M 4-ABP) und Co-Inkubation mit 1  $\mu$ M B[a]P ist wahrscheinlich auf Zytotoxizität zurückzuführen.



**Abb. 49:** Relative CYP1A1-Induktion bezogen auf die Proteinmenge des mitgeführten Standards („3-MC Mikrosomen“) und die Menge eingesetzten Zellysats nach 24 h langer Co-Inkubation mit 4-ABP und 1 µM B[a]P ( $n = 2 - 4$ ). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung. Die Signifikanz der Ergebnisse ist mit Sternchen wie folgt gekennzeichnet: \* signifikant.

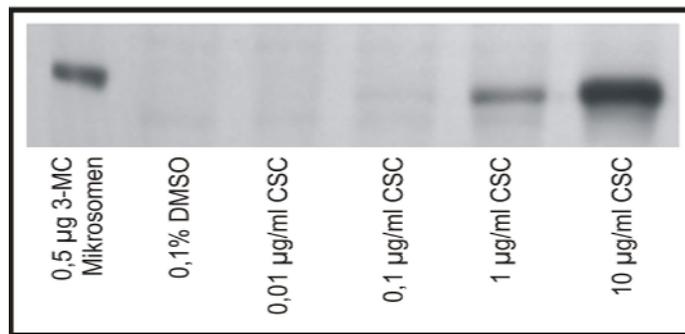
Betrachtet man die Einzeldaten aus den verschiedenen Versuchen, fällt auch hierbei auf, dass die CYP1A1-Induktion durch Benzo[a]pyren und das binäre Gemisch für die einzelnen Versuche unterschiedlich stark ausgefallen ist (Abb. 50). In allen Versuchen kam jedoch heraus, dass die Co-Inkubation mit 1 µM B[a]P und 1 µM 4-ABP zu keiner Verstärkung der CYP1A1-Proteinexpression über den Effekt durch den PAK hinaus führte.



**Abb. 50:** Einzelpunktdarstellung der relativen CYP1A1-Induktion bezogen auf die Proteinmenge des mitgeführten Standards („3-MC Mikrosomen“) und die Menge eingesetzten Zellysats nach 24 h langer Co-Inkubation mit 4-ABP und 1 µM B[a]P. Die Ergebnisse aus individuellen Versuchen sind in unterschiedlichen Farben und mit verschiedenen Symbolen dargestellt.

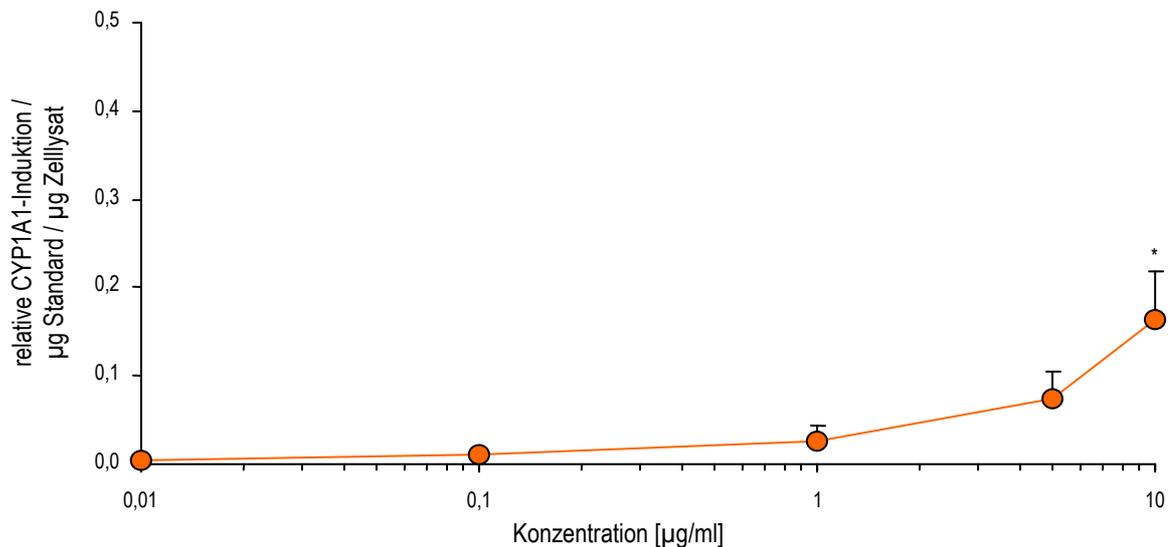
### 3.2.1.4 CYP1A1-Induktion in PUBEC durch Zigarettenrauchkondensat

Die Inkubation von PUBEC mit dem komplexen Gemisch CSC führte zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der CYP1A1-Proteinexpression (Abb. 51). Im Vergleich zu den Versuchen mit Benzo[a]pyren mussten in diesen Versuchen jedoch größere Proteinmengen der Zelllysate eingesetzt werden, um CYP1A1-Proteinexpression mittels Western Blot quantifizieren zu können.



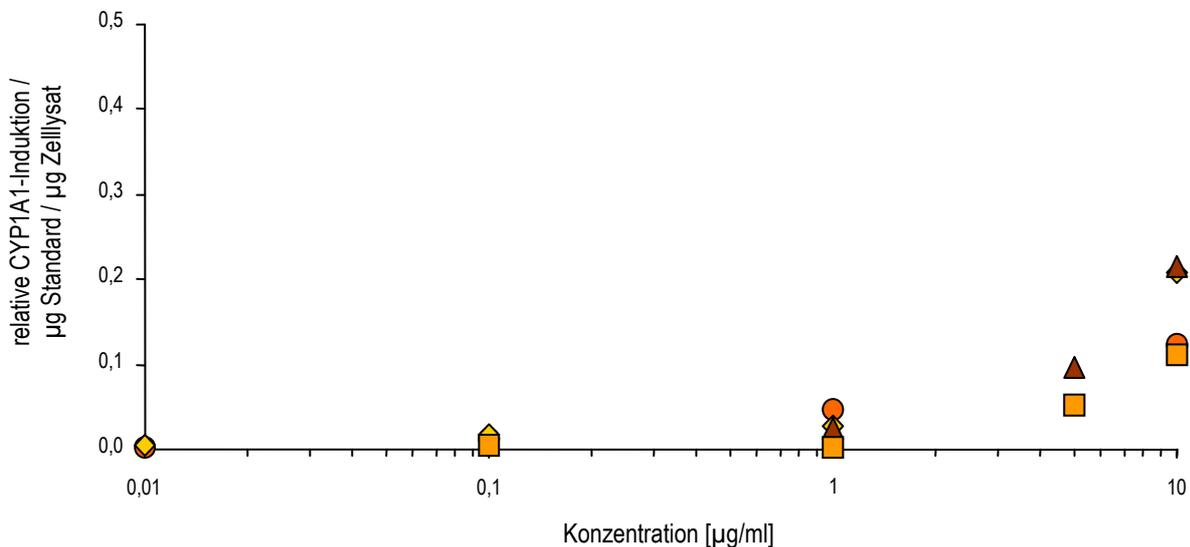
**Abb. 51:** Western Blot Ergebnis für 24 h lange Inkubation mit Zigarettenrauchkondensat. In den Spuren 2 – 6 wurden jeweils 10 µg Zelllysate aufgetragen.

In Kondensat-behandelten PUBEC wurde CYP1A1 ab einer Konzentration von 1 µg/ml detektiert (Abb. 52). Die relative Proteininduktion durch 5 µg/ml CSC lag mit 0,07/µg Standard/µg Zelllysate in der gleichen Größenordnung wie die CYP1A1-Induktion durch 1 µM Benzo[a]pyren (vgl. Abb. 46). Maximale Effekte wurden nach Inkubation mit 10 µg/ml CSC gefunden.



**Abb. 52:** Relative CYP1A1-Induktion bezogen auf die Proteinmenge des mitgeführten Standards („3-MC Mikrosomen“) und die Menge eingesetzten Zelllysats nach 24 h langer Behandlung mit Zigarettenrauchkondensat (n = 2 – 4). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung. Die Signifikanz der Ergebnisse ist mit Sternchen wie folgt gekennzeichnet: \* signifikant.

Die Einzeldaten für die Inkubationsversuche mit Zigarettenrauchkondensat zur CYP1A1-Induktion streuen im Konzentrationsbereich von 5 – 10 µg/ml (Abb. 53). Die Variation zwischen diesen Versuchen ist allerdings relativ gering.



**Abb. 53:** Einzelpunktdarstellung der relativen CYP1A1-Induktion bezogen auf die Proteinmenge des mitgeführten Standards („3-MC Mikrosomen“) und die Menge eingesetzten Zellysats nach 24 h langer Inkubation mit Zigarettenrauchkondensat. Die Ergebnisse aus individuellen Versuchen sind in unterschiedlichen Farben und mit verschiedenen Symbolen dargestellt.

### 3.2.1.5 Zusammenfassung der Western Blot Ergebnisse

Nach 24 h langer Inkubation von PUBEC mit Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen konnte für alle getesteten Substanzen bis auf 4-Aminobiphenyl konzentrationsabhängige Zunahme von CYP1A1-Proteininduktion nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 12 zusammengefasst.

**Tab. 12:** Zusammenfassung Western Blot Ergebnisse: Eindeutig positive Ergebnisse wurden je nach Stärke des gefundenen Effektes mit +, ++ oder +++ und negative entsprechend mit — gekennzeichnet.

Testsubstanz	Konzentrations- abhängigkeit	CYP1A1 Nachweis	Ergebnis
4-Aminobiphenyl	nein	—	—
Benzo[a]pyren	ja	ab 0,5 µM	+++
4-Aminobiphenyl + 1 µM Benzo[a]pyren	ja	ab 3 µM	++
Zigarettenrauchkondensat	ja	ab 1 µg/ml	++

### 3.2.2 Induktion von CYP1A1 auf Einzelzellebene in PUBEC – FACS Ergebnisse

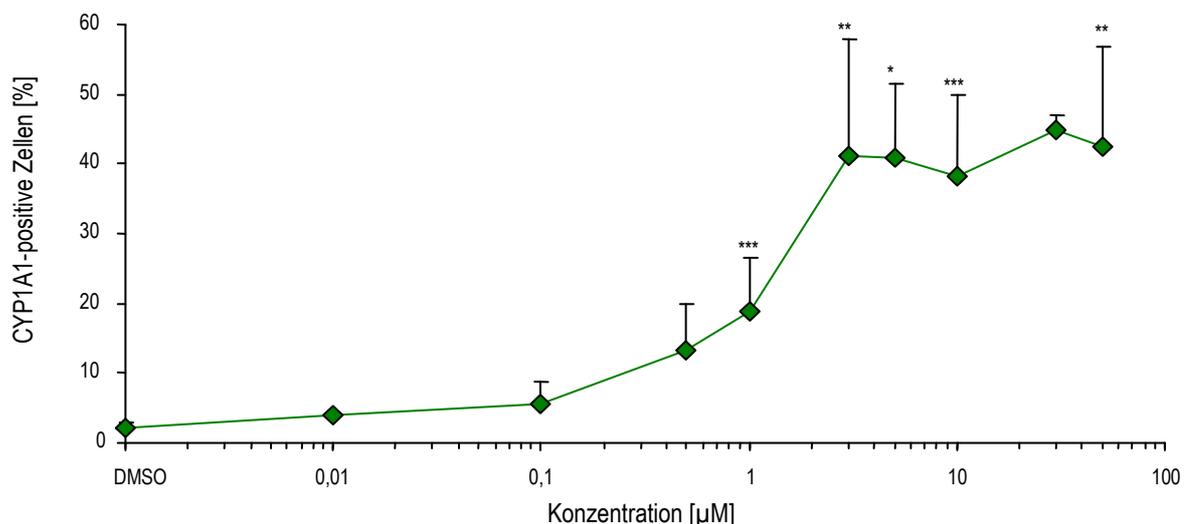
Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) wurde auf Einzelzellniveau untersucht, wie groß der prozentuale Anteil an Zellen war, in denen durch verschiedene Zigarettenrauch-Inhaltsstoffe CYP1A1-induziert wurde. Die FACS-Ergebnisse nach Inkubation von PUBEC mit 4-Aminobiphenyl, Benzo[a]pyren, Zigarettenrauchkondensat und Co-Inkubation mit 4-ABP und 1  $\mu\text{M}$  B[a]P sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

#### 3.2.2.1 CYP1A1-Induktion in PUBEC durch 4-Aminobiphenyl

Wie zuvor im Western Blot gezeigt, konnte auch auf Einzelzellebene in PUBEC nach Inkubation mit 4-ABP keine CYP1A1-Induktion detektiert werden (siehe Anhang). Sämtliche Werte lagen weitestgehend im Bereich der DMSO-Kontrolle.

#### 3.2.2.2 CYP1A1-Induktion in PUBEC durch Benzo[a]pyren

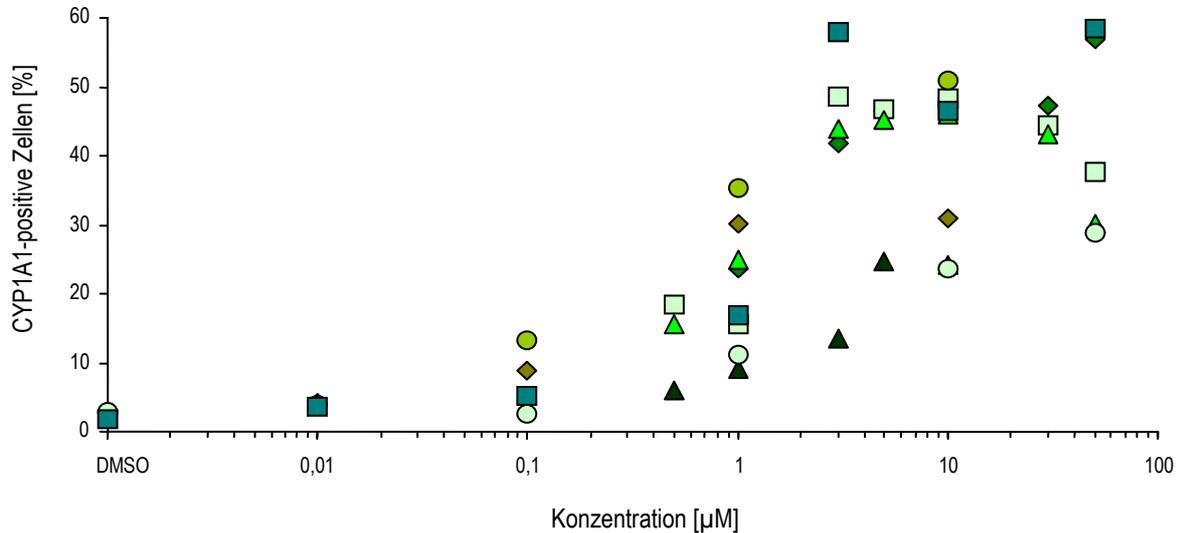
Nach Behandlung von PUBEC mit Benzo[a]pyren zeigte sich eine deutliche, konzentrationsabhängige Zunahme CYP1A1-induzierter Zellen innerhalb einer Zellpopulation (Abb. 54). Bereits ab einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  B[a]P wurde eine leichte Zunahme des Anteils CYP1A1-positiver PUBEC beobachtet. Offensichtlich wurden hierbei einige besonders empfindlich reagierende Zellen induziert, was mittels FACS nachweisbar war. Mit Hilfe der Western Blot Analyse in Zelllysaten war bei dieser Konzentration noch kein Signal messbar (siehe Abb. 46, Seite 74).



**Abb. 54:** Prozentualer Anteil CYP1A1-positiver Zellen nach 24 h langer Inkubation Benzo[a]pyren (n = 2 – 8). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung. Die Signifikanz der Ergebnisse ist mit Sternchen wie folgt gekennzeichnet: \* signifikant, \*\* sehr signifikant und \*\*\* hoch signifikant.

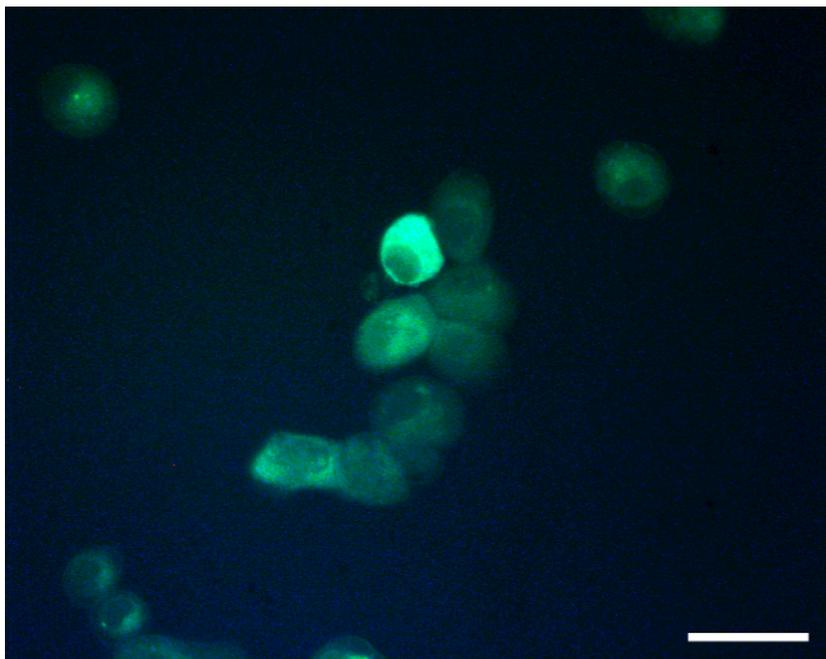
Betrachtet man die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen zur CYP1A1-Induktion in PUBEC, variieren diese ebenfalls stark zwischen den unterschiedlichen Versuchen (Abb. 55). Bereits

bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren sieht man deutlich die heterogene Reaktion der Zellen auf die Inkubation mit dem PAK. In einigen Versuchen waren bei dieser Konzentration bereits über 10% aller Zellen induziert.



**Abb. 55:** Einzelpunkt Darstellung des durchflusszytometrischen Nachweises CYP1A1-induzierter PUBEC nach 24 h langer Inkubation mit Benzo[a]pyren. Die Ergebnisse aus individuellen Versuchen sind in unterschiedlichen Farben und mit verschiedenen Symbolen dargestellt.

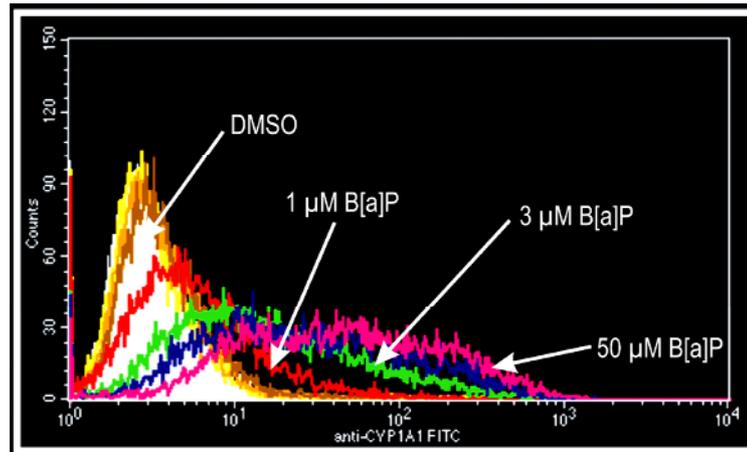
Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von CYP1A1-markierten PUBEC nach Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  B[a]P (Abb. 56) zeigt deutlich, dass PUBEC nach Inkubation mit diesem PAK heterogen reagieren: eine Zelle war bereits sehr stark induziert, einige andere weniger stark und ein sehr großer Teil der Zellen war nur sehr schwach oder gar nicht induziert.



**Abb. 56:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von gegen CYP1A1-markierten PUBEC. Der Proteinnachweis erfolgte über indirekte Immunfluoreszenz mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper. Es handelt sich um Zellen einer Suspensionsprobe für die Messung im FACS (Maßstabsbalken: 30  $\mu\text{m}$ ).

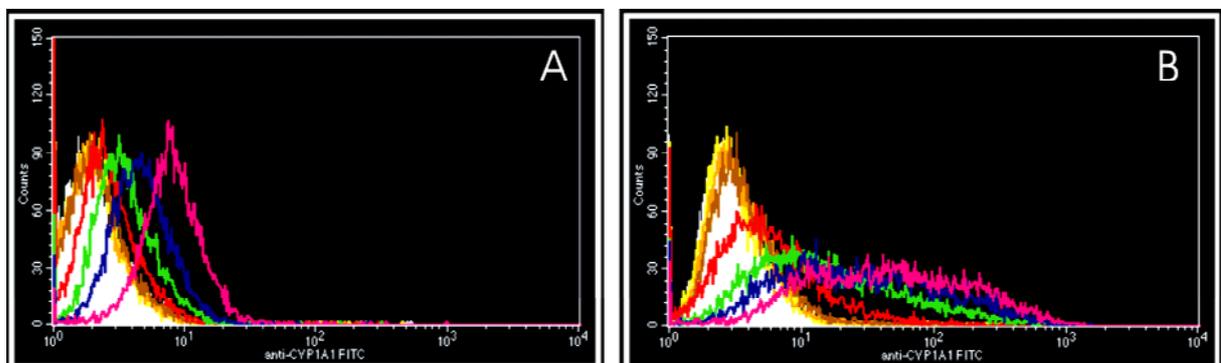
### Problematik der Zunahme unspezifischer Fluoreszenz durch Benzo[a]pyren

Mit aufsteigender Benzo[a]pyren-Konzentration nahm nicht nur die Anzahl induzierter Zellen (Abb. 54), sondern auch die Menge an CYP1A1-Protein innerhalb der induzierten Zellen zu. Dies kann man am Verlauf der Kurven im Histogramm in Abb. 57 erkennen, in dem die Anzahl gemessener Zellen gegen die relative Fluoreszenzintensität aufgetragen ist. Je größer die zur Inkubation verwendete Benzo[a]pyren-Konzentration war, desto mehr verschob sich die Kurve in Richtung steigender Fluoreszenzintensität.



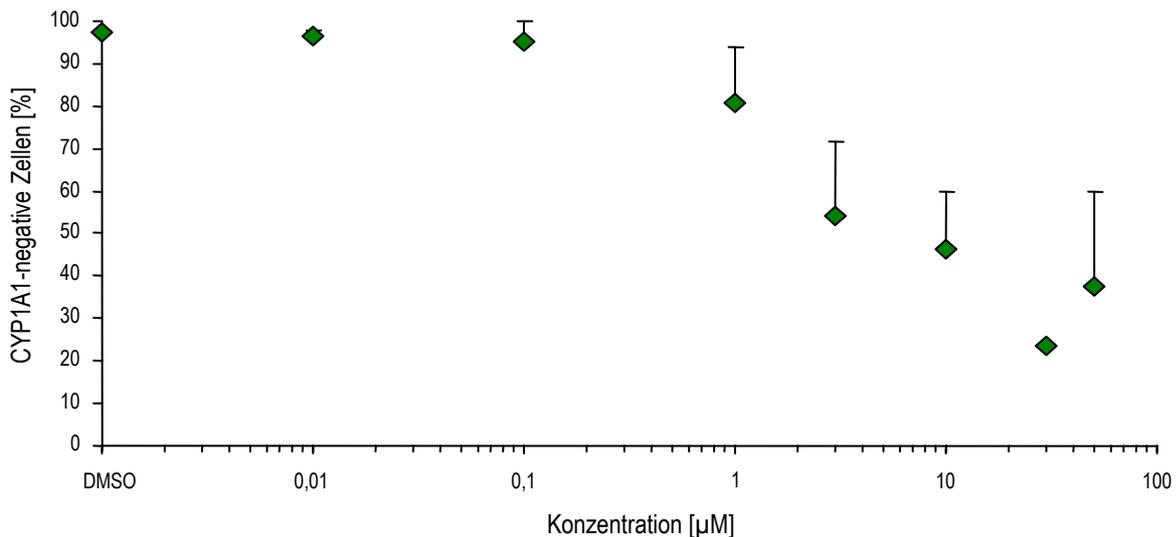
**Abb. 57:** CYP1A1-Proteininduktion in PUBEC. Dieses Overlay-Histogramm zeigt das Induktionsmuster auf Einzelzellebene innerhalb einer und zwischen unterschiedlichen B[a]P-Konzentrationen. Zum besseren Vergleich der Kurven, wurden nur diejenigen für DMSO sowie 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M und 50  $\mu$ M Benzo[a]pyren gekennzeichnet.

Zusätzlich zu der nach Inkubation mit Benzo[a]pyren auf Einzelzellebene nachgewiesenen spezifischen, konzentrationsabhängigen Zunahme der CYP1A1-Proteinexpression (Abb. 58B) nahm auch die unspezifische Hintergrundfluoreszenz mit aufsteigenden Konzentrationen über 1  $\mu$ M B[a]P zu (Abb. 58A). Diese wurde für jede im FACS untersuchte Konzentration (als Negativprobe) von der eigentlichen Messprobe abgezogen, weshalb es keine falsch positiven Ergebnisse gibt. Allerdings konnten auf Grund dieser Verschiebung vermutlich nicht alle induzierten Zellen als solche erfasst werden.



**Abb. 58:** Overlay-Histogramme zur Auswertung von CYP1A1-Proteininduktion auf Einzelzellebene. (A) Verschiebung des unspezifischen Hintergrundfluoreszenzsignals in Negativproben und (B) Verschiebung der spezifischen Fluoreszenzintensität in Messproben bei Inkubation mit aufsteigenden B[a]P-Konzentrationen.

Es war nicht möglich, dieses unspezifische Signal über Veränderungen in der Fluoreszenzkompensation zu eliminieren, ohne größere Datenverluste in Kauf nehmen zu müssen. Aus diesem Grund wurden alle Proben mit der Geräteeinstellung gemessen, die für die Negativprobe DMSO-behandelter Zellen gewählt wurde. Der Anteil an Zellen, für die keine sichere Aussage bzgl. spezifischer CYP1A1-Induktion gemacht werden konnte, war für Konzentrationen unterhalb von 1  $\mu\text{M}$  B[a]P vernachlässigbar gering. Bei 1  $\mu\text{M}$  B[a]P lag dieser Anteil bei ca.  $0,9\% \pm 0,8\%$  der Zellen. Für 10 und 50  $\mu\text{M}$  B[a]P hingegen betrug der Anteil vermutlich falsch negativ beurteilter Zellen im Bereich von ca.  $9,1 \pm 6,7\%$  bzw.  $17,6\% \pm 10,9\%$ . In Abb. 59 ist der Anteil an sicher CYP1A1-negativen PUBEC (Anzahl der Zellen, deren Fluoreszenzintensität auch nach Antikörpermarkierung im Bereich der Negativprobe nach DMSO-Behandlung liegt) dargestellt. Hierbei zeigt sich im Umkehrschluss, dass durch Benzo[a]pyren-Inkubation nie 100% der Zellen induziert wurden. Mit Sicherheit kann man sagen, dass z.B. bei 30  $\mu\text{M}$  B[a]P über 20% der Zellen in diesen Versuchen offensichtlich nicht induzierbar waren.

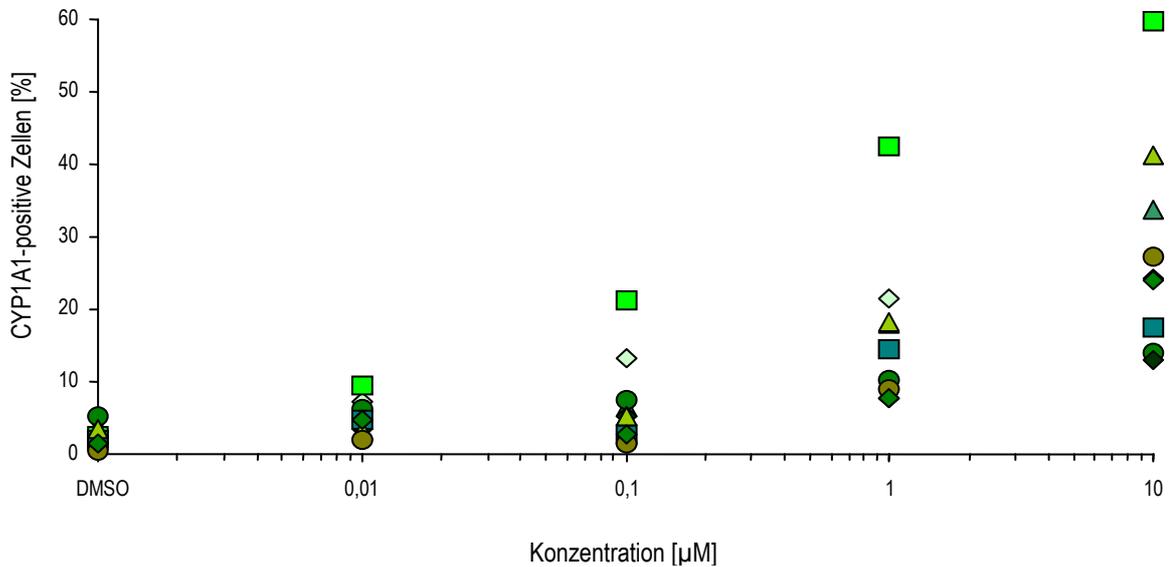


**Abb. 59:** Prozentualer Anteil sicher CYP1A1-negativer Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Benzo[a]pyren-Konzentration.

### CYP1A1-Induktion in PUBEC aus individuellen Blasen

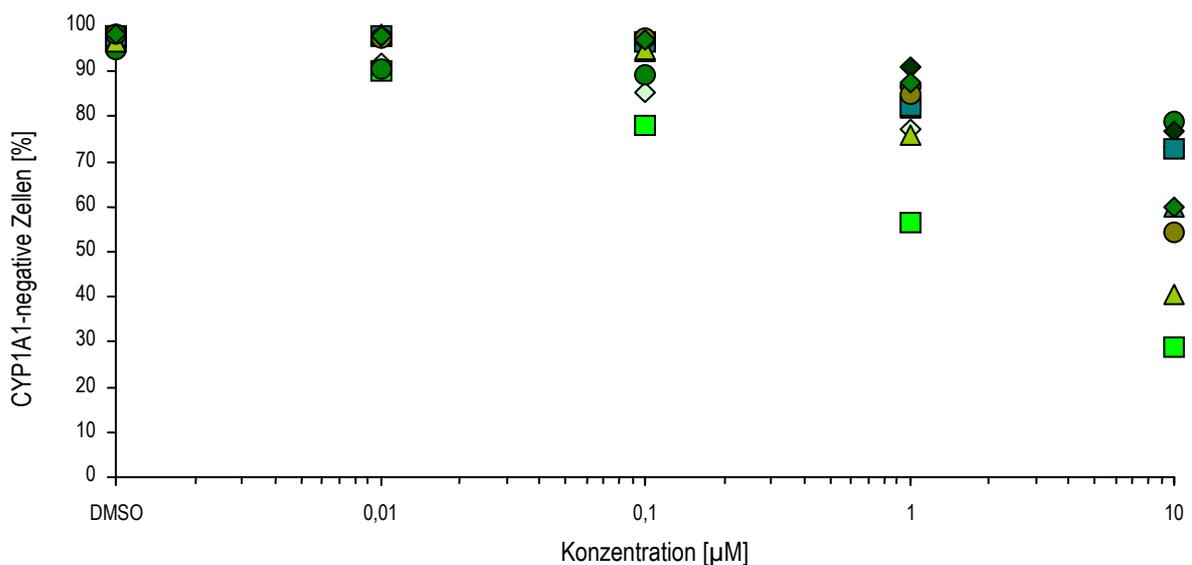
Es wurden Zellen aus 9 Blasen verschiedener Spendertiere an zwei unterschiedlichen Präparationstagen gewonnen und nicht miteinander vermischt in Kultur genommen, um zu untersuchen, ob die in Zellgemischen beobachtete Heterogenität in Bezug auf CYP1A1-Induktion in PUBEC nach Benzo[a]pyren-Behandlung auch auf in diesem Versuchsansatz zu beobachten ist. In Abb. 60 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Zellen aus individuellen Blasen waren durch B[a]P unterschiedlich stark induzierbar. Besonders auffällig war, dass bereits bei 0,1  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren in zwei von neun Fällen 13,3% bzw. 21,2% der Zellen sicher CYP1A1-induziert waren. Die Heterogenität in Bezug auf Cytochrom P450 1A1-Induktion, wie sie für PUBEC-Gemische gefunden wurde, ist auch in Zellen zu finden, die aus individu-

ellen Blasen stammen. Die Anzahl induzierter Zellen variierte besonders bei 10  $\mu\text{M}$  B[a]P sehr stark zwischen den aus individuellen Harnblasen gewonnenen Zellen.



**Abb. 60:** Prozentuale Anteile CYP1A1-positiver PUBEC aus 9 individuellen Schweineharnblasen nach Inkubation mit Benzo[a]pyren (24 h). Die Ergebnisse für PUBEC aus individuellen Spenderorganen sind mit einem anderen Symbol gekennzeichnet.

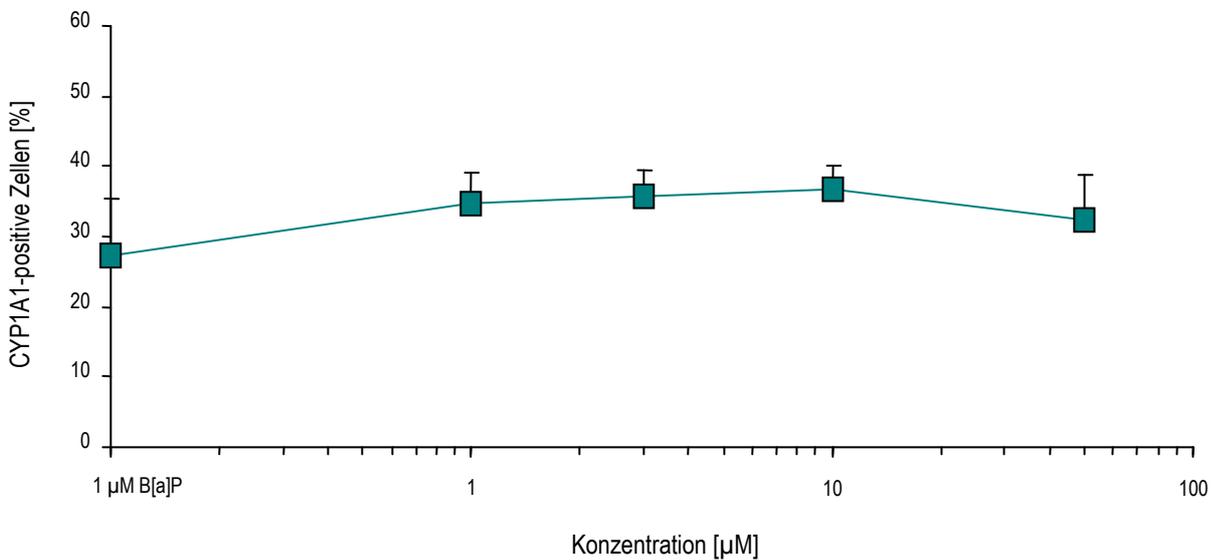
Auch beim Vergleich der in jedem Fall CYP1A1-negativen Zellen wird diese Heterogenität deutlich (Abb. 61). Der Anteil an PUBEC, der definitiv nicht durch 10  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren induziert wurde, liegt im Bereich von 80% bis 28,9% der Zellen und weist damit eine sehr weite Streubreite auf. Offensichtlich reagieren die Zellen aus einigen Spendern in Bezug auf CYP1A1-Induktion bereits bei geringeren Konzentrationen wesentlich stärker als andere.



**Abb. 61:** Prozentualer Anteil sicher CYP1A1-negativer Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Benzo[a]pyren-Konzentration. Die Ergebnisse für PUBEC aus individuellen Spenderorganen sind mit einem anderen Symbol gekennzeichnet.

### 3.2.2.3 CYP1A1-Induktion in PUBEC durch 4-Aminobiphenyl in Kombination mit Benzo[a]pyren

Nach Behandlung mit 4-ABP war keine CYP1A1-Induktion in PUBEC nachweisbar (vgl. 3.2.2.1). Die Co-Inkubation mit 4-ABP und 1  $\mu\text{M}$  B[a]P resultierte in einer leichten Zunahme des prozentualen Anteils induzierter Zellen um im Mittel ca. 5 - 10% im Vergleich zur Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  B[a]P (Abb. 62). Allerdings wurde nur ein sehr geringer Unterschied zwischen der Co-Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  B[a]P und 1, 3 oder 10  $\mu\text{M}$  4-ABP gefunden (6,9%, 8,6% bzw. 9,5% mehr induzierte Zellen als nach B[a]P-Behandlung). Die Abnahme der Anzahl induzierter Zellen nach Co-Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  4-ABP und 1  $\mu\text{M}$  B[a]P ist vermutlich auf Zytotoxizität zurückzuführen.



**Abb. 62:** Prozentualer Anteil CYP1A1-positiver Zellen nach 24 h langer Co-Inkubation mit 4-Aminobiphenyl und 1  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren (n = 3).

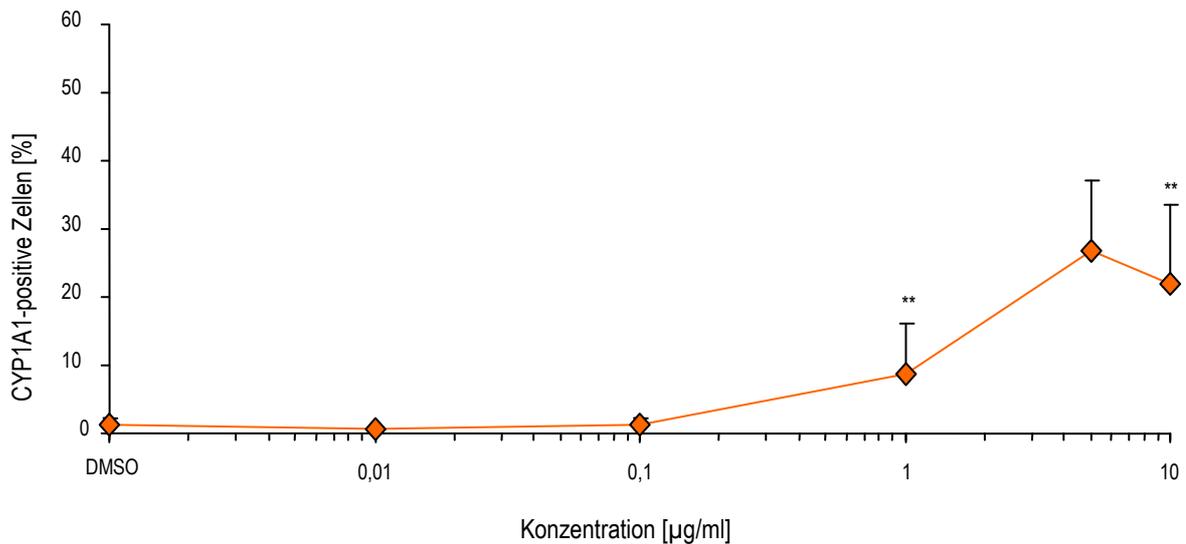
In parallel durchgeführten Inkubationsversuchen mit 10  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren machte der prozentuale Anteil CYP1A1-positiver PUBEC ca. 47,3% der Zellen aus (Tab. 14) und lag somit um ca. 12 - 15% über den maximalen Effekten, die nach der Co-Inkubation gemessen wurden.

**Tab. 13:** Vergleich prozentualer Anteile CYP1A1-positiver Zellen nach Co-Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  B[a]P und 4-ABP oder B[a]P

Testsubstanz	Konzentration	CYP1A1-positive Zellen [%]
4-Aminobiphenyl + 1 $\mu\text{M}$ Benzo[a]pyren	1 $\mu\text{M}$	34,6% ± 4,4%
4-Aminobiphenyl + 1 $\mu\text{M}$ Benzo[a]pyren	3 $\mu\text{M}$	35,8% ± 3,8%
4-Aminobiphenyl + 1 $\mu\text{M}$ Benzo[a]pyren	10 $\mu\text{M}$	36,7% ± 3,3%
4-Aminobiphenyl + 1 $\mu\text{M}$ Benzo[a]pyren	50 $\mu\text{M}$	32,3% ± 6,6%
Benzo[a]pyren	1 $\mu\text{M}$	27,2% ± 8,3%
Benzo[a]pyren	10 $\mu\text{M}$	48,5% ± 2,8%

### 3.2.2.4 CYP1A1-Induktion in PUBEC durch Zigarettenrauchkondensat

Nach Behandlung der Zellen mit dem komplexen Gemisch CSC konnte auch auf Einzelzellebene CYP1A1-Induktion in PUBEC nachgewiesen werden (Abb. 63). Der prozentuale Anteil induzierter Zellen nahm ab einer Konzentration von 1 µg/ml zu. Bei 5 und 10 µg/ml CSC waren maximal 26,7% bzw. 21,8% der Zellen induziert.



**Abb. 63:** Prozentualer Anteil CYP1A1-positiver Zellen nach 24 h langer Inkubation mit Zigarettenrauchkondensat (n = 2 – 6). Die Signifikanz der Ergebnisse ist mit Sternchen wie folgt gekennzeichnet: \*\* sehr signifikant.

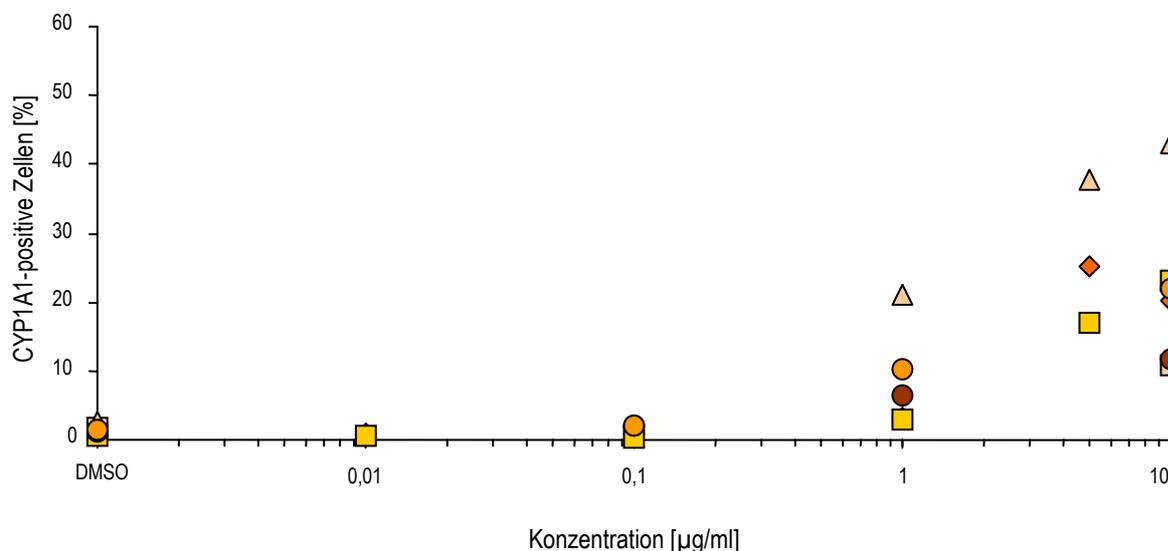
In parallel mit PUBEC durchgeführten Inkubationsversuchen mit Benzo[a]pyren lag die Anzahl CYP1A1-induzierter Zellen nach 24 h langer Inkubation mit 1 µM B[a]P im Mittel bei 19,4% und mit 10 µM B[a]P bei ca. 39,7% der Zellen (Tab. 14).

**Tab. 14:** Vergleich prozentualer Anteile CYP1A1-positiver Zellen nach Inkubation mit CSC oder B[a]P

Testsubstanz	Konzentration	CYP1A1-positive Zellen [%]
Zigarettenrauchkondensat	1 µg/ml	8,7% ± 7,5%
Zigarettenrauchkondensat	5 µg/ml	26,7% ± 10,5%
Zigarettenrauchkondensat	10 µg/ml	21,8% ± 11,8%
Benzo[a]pyren	1 µM	19,4% ± 10,3%
Benzo[a]pyren	10 µM	39,7% ± 12,8%

Auch nach Inkubation mit Zigarettenrauchkondensat wurde eine Verstärkung des unspezifischen Fluoreszenzsignals in den Negativproben (ab 1 µg/ml) gefunden. Wie schon unter 3.2.2.1 erwähnt, ist auszuschließen, dass die Ergebnisse falsch positiv beurteilt wurden. Der Anteil vermutlich falsch negativer Zellen ist nur sehr gering (< 1%).

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen zur CYP1A1-Induktion in PUBEC variierten auch nach 24 h langer Inkubation mit Kondensat stark zwischen den unterschiedlichen Versuchen (Abb. 63). In einem Versuch waren besonders viele empfindliche Zellen innerhalb des untersuchten Zellgemisches vorhanden. Bereits bei 1 µg/ml waren 20% der analysierten Zellen induziert.



**Abb. 64:** Einzelpunktdarstellung des durchflusszytometrischen Nachweises CYP1A1-induzierter PUBEC nach 24 h langer Inkubation mit Zigarettenrauchkondensat. Die Ergebnisse aus individuellen Versuchen sind in unterschiedlichen Farben und mit verschiedenen Symbolen dargestellt

### 3.2.2.5 Zusammenfassung der FACS Ergebnisse

Nach 24 h langer Inkubation von PUBEC mit Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen konnte für alle getesteten Substanzen bis auf 4-Aminobiphenyl CYP1A1-Proteininduktion auf Einzelzellebene nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 15 zusammengefasst.

**Tab. 15:** Zusammenfassung Western Blot Ergebnisse: Eindeutig positive Ergebnisse wurden je nach Stärke des gefundenen Effektes mit +, ++ oder +++ und negative entsprechend mit — gekennzeichnet.

Testsubstanz	Konzentrationsabhängigkeit	CYP1A1 Nachweis	Ergebnis
4-Aminobiphenyl	nein	—	—
Benzo[a]pyren	ja	ab 0,1 µM	+++
Zigarettenrauchkondensat	ja	ab 1 µg/ml	++
4-Aminobiphenyl + 1 µM Benzo[a]pyren	ja (schwach)	ab 1 µM	(+)

## 4 Diskussion

Das Zigarettenrauchen ist eine der Hauptursachen für die Entstehung von Krebs in verschiedenen Organen des Menschen (IARC 1986, 2004). Epidemiologische Studien belegen, dass für Zigarettenraucher ein erhöhtes Risiko besteht, an Urothelkarzinomen zu erkranken (DOLIN 1991, BRENNAN et al. 2000, 2001). Obwohl bekannt ist, dass Tabakrauch mindestens 70 Kanzerogene enthält (IARC 1986, SMITH et al. 1997, 2000, 2001, HOFFMANN et al. 2001), weiß man bis heute nicht, welche dieser Stoffe in welchem Ausmaß für die harnblasenspezifischen Effekte verantwortlich sind. Vor allem den aromatischen Aminen (AA) wird, obwohl sie nur in geringen Mengen im Zigarettenrauch enthalten sind, eine große Rolle in der Entstehung von Harnblasenkrebs durch das Rauchen zugesprochen. Aber auch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) scheinen hierbei einen wichtigen Beitrag zu leisten. Das Harnblasenepithel ist keineswegs nur passives Zielgewebe für reaktive Zwischenprodukte aus dem hepatischen Stoffwechsel. Im Gegenteil, Urothelzellen sind in der Lage, aufgrund ihrer Ausstattung mit fremdstoffmetabolisierenden Enzymen (GUHE et al. 1996, IMAOKA et al. 1997, BRAUERS et al. 2000, ROOS et al. 2006), Prokanzerogene metabolisch zu aktivieren (AUTRUP et al. 1981, LANGENBACH et al. 1981, STONER et al. 1982, IMAOKA et al. 1997, DEGEN et al. 2004).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Genotoxizität bekannter Kanzerogene, die im Zigarettenrauch enthalten sind, in kultivierten Schweineharnblasenepithelzellen (PUBEC) untersucht. Um die individuelle Variabilität zu minimieren, wurde hierbei mit Zellgemischen gearbeitet, die jeweils durch Vermischen von Epithelzellen aus 4 – 6 unterschiedlichen Blasen erhalten wurden. Trotz dieser Maßnahme waren die Ergebnisse gekennzeichnet durch starke individuelle Heterogenität der Zellpopulationen und ein heterogenes Verhalten der Epithelzellen in den Präparationen auf Einzelzellebene.

Die vorliegende Arbeit war eingebettet in ein Verbundprojekt mit dem Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie (MPI). Die dort erhaltenen wesentlichen Befunde wurden von WOLF et al. (2005) publiziert. Es wurde eine extrem starke Induktion von Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) auf mRNA-Ebene durch Benzo[a]pyren (B[a]P) gefunden. Andere Bestandteile aus dem Zigarettenrauch (4-Aminobiphenyl, Dimethylnitrosamin) hatten diesen Effekt auf die Regulation von CYP1A1 nicht. Aus diesem Befund wurde für die krebserzeugende Wirkung von PAK auf die Zellen des Harnblasenepithels das folgende Paradigma abgeleitet (Abb. 65): Das Vorhandensein von PAK (im Falle dieser Arbeit gezeigt am Beispiel von B[a]P) führt zu einer Hochregulation von CYP1A1, wodurch es sekundär zu einer Verstärkung der metabolischen Aktivierung der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe und damit zu verstärkten genotoxischen Effekten kommt.



**Abb. 65:** Schematische Darstellung zur Entstehung genotoxischer Effekte durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), wie z. B. Benzo[a]pyren (B[a]P).

Auf dem Hintergrund dieses generellen Paradigmas wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen auf zwei verschiedenen Ebenen durchgeführt. Einerseits galt es, die von WOLF et al. (2005) auf mRNA-Ebene beschriebenen Induktionseffekte von CYP1A1 auf der Proteinebene zu verifizieren. Zum Zweiten wurde der Effekt der Bioaktivierung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen auf der Ebene genotoxischer Effekte untersucht. Dazu wurden Testsysteme ausgewählt, die für krebserzeugende PAK eine genotoxische Wirkung anzeigen, aber nicht für andere Kanzerogene, die ebenfalls im Zigarettenrauch enthalten sind, wie 4-Aminobiphenyl, Dimethylnitrosamin und Acrylnitril. Als geeignete Testsysteme für diesen Zweck erwiesen sich der Mikrokern-Test und der COMET Assay, die beide an dem hier benutzten Zellkultursystem anwendbar waren. Nachfolgend werden die mit Einzelsubstanzen und Kombinationen erhaltenen Ergebnisse unter diesen Aspekten (siehe Kapitel 4.2) diskutiert. Die Diskussion ist in einen methodischen (Kapitel 4.1) und einen allgemeinen Diskussionsteil (Kapitel 4.2) gegliedert.

## 4.1 Methodische Diskussion

### 4.1.1 Genotoxizitätstests: COMET Assay und Mikrokern-Test

Die Genotoxizität von Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen wurde mittels COMET Assay und Mikrokern-Test in Primärkulturen der Schweineharnblase (PUBEC) untersucht. Das Zellkulturmodell war unter den für die vorliegende Arbeit gewählten Rahmenbedingungen besonders sensitiv in Bezug auf den Nachweis von Effekten, die durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe hervorgerufen wurden. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass Benzo[a]pyren nach metabolischer Aktivierung zur Induktion von DNA-Strangbrüchen führt, die mit dem COMET Assay gemessen werden können (SPEIT et al. 1996, HANELT et al. 1997, UHL et al. 1999, 2000, ANNAS et al. 2000, WILKENING et al. 2003). Zudem wurde in Leitfaden-Vorschlägen zur Durchführung des COMET Assay B[a]P als Positivkontrolle für den Nachweis genotoxischer Wirkungen empfohlen (TICE et al. 2000), und im Mikrokern-Test wurde diese Substanz ebenfalls als Positivkontrolle verwendet (ISHIDATE et al. 1988, MATSUOKA et al. 1992, 1999, MATSUSHIMA et al. 1999, WU et al. 2003).

### *COMET Assay*

Mit Hilfe des COMET Assay in der alkalischen Variante, wie er in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde, ist es möglich, DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche, reparaturinduzierte Strangbrüche sowie alkalilabile Stellen der DNA nachzuweisen (COLLINS et al. 1997). Allerdings kann der COMET Assay nicht die Art des DNA-Schadens anzeigen, da als Endpunkt nur Strangbrüche bzw. das Wanderungsverhalten fragmentierter DNA gemessen werden. Durch Modifikationen dieses Tests, wie z. B. durch Behandlung lysierter Zellen mit Reparaturenzymen, ist es jedoch möglich, bestimmte DNA-Schäden wie z. B. oxidative DNA-Läsionen sichtbar zu machen (COLLINS et al. 1993, 1996). Neben verschiedenen Vorzügen des COMET Assay, wie der einfachen Handhabung, der schnellen Durchführung und der geringen Kosten, liegt ein großer Vorteil dieses Tests darin, dass nur eine geringe Zellzahl benötigt wird, um ihn durchzuführen.

Für die Auswertung des COMET Assay stehen verschiedene Parameter zur Verfügung. Hierzu zählen Tail Länge, Tail Moment und Tail Intensität. Als am wenigsten sensitiv ist der Parameter Tail Länge anzusehen. Er zeigt nur die Wanderungstrecke der DNA-Fragmente an, nicht jedoch die DNA-Menge innerhalb des Tail (Kometenschweifs). Wesentlich sensitiver sind die Parameter Tail Moment und Tail Intensität, bei denen nicht nur die Größe der DNA-Fragmente, welche die Länge des Tail bestimmen, sondern auch die DNA-Menge im Kometenschweif mit in die Berechnung einfließt. Das Tail Moment ist das Produkt aus Tail Länge und DNA-Gehalt im Tail und damit ein sehr sensitiver Parameter. Allerdings besteht ein Nachteil dieses Parameters darin, dass er von unterschiedlichen Analyse-Programmen nicht einheitlich berechnet wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher die Tail Intensität als Auswerteparameter gewählt. Hierbei ist die gemessene Fluoreszenzintensität im Tail gleichzusetzen mit der prozentualen DNA-Menge im Schweif des Kometen.

### *Mikrokern-Test*

Der Mikronukleus-Test ist ein Assay zum Nachweis chromosomaler Schäden in proliferierenden Zellen. Bei Mikrokernen handelt es sich um Chromosomenfragmente oder vollständige Chromosomen, die von einer Kernmembran umgeben sind. Lokalisiert sind sie im Zytosol außerhalb des eigentlichen Zellkerns. Sie entstehen während der Mitose aufgrund von Chromosomenbrüchen (klastogener Effekt) oder Fehlverteilungen von Schwesterchromatiden auf die Tochterzellen (aneugener Effekt). Im Gegensatz zum COMET Assay handelt es sich beim Mikrokern-Test um keine Momentaufnahme eines Schadens, wie es z. B. bei reparaturinduzierten DNA-Strangbrüchen der Fall wäre, sondern um einen manifestierten Schaden. Es besteht grundsätzlich die Möglichkeit, im Mikronukleus-Test zwischen aneugenem und klastogenem Effekt zu unterscheiden. Fehlverteilte Chromosomen können beispielsweise mit Hilfe spezifischer fluorochromkonjugierter Antikörper gegen Kinetochor-Proteine markiert und mittels Immunfluoreszenz detektiert werden. Aufgrund der recht hohen Variabilität der Mikrokern-Testergebnisse, die

freundlicherweise von der Postdoktorandin Dr. Behm für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt wurden, ist nicht zwischen beiden Effekten unterschieden worden.

In Bezug auf die Nachweisgrenze genotoxischer Schäden war der Mikronukleus-Test etwas sensitiver als der COMET Assay. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von VALENTIN-SEVERIN et al. (2003), die einer metabolisch kompetenten Hepatom-Zelllinie (HepG2) in parallel durchgeführten Inkubationsversuchen mit dem Mikrokern-Test bereits bei geringeren B[a]P-Konzentrationen als mit dem COMET Assay Genotoxizität nachweisen konnten. Ein Grund hierfür ist sicherlich, dass der Mikronukleus-Test nicht nur klastogene Effekte erfasst, wie sie auch mit dem COMET Assay gemessen werden. Dieser Test erfasst zusätzlich Mikrokerne, die aus fehlverteilten Chromosomen aufgrund von Störungen am Spindelapparat hervorgerufen werden (aneugene Effekte).

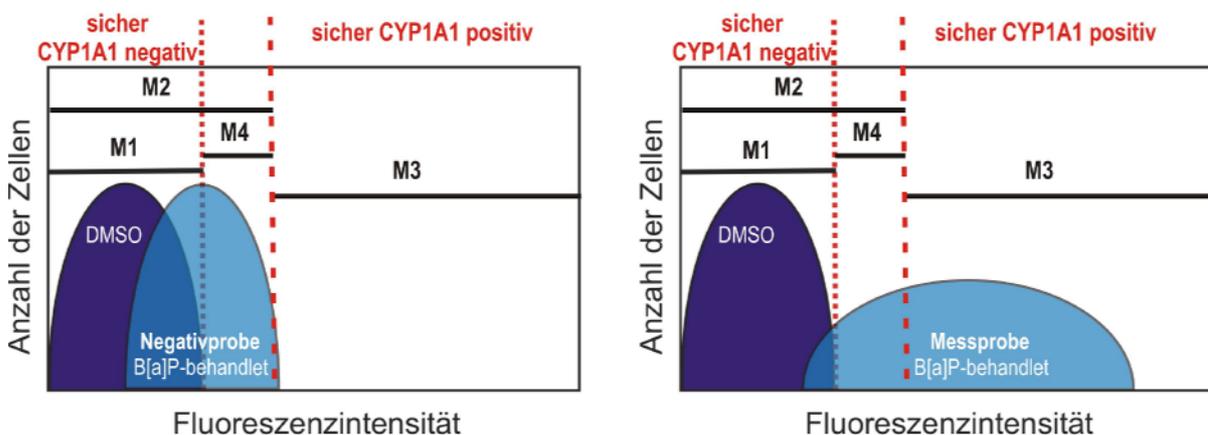
#### **4.1.2 Intrazellulärer Nachweis von CYP1A1 mittels Durchflusszytometrie**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zum intrazellulären Nachweis von CYP1A1 in kultivierten Urothelzellen der Schweineharnblase auf Einzelzellniveau entwickelt. Cytochrom P450 Enzyme sind in Membranen des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Zum Nachweis von CYP1A1-Induktion war es daher notwendig, die Zellen vor der Inkubation mit dem spezifischen Antikörper zu permeabilisieren. Hierzu eignete sich ein kommerziell erhältliches Kit, welches Saponin für die Permeabilisierung und Formaldehyd zur Fixierung der Zellen enthielt. In der vorliegenden Arbeit wurde CYP1A1 mittels indirekter Immunfluoreszenz-Technik nachgewiesen. Die äußeren Rahmenbedingungen dieser Methode ähnelten im Allgemeinen denen der von BROCCARDO et al. (2004) angewandten Methode zum Nachweis von CYP1A1-Induktion in Einzelzellen nach Inkubation mit polychlorierten Biphenylen.

Das Erfassen des prozentualen Anteils CYP1A1-positiver Zellen nach Inkubation mit Benzo[a]pyren erwies sich als nicht ganz unproblematisch, da dieser PAK über eine sehr starke Autofluoreszenz verfügt und somit ein starkes Störsignal bildete. Die Fluoreszenz des PAK strahlte in die Fluoreszenzkanäle (FL1 und FL2), die für die Erfassung der CYP1A1-Induktion benutzt wurden. Hierbei war es unwesentlich, ob der zum Nachweis benutzte Zweitantikörper mit den Fluorochromen Fluorescein (Fluoreszenzkanal FL1) oder Phycoerythrin (Fluoreszenzkanal FL2) konjugiert war. Die Autofluoreszenz von B[a]P blieb als Störsignal vorhanden und konnte auch durch Veränderung der Geräteeinstellung nicht kompensiert werden, ohne dass es zu Datenverlusten gekommen wäre. Aufgrund dessen war es notwendig, die Fluoreszenz von Benzo[a]pyren für jede einzelne Probe separat zu erfassen und in der abschließenden Auswertung der Ergebnisse zu subtrahieren. Hierzu wurde von den zu messenden, Benzo[a]pyren- bzw. Lösemittel-behandelten PUBEC sowohl eine Mess- (Positiv-) als auch eine Negativprobe vorbereitet. In der Positivprobe waren sowohl der Primärantikörper gegen CYP1A1 als

auch der fluorochromkonjugierte Zweitantikörper vorhanden. Die Negativprobe hingegen bestand nur aus Zellen, die zuvor mit Benzo[a]pyren inkubiert worden waren. Da der Sekundärantikörper nicht unspezifisch an zelluläre Strukturen gebunden hat, war es ausreichend, nur die Zellen – ohne Behandlung mit dem Sekundärantikörper – als Negativprobe zu verwenden. Alle Proben eines Inkubationsexperimentes wurden mit derselben Geräteeinstellung gemessen, d. h. sowohl die Negativ- als auch die zugehörige Positivprobe. Die Geräteeinstellung für die Datenakquisition wurde über die Autofluoreszenz von DMSO-behandelten Zellen durchgeführt, die nicht mit Antikörpern behandelt wurden.

Eine Unterscheidung zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellen konnte nach der Akquisition der Daten nur mit Hilfe der Auswertesoftware „CellQuest Pro“ erfolgen. Hierzu wurden sämtliche Daten in Histogrammen abgebildet, und mit Hilfe der verwendeten Software wurde eine Histogrammstatistik erstellt. Die dazu benötigten Auswertemarker (M1 bis M4) wurden wie in Abb. 66 dargestellt platziert. Sicher CYP1A1-negativ waren alle Zellen im Bereich des Markers M1; sicher CYP1A1-positiv waren alle gemessenen Zellen im Bereich des Markers M3. Zur Berechnung der Anzahl vermutlich CYP1A1-positiver Zellen mussten die Anteile der Zellen im Bereich M4 der Negativprobe von denen der Positivprobe subtrahiert werden ( $M4_{\text{Negativprobe}} - M4_{\text{Positivprobe}} = \Delta M4$ ). Der Differenzwert, der die vermutlich CYP1A1-positiven Zellen ( $\Delta M4$ ) repräsentiert, wurde zum Wert sicher CYP1A1-positiver Zellen (M3) addiert, wodurch die Anzahl CYP1A1-positiver Zellen korrigiert werden konnte ( $\Delta M4 + M3 =$  korrigierter Wert für CYP1A1-positive Zellen).



**Abb. 66:** Auswertung von FACS-Daten zur Bestimmung des Anteils CYP1A1-positiver Zellen nach Benzo[a]pyren-Behandlung. Im linken Teil der Abbildung sind Histogramm-Marker für die Auswertung der Negativprobe, im rechten Teil entsprechend Marker für die Positiv- bzw. Messprobe dargestellt. M1: definitiv CYP1A1-negative Zellen der DMSO-Kontrolle, M2: Autofluoreszenz nach B[a]P-Behandlung, M3: definitiv CYP1A1-positive Zellen nach B[a]P-Behandlung, jenseits des Autofluoreszenzbereiches, M4: unsicherer Anteil CYP1A1-negativer Zellen innerhalb der Autofluoreszenz

Die Autofluoreszenz von B[a]P kann man sich zur Bestimmung von CYP-Enzymaktivitäten zunutze machen (MILLER & WHITLOCK 1981, 1982a, 1982b, 1983, MILLER 1990). MILLER & WHITLOCK beschrieben 1981 eine Methode, mit Hilfe derer es möglich ist, in individuellen Zellen Cytochrom P450-Enzymaktivi-

tät nachzuweisen. Benzo[a]pyren ist sehr lipophil und gelangt einfach in die Zelle. Um wieder aus der Zelle geschleust zu werden, muss es in eine wasserlöslichere Form überführt werden, die über Cytochrom P450 Enzyme katalysiert wird. Die Methode von MILLER & WHITLOCK (1981) basiert auf der Abnahme der B[a]P-Fluoreszenz in einzelnen Zellen über die Zeit. In den für die Untersuchungen verwendeten Zellen (Maus-Hepatoma-Zelllinie) ging die Autofluoreszenz der Zellen bereits nach 20 min auf den Ausgangswert unbehandelter Zellen zurück. Für den Nachweis von Enzymaktivität wurden nur 25 nM Benzo[a]pyren eingesetzt (MILLER & WHITLOCK 1981). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde hingegen mit relativ hohen Konzentrationen des PAK gearbeitet, da CYP1A1-Induktion erst ab 0,5  $\mu\text{M}$  B[a]P mittels Western Blot in Zellhomogenaten erfasst werden konnte. Ab 1  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren wurde jedoch bereits der Störeffekt durch die Autofluoreszenz verzeichnet. Der Verbleib der starken Fluoreszenz im  $\mu\text{M}$ -Konzentrationsbereich ist auf Benzo[a]pyren zurückzuführen, das noch in den Zellen vorhanden ist. Aufgrund der relativ hohen Konzentrationen des PAK ( $\mu\text{M}$ -Bereich), die für die Induktion von CYP1A1 auf Proteinebene notwendig waren, eignete sich das verwendete Zellkulturmodell unter den gewählten Rahmenbedingungen nicht für Enzymaktivitätsstudien nach der Methode von MILLER & WHITLOCK (1981).

## 4.2 Allgemeine Diskussion

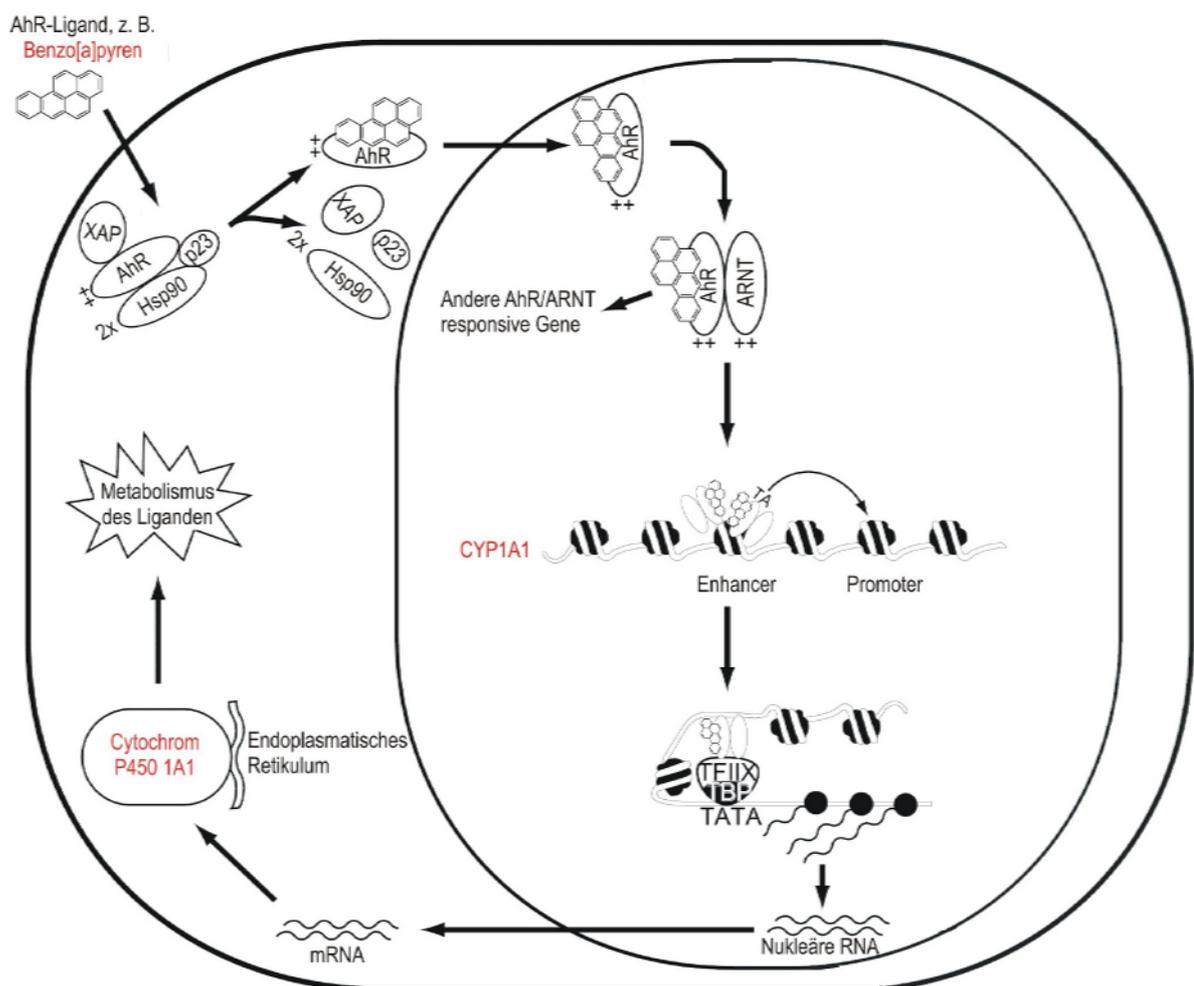
### 4.2.1 Induktion von Cytochrom P450 1A1 und genotoxische Effekte von Einzelkomponenten aus dem Zigarettenrauch in PUBEC

In Inkubationsversuchen mit Einzelsubstanzen aus dem Zigarettenrauch wurden nur nach Behandlung mit dem PAK Benzo[a]pyren auffällige CYP1A1-Induktionseffekte gefunden. Dies galt sowohl für die vom Verbundprojektspartner durchgeführten Genexpressionsanalysen als auch für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Genotoxizitätstests. Nach Behandlung von PUBEC mit 4-Aminobiphenyl und Dimethylnitrosamin (WOLF 2003) wurde keine derartig ausgeprägte Induktion von CYP1A1-mRNA gefunden wie nach Inkubation mit Benzo[a]pyren (WOLF et al. 2005). 4-Aminobiphenyl, ein aromatisches Amin und bekanntes Blasenkarzinogen beim Menschen, war in allen im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Genotoxizitätstests negativ, ebenso wie Dimethylnitrosamin und Acrylnitril. Wie eingangs erwähnt, waren die gewählten Testmethoden besonders für den Nachweis genotoxischer Effekte durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe geeignet.

Die Ergebnisse von WOLF et al. (2005), die eine verstärkte CYP1A1-Genexpression nach Inkubation mit Benzo[a]pyren gezeigt haben, konnten in der vorliegenden Arbeit auch auf Proteinebene bestätigt werden. Konzentrationen, die zu einer Veränderung der CYP1A1-Expression führten, lagen sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene in etwa gleicher Größenordnung. Eine deutlich erhöhte CYP1A1-Expression wurde bereits bei 0,1  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren gefunden. Bei dieser Konzentration war die

CYP1A1-mRNA-Expression um das 20fache, für 5  $\mu\text{M}$  B[a]P um das 200fache im Vergleich zum verwendeten Lösemittel erhöht (WOLF et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde im Western Blot CYP1A1-Proteinexpression ab einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  B[a]P nachgewiesen. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten schon ab 0,1  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren, wenn auch statistisch nicht signifikant, vermehrt induzierte Einzelzellen im Zellgemisch gefunden werden.

Es ist bekannt, dass Benzo[a]pyren wie auch andere PAK durch Cytochrom P450 Isoenzyme metabolisch aktiviert wird und zudem seinen eigenen Metabolismus verstärkt (GELBOIN 1980, CONNEY 1982). Dies geschieht über die Induktion von Cytochrom P450 1A1 (Abb. 67), die über den Arylhydrocarbon Rezeptor (AhR) vermittelt wird (WHITLOCK 1989, 1999, HANKINSON 1995).



**Abb. 67:** Schema der CYP1A1-Induktion durch den AhR-Liganden Benzo[a]pyren (entnommen aus WHITLOCK 1999 und modifiziert).

Der AhR ist ein zytosolisches Protein, das gebunden an zwei 90 kDa Hitzeschockproteinmoleküle (Hsp 90), ein Immunophilin-verwandtes Protein (XAP) und ein weiteres Chaperon (p23) als Komplex vorliegt. Nach Bindung eines Liganden, wie z. B. Benzo[a]pyren, dissoziiert der Ah-Rezeptor-Komplex, und der ligandengebundene AhR transloziert in den Zellkern. Dort dimerisiert er mit einem weiteren

Protein, dem sog. Ah-Rezeptor nukleären Translokator (ARNT). Dieser ligandengebundene AhR-ARNT-Komplex fungiert im Weiteren als ein Transkriptionsfaktor, der an spezifische Xenobiotikum-responsive Elemente (XRE) in der DNA bindet, die in der Enhancer/Promoter Region Xenobiotikum-responsiver Gene, wie z. B. CYP1A1 liegen (WHITLOCK 1999, MA 2001).

Die Ergebnisse zur CYP1A1-Induktion durch Benzo[a]pyren waren durch starke individuelle Heterogenität sowohl der Zellpopulationen insgesamt als auch der einzelnen Zellen innerhalb der Präparationen gekennzeichnet. Diese Befunde wurden insbesondere durch die durchflusszytometrischen Analysen gestützt. Innerhalb der untersuchten Zellpopulationen gab es sehr empfindliche Zellen, die bereits durch geringe B[a]P-Konzentrationen induziert wurden. In Zellgemischen betrug z. B. der Anteil CYP1A1-induzierter Zellen nach Behandlung mit 0,1  $\mu\text{M}$  B[a]P zwischen 5 und 13% aller untersuchten Zellen. In Einzelblasenpräparationen waren in einem Fall bei dieser Konzentration sogar mehr als 20% aller analysierten Zellen induziert. Mit steigenden Konzentrationen des PAK nahm auch die Anzahl induzierter Zellen und innerhalb dieser Zellen die Menge an CYP1A1-Protein zu. Dieser Befund deckt sich mit Ergebnissen von BROCCARDO et al. (2004), die Untersuchungen zur CYP1A1-Induktion durch polychlorierte Biphenyle, ebenfalls bekannten CYP1A1-Induktoren, auf Einzelzellebene in metabolisch kompetenten Ratten- und Maus-Hepatoma-Zelllinien durchgeführt haben. Die Autoren postulierten einen sog. Hybriden-Schalter („*hybrid switch*“) als Prinzip für die zelluläre Reaktion auf CYP1A1-Induktoren. Offensichtlich gibt es Konzentrationen des Induktors, im Fall der vorliegenden Arbeit Benzo[a]pyren, in denen Zellen noch nicht auf den Stimulus reagieren. Beim Überschreiten einer Schwellenkonzentration exprimieren die induzierten Zellen graduell mehr CYP1A1 (BROCCARDO et al. 2004). Unterschiede in der Induzierbarkeit wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl in Gemischen aus Zellen verschiedener Spender als auch innerhalb der Zellpopulationen gefunden, die jeweils aus einem individuellen Spendertier gewonnen wurden. Da die Kanzerogenese ein Prozess ist, der von Einzelzellen ausgeht, spielen hierbei vor allem diejenigen Zellen eine besonders wichtige Rolle, die am empfindlichsten auf krebserzeugende Stoffe wie Benzo[a]pyren mit CYP1A1-Induktion reagieren. Hierdurch sind sie in der Lage, PAK bereits bei geringen Konzentrationen zu reaktiven Metaboliten zu aktivieren, die DNA-Addukte bilden und im Folgenden zu einer Mutation führen können.

Heterogene Effekte (individuelle Unterschiede von Einzelblasenpräparationen oder Zellgemischen) wurden auch im Mikronukleus-Test und im COMET Assay gefunden, die genotoxische Wirkungen auf Einzelzellniveau anzeigen. Für Benzo[a]pyren wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme der Genotoxizität gefunden. Allerdings war diese zwischen verschiedenen Versuchen (mit Zellgemischen und auch mit Einzelblasenzellkulturen) unterschiedlich stark ausgeprägt. Im Mittel waren die gefundenen Effekte in beiden Tests ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  B[a]P statistisch signifikant. Mit Hilfe des Mikrokern-Tests wurde bereits im Konzentrationsbereich von 0,1 – 0,5  $\mu\text{M}$  B[a]P beginnende Genotoxizität nachgewiesen, während im COMET Assay erst ab 1  $\mu\text{M}$  Genotoxizität gefunden wurde.

Mit Hilfe des konventionellen COMET Assay wurde in der vorliegenden Arbeit für das PUBEC-Zellkulturmodell gezeigt, dass der genotoxische Effekt von Benzo[a]pyren erst mit Verzögerung auftritt. Zwar wurden bereits nach kurzen Inkubationszeiten (3 und 5 h) DNA-Strangbrüche gemessen, jedoch waren diese wesentlich schwächer ausgeprägt als nach 24 h langer Inkubation. Dieser Befund steht im Einklang mit Ergebnissen von UHL et al. (1999, 2000), die zeigten, dass längere Inkubationszeiten mit Benzo[a]pyren notwendig waren, um in metabolisch kompetenten Zellen DNA-Schäden durch diese Substanz messen zu können. In den verwendeten Zellen (HepG2) wurde erst nach 20 – 24 h langer Behandlung mit B[a]P eine statistisch signifikante Zunahme von DNA-Strangbrüchen beobachtet (UHL et al. 1999). Die Autoren nahmen an, dass dieser zeitabhängige Effekt ein Resultat kontinuierlich gebildeter, DNA-reaktiver Metaboliten sei (UHL et al. 2000). Diese Vermutung liegt auch für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahe und wird zudem durch Befunde mit humanen (Zelllinien und Explantatkulturen) und primären Ratten-Urothelzellen gestützt, die in der Lage waren, Benzo[a]pyren in DNA-reaktive Metaboliten umzuwandeln. In diesen Versuchen nahm die DNA-Bindung mit der Inkubationsdauer zu, und nach 24 h langer Behandlung mit B[a]P waren sowohl die absolute DNA-Bindung als auch die Mengen gebildeter Metaboliten maximal (AUTRUP et al. 1981, STONER et al. 1982). Zusätzlich variierte die Menge DNA-reaktiver B[a]P-Metaboliten, die in Explantatkulturen verschiedener humaner Spender (STONER et al. 1982) als auch in drei unterschiedlichen Urothelzelllinien humanen Ursprungs (AUTRUP et al. 1981) gefunden wurden. Die starke Variabilität zwischen den verschiedenen Kulturen wurde auf interindividuelle Unterschiede der Spender zurückgeführt (STONER et al. 1982). Dies ist auch eine mögliche Erklärung für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Heterogenität der Genotoxizitätstestergebnisse und der unterschiedlich guten Induzierbarkeit von CYP1A1 in PUBEC.

Die genotoxischen Effekte, die mit Hilfe des konventionellen COMET Assay gefunden wurden, waren nach 24 h langer Inkubation maximal. Aus diesem Grund wurde der modifizierte Test, der oxidative DNA Schäden anzeigt, nur für 24 h lange Inkubation mit B[a]P durchgeführt. Mit Hilfe des modifizierten COMET Assay wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme von oxidativen DNA-Schäden ab 3 µM B[a]P gefunden. Auch diese waren zwischen den untersuchten PUBEC-Kulturen aus Zellgemischen verschiedener Spender variabel. Benzo[a]pyren kann durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zur Entstehung von oxidativen DNA-Schäden führen. Für humane und Ratten-Urothelzellen wurde experimentell gezeigt, dass sie B[a]P u. a. zu Diolen (z. B. B[a]P-7,8-diol) metabolisieren können (AUTRUP et al. 1981, LANGENBACH et al. 1981). Diese Metaboliten werden nach Bioaktivierung von B[a]P durch die Cytochrom P450 Isoenzyme 1A1 und 1B1 gebildet. Aufgrund dieses Befundes ist es wahrscheinlich, dass PUBEC, für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit CYP1A1 Induktion nachgewiesen wurde, ebenfalls die entsprechenden Metaboliten bilden. Durch enzymatische Umwandlung von Benzo[a]pyrendiolen in ortho-Chinone (z. B. in B[a]P-7,8-dion) können reaktive Sauerstoffspezies generiert werden (FLOWERS et al. 1996, 1997). Während der enzymatischen Oxidation von Dihydrodiolen wird ein Katechol gebildet, welches zwei aufeinander folgende Ein-Elektronen-Oxidationen durchläuft,

die in der Bildung von Superoxidanion-Radikalen, Wasserstoffperoxid und ortho-Semichinon-Radikalen resultieren (SMITHGALL et al. 1988). Durch Redox-Cycling können aus ortho-Chinonen mehrfach ROS gebildet werden (FLOWERS-GEARY et al. 1992, 1993, 1996), die zur Generierung oxidativer DNA-Schäden beitragen können. Neben der Entstehung von DNA-Addukten durch Benzo[a]pyren, die zur Induktion von DNA-Strangbrüchen führen (HANELT et al. 1997), spielt offensichtlich auch die Bildung von ROS bei der genotoxischen Wirkung des Zigarettenrauch-Inhaltsstoffes B[a]P eine wichtige Rolle.

Insgesamt wurden in PUBEC genotoxische Effekte in etwa den gleichen Konzentrationsbereichen detektiert, in denen auch eine signifikante Induktion von CYP1A1 auf Transkript- (WOLF et al. 2005) und Proteinebene gefunden wurde. Betrachtet man die Ergebnisse für die Benzo[a]pyren-Inkubationen zusammen, lässt sich das eingangs vorgestellte Paradigma (Abb. 65, Seite 88) auch auf Proteinebene bestätigen und zudem wie folgt erweitern: Benzo[a]pyren (als Leitsubstanz für PAK) führt zur Induktion von Cytochrom P450 1A1. Die Induzierbarkeit auf Einzelzellniveau ist sowohl durch die individuelle Varianz einzelner Zellen als auch durch interindividuelle Unterschiede zwischen Zellen aus verschiedenen Spendertieren gekennzeichnet. Durch die CYP1A1-Proteinexpression kommt es im Folgenden zur verstärkten Bildung reaktiver B[a]P-Metaboliten, die kontinuierlich gebildet werden und mit der Zeit zunehmend genotoxisch wirken. Aufgrund der heterogenen Induzierbarkeit von PUBEC (individuelle Variabilität von Einzelzellen und Präparationen aus unterschiedlichen Spendertieren) fallen auch die genotoxischen Effekte von Benzo[a]pyren unterschiedlich stark aus (Abb. 68).



**Abb. 68:** Schematische Darstellung zur Entstehung genotoxischer Effekte durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), wie z. B. Benzo[a]pyren (B[a]P), und der Beeinflussung dieser Effekte durch individuelle Varianz der Zellpräparationen.

#### 4.2.2 Induktion von Cytochrom P450 1A1 und genotoxische Effekte von binären Substanzgemischen aus dem Zigarettenrauch in PUBEC

In kultivierten PUBEC ist auf Proteinebene konstitutiv kein Cytochrom P450 1A1 vorhanden. Die alleinige Inkubation mit dem aromatischen Amin 4-Aminobiphenyl führte zu keiner messbaren Induktion von CYP1A1-Protein. Auch auf Transkriptebene wurde allenfalls ein moderater Induktionseffekt (2,8fache

Induktion von CYP1A1 nach 5 h langer Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  4-ABP) im Bezug auf die Lösemittelkontrolle (WOLF 2003) und im Vergleich mit dem Induktionseffekt durch Benzo[a]pyren gefunden (WOLF et al. 2005). Dagegen wirkte sich in PUBEC das binäre Gemisch aus 1  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren und verschiedenen 4-Aminobiphenyl-Konzentrationen (3 – 50  $\mu\text{M}$ ) verstärkend auf die CYP1A1-Induktion im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit B[a]P aus. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen ergaben für das Gemisch aus PAK und AA im sub-zytotoxischen Bereich einen Steigerungseffekt der Anzahl induzierter Zellen um 7,4% - 9,5% im Vergleich mit Zellen, die mit Benzo[a]pyren alleine behandelt worden waren. Obwohl in diesen Versuchen durch 1  $\mu\text{M}$  B[a]P bereits ein großer Anteil der Zellen induziert war (27,2%), konnten durch 10  $\mu\text{M}$  B[a]P noch weitere 21,3% der Zellen induziert werden. Die Co-Inkubation mit dem binären Gemisch hatte diesen Effekt nicht. Offensichtlich war hauptsächlich die Benzo[a]pyren-Konzentration ausschlaggebend dafür, in wie vielen Zellen CYP1A1 induziert wurde.

Zusätzlichen Aufschluss über den Effekt der Co-Inkubation lieferte die Western Blot Analyse. Nach Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  4-ABP und 1  $\mu\text{M}$  B[a]P war die Menge an CYP1A1-Protein im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit Benzo[a]pyren nicht erhöht. Verstärkte CYP1A1-Proteinexpression wurde für das binäre Gemisch erst im Bereich von 3 – 50  $\mu\text{M}$  4-ABP gefunden. Die Menge an CYP1A1-Protein war bei diesen Konzentrationen des Arylamins deutlich über die durch Benzo[a]pyren induzierte Menge an CYP1A1 erhöht. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten auf mRNA-Ebene überein, wobei dort in zwei von drei Versuchen die CYP1A1-Expression bereits nach Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  4-ABP und 1  $\mu\text{M}$  B[a]P im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit B[a]P leicht erhöht war (persönliche Mitteilung Dr. A. Kutz, MPI für molekulare Physiologie Dortmund). Die Genexpression anderer Cytochrom P450 Isoformen, wie CYP1B1 und CYP4B1, die einen relevanten Einfluss auf den Metabolismus von PAK (KIM et al. 1998) bzw. AA (IMAOKA et al. 1997) haben, war im Gegensatz dazu nicht signifikant verändert. Vorläufige Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Genexpression dieser Isoenzyme weder nach Inkubation mit Benzo[a]pyren oder 4-Aminobiphenyl alleine noch nach Co-Inkubation mit beiden Substanzen zusammen auffällig beeinflusst war (persönliche Mitteilung Dr. A. Kutz).

In PUBEC, die mit einem binären Gemisch aus PAK und AA behandelt wurden, konnte mittels Mikrokern-Test eine genotoxische Wirkung nachgewiesen werden, die über den alleinigen Effekt von Benzo[a]pyren hinausging. Währenddessen lagen die Ergebnisse für den konventionellen und auch den modifizierten COMET Assay im Bereich der Effekte durch 1  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren, was der Nachweisgrenze genotoxischer Effekte von B[a]P mit diesem Assay entspricht. Vermutlich wurden durch die verstärkte CYP1A1-Induktion noch nicht ausreichend genotoxische Benzo[a]pyren-Metaboliten gebildet, um deren Wirkungen mit dem COMET Assay messen zu können. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass durch die Co-Inkubation mit B[a]P und verschiedenen 4-ABP-Konzentrationen reaktive

Metaboliten entstanden sind, die im Folgenden zur Störung des mitotischen Spindelapparates führten, und dass es zu Fehlverteilungen von Chromosomen kam.

Die Verbindung 4-Aminobiphenyl ist bekanntermaßen blasenkrebs erzeugend im Menschen (IARC 1972, 1987). Nach allgemein vorherrschender Meinung spielt die metabolische Aktivierung durch Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2) eine zentrale Rolle für die krebserregende Wirkung von 4-ABP. Der Hauptort dieser enzymkatalysierten Reaktion ist die Leber, von wo aus die gebildeten Metaboliten in den Blutkreislauf gelangen und durch renale Filtration in den Harn ausgeschieden werden. Im sauren Milieu des Urins kann es zur Entstehung eines hochreaktiven Nitrenium-Ions kommen, das nach Aufnahme in Urothelzellen DNA-Addukte bildet. Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass die aromatischen Amine im Zigarettenrauch nicht alleine für den blasenkanzerogenen Effekt verantwortlich sind. Einer ist beispielsweise der Befund von GRIMMER et al. (2000), die im Urin von Rauchern zwar insgesamt mehr aromatische Amine nachweisen konnten. Der Anteil an kanzerogenen aromatischen Aminen unterschied sich jedoch kaum im Urin von Rauchern und Nichtrauchern (GRIMMER et al. 2000). Zudem ist nicht abschließend geklärt, in wieweit das Urothel selbst in der Lage ist, aromatische Amine über CYP1A2 metabolisch zu aktivieren, da widersprüchliche Befunde zum Vorkommen von Cytochrom P450 1A2 in Harnblasenzellen vorliegen. Während BRAUERS et al. (2000) in einigen der von ihnen untersuchten Blasenbiopsien CYP1A2-mRNA-Expression fanden, konnten VAZIRI et al. (2001) weder CYP1A2-Proteinexpression noch -Enzymaktivität in Epithelzellen der Harnblase nachweisen. In Tierversuchen mit Mäusen, in denen das für CYP1A2 codierende Gen deletiert war, kam es nach Verabreichung von 4-ABP zur Bildung von 4-ABP-DNA-Addukten (TSUNEOKA et al. 2003). Demnach kann CYP1A2 nicht alleine für die metabolische Aktivierung von aromatischen Aminen verantwortlich sein. Es ist bekannt, dass das Isoenzym CYP4B1 eine Rolle bei der metabolischen Aktivierung von aromatischen Aminen im Urothel spielt (IMAOKA et al. 1997). In PUBEC war die Genexpression dieses Enzyms jedoch nicht auffällig durch die untersuchten Zigarettenrauch-Inhaltsstoffe 4-ABP und B[a]P beeinflusst (persönliche Mitteilung Dr. A. Kutz).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass offensichtlich CYP1A1 eine wichtige Rolle für die genotoxischen Effekte von PAK in Kombination mit aromatischen Aminen spielt. Die durch Benzo[a]pyren induzierte CYP1A1-Proteinexpression wurde durch 4-Aminobiphenyl deutlich verstärkt. Dieser Effekt auf die Regulation von CYP1A1 wurde bislang noch nicht beschrieben. Der zugrunde liegende Mechanismus ist nicht bekannt. Eine Möglichkeit wäre: Benzo[a]pyren induziert zunächst CYP1A1 und wird dadurch metabolisch aktiviert. Obwohl andere Cytochrom P450 Isoenzyme als CYP1A1 eine wichtige Rolle bei der metabolischen Aktivierung von 4-Aminobiphenyl spielen, kann dieses Isoenzym auch in einem gewissen Ausmaß aromatische Amine metabolisieren (TURESKY et al. 1998). Die gebildeten Metaboliten könnten nach ihrer Bioaktivierung miteinander reagieren und einen Komplex bilden, der eine höhere Affinität zum Ah-Rezeptor besitzt, wodurch es im Folgenden zu einer

erhöhten Transkription des CYP1A1-Gens kommt. Die im Mikrokern-Test gefundenen genotoxischen Effekte lagen im gleichen Konzentrationsbereich, in dem auch CYP1A1-Induktion auf Proteinebene gefunden wurde. Offensichtlich ist die genotoxische Wirkung des binären Gemisches auf erhöhte CYP1A1-Induktion in PUBEC-Zellen und dadurch vermehrt gebildete reaktive Metaboliten von Benzo[a]pyren zurückzuführen. Das vorgestellte Paradigma zur Entstehung genotoxischer Effekte durch PAK kann somit ergänzt werden (Abb. 69): Die Induktion von CYP1A1 durch PAK wird durch aromatische Amine verstärkt, sodass im Folgenden PAK verstärkt metabolisch aktiviert werden und es zu verstärkten genotoxischen Effekten durch diese Substanzklasse kommt.



**Abb. 69:** Schematische Darstellung zur Entstehung genotoxischer Effekte durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), wie z. B. Benzo[a]pyren (B[a]P) in Kombination mit aromatischen Aminen (AA), wie z. B. 4-Aminobiphenyl, und der Beeinflussung dieser Effekte durch individuelle Varianz der Zellpräparationen.

#### 4.2.3 Induktion von Cytochrom P450 1A1 und genotoxische Effekte von komplexen Substanzgemischen aus dem Zigarettenrauch in PUBEC

Nach Inkubation mit dem komplexen Gemisch Zigarettenrauchkondensat (CSC) wurde sowohl auf mRNA- (persönliche Mitteilung Dr. A. Kutz) als auch auf Proteinebene Induktion von CYP1A1 gefunden. Die gefundenen Effekte waren bis in den Bereich beginnender Zytotoxizität in ihren Ausmaßen jedoch weniger stark als nach Inkubation mit verschiedenen Benzo[a]pyren-Konzentrationen. Auf mRNA-Ebene wurde im Vergleich zum Lösemittel nach 24 h langer Inkubation mit Kondensat bereits ab 10 ng/ml CSC leicht verstärkte CYP1A1-Genexpression gefunden (persönliche Mitteilung Dr. A. Kutz). Dieser Effekt spiegelte sich jedoch nicht auf Proteinebene wider. Dort wurde CYP1A1-Induktion erst ab einer Kondensat-Konzentration von 1 µg/ml nachgewiesen. 10 und 100 ng/ml Zigarettenrauchkondensat hatten noch keinen Einfluss auf die Induktion dieses Enzyms.

Die Anzahl induzierter Zellen variierte zwischen den unterschiedlichen Zellpräparationen, in denen Zellgemische aus verschiedenen Spendertieren verwendet wurden. Dieser Befund wurde insbesondere durch die durchflusszytometrischen Analysen belegt. Im Konzentrationsbereich von 5 bis 10 µg/ml Kondensat wurde in einer maximalen Anzahl von Zellen (21,8% - 26,7%) CYP1A1 induziert. Die Menge

an CYP1A1-Protein nahm innerhalb der induzierten Zellen noch weiter zu, was beim Vergleich mit den Daten der Western Blot Analyse deutlich wird. Offensichtlich ist der Effekt durch Kondensat dem durch Benzo[a]pyren relativ ähnlich, bis auf die Tatsache, dass insgesamt deutlich weniger Zellen induziert waren und weniger CYP1A1-Protein innerhalb der Zellen exprimiert wurde.

Die genotoxische Wirkung von Zigarettenrauchkondensat ist bekannt und wurde mehrfach in verschiedenen Testsystemen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (DEMARINI 2004). Mit Hilfe der im Rahmen der vorliegenden Dissertation verwendeten Genotoxizitätstests (Mikronukleus-Test und COMET Assay) wurden ebenfalls genotoxische Wirkungen des komplexen Gemisches Zigarettenrauchkondensat gezeigt. Im Vergleich mit den Resultaten, die mit denselben Testmethoden nach Inkubation mit Benzo[a]pyren gewonnen wurden, waren die Effekte des verwendeten Kondensats jedoch nur sehr gering. Mit Hilfe des modifizierten COMET Assay wurden zusätzlich zu den allgemeinen DNA-Schäden oxidative Basenmodifikationen ab 1 µg/ml Kondensat detektiert. Es wurde in verschiedenen Arbeiten mit Zellkulturen gezeigt, dass Zigarettenrauch und Zigarettenrauchkondensat zur Induktion von DNA-Strangbrüchen führen und dass darüber hinaus die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies und damit die Entstehung oxidativer DNA-Schäden eine wichtige Rolle spielt (NAKAYAMA et al. 1985, FIELDING et al. 1989, LEANDERSON & TAGESSON 1990, 1992, WU et al. 2005).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch das Zigarettenrauchkondensat induzierten genotoxischen Effekte wurden im gleichen Konzentrationsbereich gefunden, in dem auch die CYP1A1-Induktion erhöht war. Diese Befunde lassen sich auf das Paradigma für die krebserzeugende Wirkung von PAK auf die Zellen des Harnblasenepithels anwenden: Zigarettenrauchkondensat führt zur Induktion von CYP1A1 in PUBEC, wodurch es im Folgenden zur verstärkten metabolischen Aktivierung von PAK kommt, die sekundär in verstärkten genotoxischen Effekten resultieren (Abb. 70).



**Abb. 70:** Schematische Darstellung zur Entstehung genotoxischer Effekte durch Zigarettenrauchkondensat (CSC) und der Beeinflussung dieser Effekte durch individuelle Varianz der Zellpräparationen.

Zigarettenrauch ist ein komplexes Gemisch aus ca. 4.800 verschiedenen Substanzen (GREEN & RODGMAN 1996). Je nach Zusammensetzung der für die Zigaretten verwendeten Tabaksorten enthält die Gesamtpartikelmasse, die durch Abrauchen unter standardisierten Bedingungen (FTC/ISO-

Standard: ein Zug pro Minute mit einem Volumen von 35 ml und einer Zugdauer von 2 Sekunden) generiert wurde, unterschiedliche Quantitäten dieser Substanzen (HOFFMANN et al. 2001). Man unterscheidet je nach Teergehalt der Partikelphase zwischen „full flavor“ (> 15 mg Teer/Zigarette), „low tar“ (6 – 15 mg Teer/Zigarette) und „ultra low tar“ (< 6 mg Teer/Zigarette) Zigaretten (IARC 2004). Im Zusammenhang mit dem Rauchen versteht man unter dem Begriff „Teer“ die Gesamtpartikelmasse des Zigarettenrauchkondensats (CSC) abzüglich des Wasser- und Nikotingehalts.

Zum Studium von Effekten des Zigarettenrauchs, wie z.B. Genotoxizität oder Kanzerogenität und zur besseren Vergleichbarkeit der in solchen Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse wurden von der Universität von Kentucky Standard-Referenzzigaretten entwickelt. Diese liefern Teergehalte, die ähnlich denen kommerziell erhältlicher Zigaretten sind. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Zigarettenrauchkondensat stammt von der „low tar“ Standard-Referenzzigarette „2R4F“ der Universität von Kentucky. Sie wurde 2001 als Nachfolgezigarette der 1983 entwickelten Referenzzigarette „1R4F“ hergestellt (KENTUCKY TOBACCO RESEARCH & DEVELOPMENT CENTER 2003). Bislang liegen erst wenige Zigarettenrauch-Analysen für diese Nachfolgezigarette vor, mit Hilfe derer Berechnungen angestellt werden können. In Tab. 16 sind die Gewichtsanteile aufgeführt, die nach maschinellm Abrauchen unter FTC/ISO-Bedingungen erhalten wurden bzw. generiert werden sollten (CHEN & MOLDOVEANU 2003, KENTUCKY TOBACCO RESEARCH & DEVELOPMENT CENTER 2003, SMITH et al. 2003, ROEMER et al. 2004).

**Tab. 16:** Zigarettenrauchinhaltsstoffe, die nach maschinellm Abrauchen unter ISO/FTC-Bedingungen einer „low tar“ Referenzzigarette „1R4F“ bzw. „2R4F“ erhalten wurden. Die Gewichtsangaben pro Zigarette stammen aus Arbeiten von <sup>a</sup>ROEMER et al. (2004), <sup>b</sup>CHEN & MOLDOVEANU (2003) und <sup>d</sup>SMITH et al. (2003). In Klammern sind Werte aufgeführt, die laut <sup>c</sup>KENTUCKY TOBACCO RESEARCH & DEVELOPMENT CENTER (2003) beim Abrauchen der Referenzzigarette erhalten werden sollten.

<b>Zigarettenrauch-Inhaltsstoff</b>		<b>1R4F</b>	<b>2R4F</b>
<b>(Gewicht pro abgerauchter Zigarette)</b>			
TPM (Gesamtpartikelmasse)	mg	10,3 <sup>a</sup>	(11,70 <sup>c</sup> )
Teer	mg	8,44 <sup>a</sup> (9,2 <sup>c</sup> )	(9,70 <sup>c</sup> )
Nikotin	mg	0,752 <sup>a</sup> (0,8 <sup>c</sup> )	(0,85 <sup>c</sup> )
Acrylnitril	µg	9,51 <sup>b</sup> – 13,5 <sup>a</sup>	8,28 <sup>b</sup>
4-Aminobiphenyl	ng	1,34 <sup>a</sup> – 1,97 <sup>b</sup>	1,6 <sup>d</sup> – 1,73 <sup>b</sup>
Dimethylnitrosamin	ng	< 5,0 <sup>a</sup>	keine Daten
Benzo[a]pyren	ng	5,51 <sup>b</sup> – 5,97 <sup>a</sup>	6,96 <sup>b</sup>

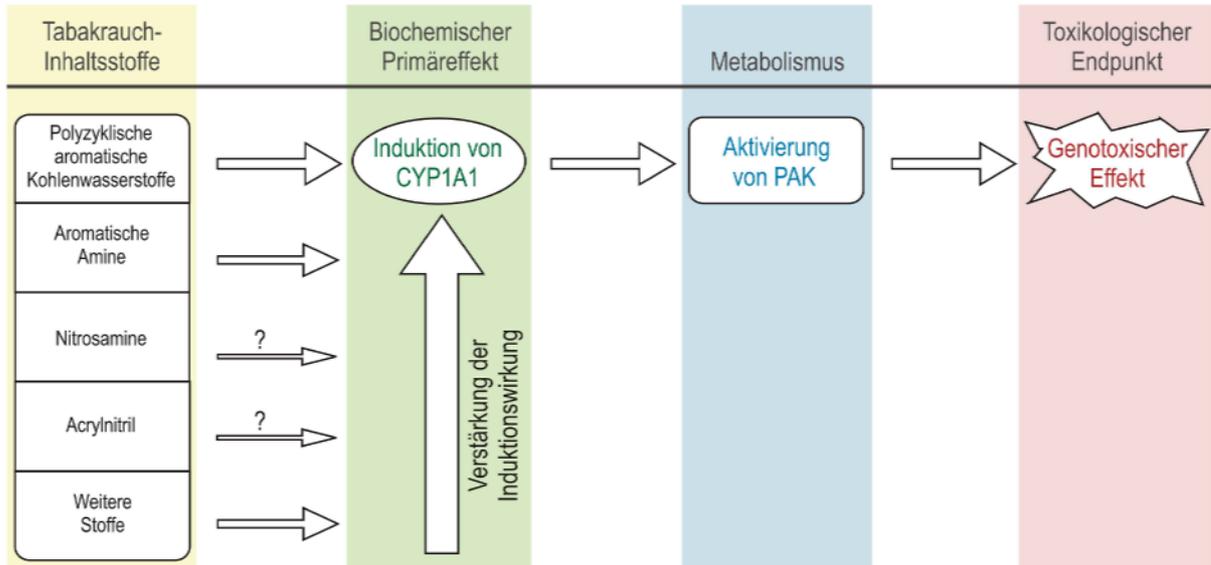
Eine chemische Analyse der Partikelphase des Hauptstromrauchs von „2R4F“-Zigaretten von CHEN & MOLDOVEANU (2003) ergab, dass pro abgerauchter Zigarette nach ISO-Standard 6,96 ng Benzo[a]pyren im Kondensat enthalten sind. Unter diesen Abrauchbedingungen werden laut Hersteller der Referenz-

zigarette 11,7 mg TPM pro Zigarette generiert (KENTUCKY TOBACCO RESEARCH & DEVELOPMENT CENTER 2003). Der Anteil an Benzo[a]pyren beträgt demnach ca. 0,6 ng/mg Zigarettenrauchkondensat (CSC). In 1 µg/ml Kondensat, das in dieser Arbeit verwendet wurde, waren somit ca. 2,4 pM B[a]P enthalten. Dieser Anteil liegt in einem Konzentrationsbereich, für den in Benzo[a]pyren-behandelten PUBEC mittels Durchflusszytometrie noch keine CYP1A1-Induktion gemessen wurde. Demnach können die gefundenen Induktions-Effekte für Inkubationsversuche mit 1 µg/ml Kondensat nicht auf B[a]P alleine zurückgeführt werden.

Von CHEN & MOLDOVEANU (2003) wurden insgesamt 15 polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe im Kondensat von „2R4F“-Standardzigaretten quantifiziert. Hierbei wurde jedoch nur eine Auswahl der im Zigarettenrauch vorhandenen PAK analysiert und nicht in allen Fällen zwischen möglichen Strukturisomeren unterschieden. Für die 15 analysierten PAK kommt man auf eine Gesamtmolarität – wenn die Anteile der PAK auf Benzo[a]pyren bezogen werden –, die bei ca. 260 – 300 pM liegt. CYP1A1-Induktion wurde jedoch erst ab 100 nM B[a]P in PUBEC nachgewiesen. Die Summe der analysierten PAK erklärt somit den gefundenen Induktionseffekt durch das Kondensat nicht. Bisher wurden ca. 90 verschiedene PAK-Grundstrukturen im Zigarettenrauch identifiziert (RODGMAN et al. 2000). Über die quantitativen Mengen ist bislang nichts bekannt. Zudem können die Mengen an gebildeten PAK zwischen verschiedenen Zigaretten, je nach Zusammensetzung des Tabaks und den Abrauchbedingungen, variieren. Legt man ca. 90 PAK für die Berechnung der Gesamtmolarität zu Grunde, käme man etwa auf einen Wert von ca. 1,6 – 1,8 nM. Eine deutliche Zunahme des Anteils CYP1A1-induzierter Zellen wurde jedoch, wie schon erwähnt, erst ab 100 nM B[a]P gefunden.

Im vorigen Abschnitt (siehe 4.2.2) wurde bereits diskutiert, dass Arylamine eine verstärkende Wirkung auf die CYP1A1-Induktion durch Benzo[a]pyren haben. Sie kommen somit in Frage, den gefundenen CYP1A1-Induktionseffekt durch das Zigarettenrauchkondensat zu erklären. Eine chemische Analyse des Zigarettenrauchs von 2R4F-Zigaretten zeigte, dass der Anteil an 4-ABP pro abgerauchter Zigarette zwischen 1,6 ng (SMITH et al. 2003) und 1,73 ng (CHEN & MOLDOVEANU 2003) liegt. Von SMITH et al. (2003) wurden insgesamt 17 aromatische Amine analysiert. Legt man die Werte aus deren Analyse für die Berechnung der Molarität von aromatischen Aminen im verwendeten Zigarettenrauchkondensat zugrunde, ergibt sich für 4-ABP eine Konzentration von ca. 0,14 ng/mg Zigarettenrauchkondensat (CSC). In 1 µg/ml CSC waren somit ca. 0,81 pM 4-ABP enthalten. Unter der Voraussetzung, dass sich alle im Zigarettenrauch analysierten aromatischen Amine ähnlich verhalten wie 4-ABP, ergibt sich für die 17 analysierten aromatischen Amine eine ungefähre Molarität von 240 pM. Unter der Voraussetzung, dass sich die Summe der analysierten PAK und AA so verhält wie die untersuchte Substanz B[a]P in Kombination mit 4-ABP, kann auch hierdurch der gefundene Induktionseffekt nicht erklärt werden. Die Gesamtmolarität beider Substanzklassen läge ungefähr bei 500 – 540 pM (15 analysierte PAK und 17 analysierte AA) bzw. 1,8 – 2 nM (ca. 90 PAK-Grundformen und 17 analysierte AA).

Mit Sicherheit geht ein Teil des gefundenen Induktionseffektes nach Behandlung mit CSC auf PAK im Zusammenspiel mit AA zurück. Insgesamt kann dieser Effekt aber nicht durch diese beiden Substanzklassen alleine erklärt werden. Offensichtlich wird die Induktion von CYP1A1 durch andere Zigarettenrauch-Inhaltsstoffe noch weiter verstärkt (Abb. 71).



**Abb. 71:** Schematische Darstellung zur Entstehung genotoxischer Effekte durch Zigarettenrauch-Inhaltsstoffe. Verschiedene Substanzen bzw. Substanzklassen verstärken die Induktion von CYP1A1 in Urothelzellen und damit die metabolische Aktivierung von kanzerogenen PAK.

### 4.3 Ausblick

Die Induktion von CYP1A1 in Urothelzellen durch Zigarettenrauch-Inhaltsstoffe ist offensichtlich ein wichtiger Mechanismus in Bezug auf die Beteiligung von PAK an der Tabakrauch-induzierten Blasenkanzerogenese. Der von WOLF et al. (2005) publizierte Befund der extrem starken Induktion von Cytochrom P450 1A1 auf mRNA-Ebene durch Benzo[a]pyren konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation auf Proteinebene bestätigt werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass dieser Induktionseffekt in PUBEC durch PAK in Kombination mit aromatischen Aminen noch weiter verstärkt wird. In Inkubationsexperimenten mit dem komplexen Gemisch Zigarettenrauchkondensat wurde ebenfalls eine deutliche Induktion von CYP1A1 gemessen. Diese fiel zwar absolut gesehen schwächer aus als durch die Inkubation mit Benzo[a]pyren alleine. In Bezug auf die Gesamtmolarität aller im Zigarettenrauch der Referenzzigarette analysierten aromatischen Amine und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe war der gefundene Induktionseffekt jedoch weder durch die PAK alleine noch durch PAK zusammen mit AA zu erklären. Offensichtlich sind verschiedene andere Substanzen im Zigarettenrauch für die Induktion von CYP1A1 verantwortlich (Abb. 71).

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Effekt der CYP1A1 Induktion in Urothelzellen durch Zigarettenrauch-Inhaltsstoffe kann vermutlich auch auf den Menschen übertragen werden. Zum einen wurde in einer Arbeit von LU und LI (2000) bereits gezeigt, dass CYP1A-Enzyme in humanen und Schweine-Hepatozyten *in vitro* durch gleiche Substrate induziert werden können, wobei die induzierte Enzymaktivität beim Schwein etwas schwächer war als beim Menschen (LU & LI 2001). Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass die cDNA, die für Cytochrom P450 1A1 codiert, beim Menschen und beim Schwein nur zu 75% homolog ist (SKAANILD 2006). Zum anderen liegen in der Zwischenzeit Hinweise vor, dass CYP1A1 in Urothelzellen von Rauchern induziert ist (DÖRRENHAUS et al. 2006). Bisher wurde der Induktion von CYP1A1 auf Proteinebene in Urothelzellen nur wenig Beachtung geschenkt, da auf mRNA-Ebene nur in einigen humanen Proben (exfoliierte Urothelzellen und Blasenbiopsien) CYP1A1-Expression nachgewiesen wurde (BRAUERS et al. 2000, ROOS et al. 2006). Als vermutlich für den Metabolismus von PAK relevantes CYP-Isoenzym im Urothel wurde bislang CYP1B1 angesehen (ROOS & BOLT 2005, ROOS et al. 2006). DÖRRENHAUS et al. (2006) konnten jedoch kürzlich in exfoliierten humanen Urothelzellen CYP1A1 auf Proteinebene nachweisen. In einer Studie mit 40 Personen, von denen die eine Hälfte Raucher und die andere Nichtraucher waren, wurde ein deutlicher Unterschied in der Anzahl CYP1A1-positiver Urothelzellen gefunden. Die durchschnittliche Anzahl CYP1A1-induzierter Zellen war bei Rauchern (44%) im Vergleich zu Nichtrauchern (6%) deutlich erhöht. Obwohl individuelle Unterschiede der prozentualen Anteile CYP1A1-induzierter Urothelzellen zwischen den verschiedenen Spendern gefunden wurden, war das Ergebnis statistisch signifikant (DÖRRENHAUS et al. 2006). Dieser neue Befund zeigt, dass das im Rahmen der vorliegenden Dissertation verwendete Zellkultursystem für die Untersuchung der krebserregenden Wirkung von PAK auf Zellen des Harnblasenepithels geeignet war.

Das Vorhandensein von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und aromatischen Aminen im Zigarettenrauchkondensat führt zu einer Hochregulation von CYP1A1 in Urothelzellen, wodurch es sekundär zu einer Verstärkung der metabolischen Aktivierung der PAK und damit zu verstärkten genotoxischen Effekten kommt. Allerdings sind PAK und AA offensichtlich nur zum Teil für die massive Induktion von CYP1A1 durch Zigarettenrauchkondensat in Urothelzellen verantwortlich. Es wäre von Interesse zu klären, welche weiteren Substanzen oder Substanzklassen aus dem Zigarettenrauch eine Beteiligung an diesem Induktionseffekt haben.

## 5 Zusammenfassung

Epidemiologische Studien belegen, dass das Zigarettenrauchen für den Menschen mit einem erhöhten Risiko assoziiert ist, an Harnblasenkrebs zu erkranken. Obwohl man weiß, dass Zigarettenrauch mindestens 70 krebserregende Substanzen enthält, ist bis heute nicht bekannt, welche dieser Kanzerogene in welchem Ausmaß für den harnblasenspezifischen Effekt verantwortlich sind. Insbesondere aromatischen Aminen, von denen einige Verbindungen nachgewiesenermaßen blasenkanzerogen für den Menschen sind, wird hierbei eine bedeutende Rolle zugesprochen. Aber auch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sind diesbezüglich von Bedeutung.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, herauszufinden, welchen Beitrag verschiedene Substanzklassen aus dem Zigarettenrauch, insbesondere PAK, zur Blasenkanzerogenese leisten. Für die Untersuchung ihrer genotoxischen Wirkungen in Zellen des Zielorgans wurde mit primären Zellkulturen aus Schweineharnblasen (PUBEC) gearbeitet. PUBEC bieten zum einen den Vorteil, metabolisch kompetent zu sein, und sind außerdem leicht verfügbar. Als Modellsubstanzen für die Untersuchungen wurden 4-Aminobiphenyl (4-ABP, aromatisches Amin), Benzo[a]pyren (B[a]P, polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff), Dimethylnitrosamin (DMN, Nitrosamin) und Acrylnitril (AN) verwendet. Zusätzlich zu den Wirkungen dieser Einzelsubstanzen wurden die Effekte eines binären (B[a]P und 4-ABP) und eines komplexen Gemisches (Zigarettenrauchkondensat, CSC) untersucht.

Die vorliegende Dissertation wurde im Rahmen eines Verbundprojektes mit dem Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund (MPI) durchgeführt. In parallel am MPI durchgeführten Versuchen zur Veränderung der Genexpression durch Zigarettenrauch-Inhaltsstoffe hatte sich bereits zu einem frühen Zeitpunkt gezeigt, dass nach Behandlung mit Benzo[a]pyren die Expression von Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) auf Transkriptebeine besonders stark gesteigert war. Andere Substanzen (4-ABP und DMN) hatten diesen Effekt auf die Regulation von CYP1A1 nicht. Ausgehend von diesem Befund wurde für die krebserregende Wirkung von PAK auf Urothelzellen das folgende Paradigma abgeleitet: Das Vorhandensein von PAK führt zu einer Hochregulation von CYP1A1, wodurch es sekundär zu einer Verstärkung der metabolischen Aktivierung von PAK und damit zu verstärkten genotoxischen Effekten kommt. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Dissertation Untersuchungen auf zwei verschiedenen Ebenen durchgeführt: Einerseits wurde die Induktion von CYP1A1 auf Proteinebene untersucht, um die auf der mRNA-Ebene beschriebenen Induktionseffekte zu verifizieren. Dazu wurde die CYP1A1-Induktion innerhalb einer Zellpopulation durch B[a]P, ein binäres Gemisch aus B[a]P und 4-ABP sowie durch das komplexe Gemisch CSC mittels Western Blot analysiert. Für den Nachweis der CYP1A1-Proteinexpression auf Einzelzellebene wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine durchflusszytometrische Methode etabliert, mit deren Hilfe der prozentuale Anteil CYP1A1-induzierter Zellen innerhalb einer Zellpopulation bestimmt wurde. Zum Zweiten wurde der Effekt der Bioaktivierung von PAK auf der Ebene genotoxischer Wirkungen untersucht. Dazu wurden Testsysteme ausgewählt, die

für kanzerogene PAK eine genotoxische Wirkung anzeigten, jedoch nicht für andere Kanzerogene, die ebenfalls im Zigarettenrauch enthalten sind, wie 4-ABP, DMN und AN. Zu diesem Zweck wurden der COMET Assay und der Mikronukleus-Test als Testsysteme eingesetzt.

Die Versuchsergebnisse der vorliegenden Dissertation konnten das Paradigma für die kanzerogene Wirkung von PAK auf Urothelzellen bestätigen. Auch auf Proteinebene führte die Behandlung von PUBEC mit B[a]P zur konzentrationsabhängigen Induktion von CYP1A1. Genotoxische Effekte von B[a]P wurden in den gleichen Konzentrationsbereichen detektiert, in denen auch CYP1A1 in PUBEC induziert wurde. Die genotoxische Wirkung von B[a]P nahm zeitabhängig zu, was vermutlich auf die kontinuierliche Bildung reaktiver Metaboliten durch CYP1A1 zurückzuführen war. Darüber hinaus wurden neben allgemeinen DNA-Strangbrüchen auch oxidative Basenmodifikationen durch B[a]P induziert. Weiterhin wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass der Induktionseffekt von B[a]P zusätzlich durch 4-ABP verstärkt wird. Eine Zunahme des genotoxischen Effektes über den von B[a]P hinaus wurde mit Hilfe des sensitiveren Genotoxizitätstests, dem Mikrokern-Test, nachgewiesen. In Inkubationsexperimenten mit dem komplexen Gemisch CSC wurden ebenfalls Induktion von CYP1A1 und genotoxische Wirkungen (allgemeine DNA-Strangbrüche sowie oxidative DNA-Schäden) im gleichen Konzentrationsbereich gemessen. Die durch CSC verursachten Effekte fielen absolut betrachtet schwächer aus als die durch B[a]P alleine. In Bezug auf die Gesamtmolarität aller PAK und aromatischer Amine, die in dem verwendeten CSC analysiert wurden, war der gefundene Induktionseffekt jedoch weder durch PAK alleine noch durch PAK zusammen mit aromatischen Aminen zu erklären.

PAK und aromatische Amine im Zigarettenrauchkondensat führen zu einer Hochregulation von CYP1A1 in Urothelzellen, wodurch es sekundär zu einer Verstärkung der Bioaktivierung der PAK und damit zu verstärkten genotoxischen Effekten kommt. Allerdings sind PAK und aromatische Amine offenbar nur zum Teil für die massive Induktion von CYP1A1 durch CSC in Urothelzellen verantwortlich. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um zu klären, welche weiteren Substanzen aus dem Zigarettenrauch eine Beteiligung an diesem Induktionseffekt haben. Insgesamt kann der beobachtete Effekt der CYP1A1 Induktion in Urothelzellen durch Zigarettenrauch-Inhaltsstoffe vermutlich auch auf den Menschen übertragen werden, da Hinweise vorliegen, dass CYP1A-Enzyme im Menschen und im Schwein *in vitro* durch gleiche Substrate induziert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Andrae, U. (1996). Genotoxizitätstests *in vitro*. In: Greim, H. & Deml, E. (Hrsg.): *Toxikologie*. VCH, Weinheim. 321 – 341.
- Annas, A., Brittebo, E. und Hellman, B. (2000). Evaluation of benzo(a)pyrene-induced DNA damage in human endothelial cells using alkaline single cell gel electrophoresis. *Mutation Research* 471: 145 – 155.
- Autrup, H., Grafstrom, R. C., Christensen, B. und Kieler, J. (1981). Metabolism of chemical carcinogens by cultured human and rat bladder epithelial cells. *Carcinogenesis* 2: 763 – 768.
- Babich, H. und Borenfreund, E. (1992). Neutral red assay for toxicology *in vitro*. In: Watson, R. R. (Hrsg.): *In vitro* methods of toxicology. CRC Press, Boca Raton, FL. 237 – 251.
- Bartsch, H., Malaveille, C., Firesen, M., Kadlubar, F. F. und Vineis, P. (1993). Black (air-cured) and blond (flue-cured) tobacco cancer risk IV: molecular dosimetry studies implicate aromatic amines as bladder carcinogens. *European Journal of Cancer* 29A: 1199 – 1207.
- Beland, F. A. und Kadlubar, F. F. (1986). Factors involved in the induction of urinary bladder cancer by aromatic amines. In: Hoffmann, D. und Harris, C. C. (Hrsg.): *Banbury Report 23: Mechanisms in Tobacco Carcinogenesis*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 315 – 326.
- Bitensky, L. (1963). The reversible activation of lysosomes in normal cells and the effects of pathological conditions. In: De Reuck, A. V. S. und Cameron, M. P. (Hrsg.): *Ciba Foundation Symposium on lysosomes*. Ciba, London. 362 – 375.
- Boiteux, S., O'Connor, T. R. und Laval, J. (1987). Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the *fpg* structural gene and overproduction of the protein. *EMBO Journal* 6: 3177 – 3183.
- Bonassi, S., Merlo, F., Perace, N. und Puntoni, R. (1989). Bladder cancer and occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Journal of Cancer* 44: 648 – 651.
- Borenfreund, E. und Puerner, J. A. (1984). A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of Tissue Culture Methods* 9: 7 – 9.

Boyle, P., Ariyaratne, M. A., Barrington, R., Bartelink, H., Bartsch, G., Berns, A., de Valeriola, D., Dinshaw, K. A., Eggermont, A. M., Gray, N., Kakizoe, T., Karki, B. S., Kaslar, M., Kerr, D. J., Khayat, D., Khuhaprema, T., Kim, I.-H., Martin-Moreno, J., McVie, G., Park, J.-G., Philip, T., Ringborg, U., Rodger, A., Seffrin, J. R., Semiglazov, V., Soo, K. C., Sun, Y. T., Thomas, R., Tursz, T., Veronesi, U., Wiestler, O., Yoo, K. Y., Zatonski, W. und Zhao, P. (2006). Tobacco: deadly in any form or disguise. *Lancet* 367: 1710 – 1712.

Brauers, A., Manegold, E., Buettner, R., Baron, J. M., Merk, H. F. und Jakse G. (2000). Cytochrome P450 isoenzyme mRNA expression pattern in human urinary bladder malignancies and normal urothelium. *Cancer Detection and Prevention* 24: 356 – 363.

Brennan, P., Bogillot, O., Cordier, S., Greiser, E., Schill, W., Vineis, P., Lopez-Abente, G., Tzonou, A., Chang-Claude, J., Bolm-Audorff, U., Jöckel, K.-H., Donato, F., Serra, C., Wahrendorf, J., Hours, M., T'Mannetje, A., Kogevinas, M. und Boffetta, P. (2000). Cigarette smoking and bladder cancer in men: A pooled analysis of 11 case-control studies. *International Journal of Cancer* 86: 289 – 294.

Brennan, P., Bogillot, O., Greiser, E., Chang-Claude, J., Wahrendorf, J., Cordier, S., Jöckel, K.-H., Lopez-Abente, G., Tzonou, A., Vineis, P., Donato, F., Hours, M., Serra, C., Bolm-Audorff, U., Schill, W., Kogevinas, M. und Boffetta, P. (2001). The contribution of cigarette smoking to bladder cancer in women (pooled European data). *Cancer Causes and Control* 12: 411 – 417.

Broccardo, C. J., Billings, R. E., Chubb, L. S., Andersen, M. E. und Hanneman, W. H. (2004). Single cell analysis of switch-like induction of CYP1A1 in liver cell lines. *Toxicological Sciences* 78: 287 – 294.

Bryant, M. S., Skipper, P. L., Tannenbaum, S. R. und Maclure, M. (1987). Hemoglobin adducts of 4-aminobiphenyl in smokers and non-smokers. *Cancer Research* 47: 602 – 608.

Buening, M. K., Wislocki, P. G., Levin, W., Yagi, H., Thakker, D. R., Akagi, H., Koreeda, M., Jerina, D. M. und Conney, A.H. (1978). Tumorigenicity of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides in newborn mice: exceptional activity of (+)-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75: 5358 – 5361.

Bulychev, A., Trouet, A. und Tulkens, P. (1978). Uptake and intracellular distribution of neutral red in cultured fibroblasts. *Experimental Cell Research* 115: 343 – 355.

- Butler, M. A., Iwasaki, M., Guengerich, F. P. und Kadlubar, F. F. (1989). Human cytochrome P-450<sub>PA</sub> (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86: 7696 – 7700.
- Byrd G. D., Fowler, K. W., Hicks, R. D., Lovette, M. E. und Borgerding, M. F. (1990). Isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in the determination of benzene, toluene, styrene and acrylonitrile in mainstream cigarette smoke. *Journal of Chromatography* 503: 359 – 368.
- Case, R. A. M., Hosker, M. E., McDonald, D. B. und Pearson, J. T. (1954). Tumors of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. Part I. The role of aniline, benzidine, alpha-naphthylamine, and beta-naphthylamine. *British Journal of Industrial Medicine* 11: 75 – 104.
- Chen, P. X. und Moldoveanu, S. C. (2003). Mainstream smoke chemical analyses for 2R4F Kentucky reference cigarette. *Beiträge zur Tabakforschung International* 20: 448 – 458.
- Collins, A. R., Duthie, S. J. und Dobson, V. L. (1993). Direct enzymatic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14: 1733 – 1735.
- Collins, A., Dušinská, M., Gedik, C. und Štětina, R. (1996). Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives* 104: 465 – 469.
- Collins, A. R., Dobson, V. L., Dušinská, M., Kennedy, G. und Štětina, R. (1997). The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research* 375: 183 – 193.
- Conney, A. H. (1982). Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes memorial lecture. *Cancer Research* 42: 4875 – 4917.
- Cooper, R. L., Lindsey, A. J. und Waller, R. E. (1954). The presence of 3,4-benzopyrene in cigarette smoke. *Chemistry and Industry* 46: 1418.
- Countryman, P. I. und Heddle, J. A. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research* 41: 321 – 332.
- Darrall, K. G., Figgins, J. A., Brown, R. D. und Phillips, G. F. (1998). Determination of benzene and associated volatile compounds in mainstream cigarette smoke. *Analyst* 123: 1095 – 1101.

- Degen, G. H., Schlattjan, J. H., Mähler, S., Föllmann, W. und Golka, K. (2004). Comparative metabolic activation of benzidine and *N*-acetylbenzidine by prostaglandin H synthase. *Toxicology Letters* 151: 135 – 142.
- DeMarini, D. M. (2004). Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutation Research* 567: 447 – 474.
- Djordjevic, M. V., Hoffmann, D. und Hoffmann, I. (1997). Nicotine regulates smoking pattern. *Preventive Medicine* 26: 435 – 440.
- Dolin, P. J. (1991). An epidemiological review of tobacco use and bladder cancer. *Journal of Smoking-Related Diseases* 2: 129 – 143.
- Dörrenhaus, A., Müller, T. und Roos, P. H. (2006). Increased CYP1A1 expression in human exfoliated cells of cigarette smokers compared to non-smokers. *Archives of Toxicology* DOI: 10.1007/s00204-006-0134-9).
- Eisenbrand, G. und Köhl, W. (1997). N-Nitrosoverbindungen. In: Marquardt, H. und Schäfer, S. G. (Hrsg.): *Lehrbuch der Toxikologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 481 – 491.
- Eisenstadt, E., Warren, A. J., Porter, J., Atkins, D. und Miller, J. H. (1982). Carcinogenic epoxides of benzo[*a*]pyrene and cyclopenta[*cd*]pyrene induce base substitutions via specific transversions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 79: 1945–1949.
- Fennell, T. R., MacNeela, J. P., Morris, R. W., Watson, M., Thompson, C. L. und Bell, D. A. (2000). Hemoglobin adducts from acrylonitrile and ethylene oxide in cigarette smokers: effects of glutathione S-transferase T1-null and M1-null genotypes. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 9: 705 – 712.
- Fielding, S., Short, C., Davies, K., Wald, N., Bridges, B. A. und Waters, R. (1989). Studies on the ability of smoke from different types of cigarettes to induce single-strand breaks in cultured human cells. *Mutation Research* 214: 147 – 151.
- Filman, D. J., Brawn, R. J. und Dandliker, W. B. (1975). Intracellular supravital stain delocalization as an assay for antibody-dependent complement-mediated cell damage. *Journal of Immunological Methods* 6: 189 – 201.
- Flowers, L., Bleczyński, W. F., Burczynski, M. E., Harvey, R. G. und Penning, T. M. (1996). Disposition and biological activation of benzo[*a*]pyrene-7,8-dione. A genotoxic metabolite generated by dihydrodiol dehydrogenase. *Biochemistry* 35: 13664 – 13672.

- Flowers, L., Ohnishi, S. T. und Penning, T. M. (1997). DNA strand scission by polycyclic aromatic hydrocarbon *o*-quinones: role of reactive oxygen species, Cu(II)/Cu(I) redoxcycling, and *o*-semiquinone anion radicals. *Biochemistry* 36: 8640 – 8648.
- Flowers-Geary, L., Harvey, R. G. und Penning, T. M. (1992). Examination of diols and diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons as substrates for rat liver dihydrodiol dehydrogenase. *Chemical Research in Toxicology* 5: 576 - 583.
- Flowers-Geary, L., Harvey, R. G. und Penning, T. M. (1993). Cytotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon *o*-quinones in rat and human hepatoma cells. *Chemical Research in Toxicology* 6: 252 – 260.
- Flowers-Geary, L., Bleczinski, W., Harvey, R. G. und Penning, T. M. (1996). Cytotoxicity and mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones produced by dihydrodiol dehydrogenase. *Chemico-Biological Interactions* 99: 55 – 72
- Föllmann, W., Guhe, C., Mähler, S. und Bolt, H. M. (2000). Cultured porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) as a screening model for genotoxic effects of aromatic amines: Characterization and application of the cell culture model. *Alternatives to Laboratory Animals* 28: 833 – 854.
- Gelboin, H. V. (1980). Benzo[a]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiological Reviews* 60: 1107 – 1166.
- Golka, K., Prior, V., Blaszkewicz, M. und Bolt, H. M. (2002). The enhanced bladder cancer susceptibility of NAT2 slow acetylators towards aromatic amines: a review considering ethnic differences. *Toxicology Letters* 128: 229 – 241.
- Green, C. R. und Rodgman, A. (1996). The tobacco chemists' research conference: a half century forum for advances in analytical methodology of tobacco and its products. *Recent Advances in Tobacco Science* 22: 131 – 304.
- Green, L. C., Skipper, P. L., Turesky, R. J, Bryant, M. S. und Tannenbaum, S. R. (1984). *In vivo* dosimetry of 4-aminobiphenyl in rats via a cysteine adduct in hemoglobin. *Cancer Research* 44: 4254 – 4259.
- Grimmer, J., Dettbarn, G., Seidel, A. und Jacob, J. (2000). Detection of aromatic amines in the urine of non-smokers. *Science of the Total Environment* 247: 81 – 90.
- Guengerich, F. P. (2001). Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical Research in Toxicology* 14: 611 – 650.

Guengerich, F. P. und Shimada, T. (1991). Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P450 enzymes. *Chemical Research in Toxicology* 4: 391 – 407.

Guengerich, F. P., Geiger, L. E., Hogg, L. L. und Wright, P. L. (1981). In vitro metabolism of acrylonitrile to 2-cyanoethylene oxide, reaction with glutathione, and irreversible binding to proteins and nucleic acids. *Cancer Research* 41: 4925 – 4933.

Guhe, C. und Föllmann, W. (1994). Growth and characterization of porcine urinary bladder epithelial cells *in vitro*. *American Journal of Physiology* 266: F298 – F308.

Guhe, C., Degen, G. H., Schuhmacher, U. S., Kiefer, F. und Föllmann, W. (1996). Drug metabolizing enzyme activities in porcine urinary bladder epithelial cell cultures (PUBEC). *Archives of Toxicology* 70: 599 – 606.

Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57 – 70.

Hanelt, S., Helbig, R., Hartmann, A., Lang, M., Seidel, A. und Speit, G. (1997). A comparative investigation of DNA adducts, DNA strand breaks and gene mutations induced by benzo[a]pyrene and ( $\pm$ )-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells. *Mutation Research* 390: 179 – 188.

Hankinson, O. (1995). The arylhydrocarbon receptor complex. *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology* 35: 307 – 330.

Hecht, S. S. (1999). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 91: 1194 – 1210.

Hecht, S. S. (2003). Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews Cancer* 3: 733 – 744.

Hein, D. W. (1988). Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 948: 37 – 66.

Hein, D. W. (2002). Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutation Research* 506 - 507:65 - 77.

Hein, D. W., Doll, M. A., Fretland, A. J., Leff, M. A., Webb, S. J., Xiao, G. H., Devanaboyina, U.-S., Nangju, N. A. und Feng, Y. (2000). Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 9: 29 – 42.

Hill, J. (1761). Cautions against the immoderate use of snuff. Baldwin & Jackson, London. 27 – 38.

- Hoffmann, D. und Hoffmann, I. (1997). The changing cigarette, 1950 – 1995. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 50: 307 – 364.
- Hoffmann, D. und Wynder, E. L. (1997). Aktives und passives Rauchen. In: Marquardt, H. und Schäfer, S. G. (Hrsg.): *Lehrbuch der Toxikologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 589 – 605.
- Hoffmann, D., Masuda, Y. und Wynder, E. L. (1969).  $\alpha$ -naphthylamine and  $\beta$ -naphthylamine in cigarette smoke. *Nature* 221: 254 – 256.
- Hoffmann, D., Schmeltz, I., Hecht, S. S. und Wynder, E. L. (1978). Tobacco carcinogenesis. In: Gelboin, H. V. und Ts'o, P. O. P. (Hrsg.): *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer* 1. Environment, chemistry, and metabolism. Academic Press, New York, NY. 85 – 117.
- Hoffmann, D., Hoffmann, I. und El-Bayoumy, K. (2001). The less harmful cigarette: a controversial issue, a tribute to Ernst L. Wynder. *Chemical Research in Toxicology* 14: 767 – 790.
- Huber, G. L. und Pandina, R. J. (1997). The economics of tobacco use. In: Bollinger, C. T. und Fagerström, K. O. (Hrsg.): *The tobacco epidemic. Progress in Respiratory Research* 28. Karger, Basel. 12 – 63.
- IARC (1972). International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: *Some Inorganic Substances, Chlorinated Hydrocarbons, Aromatic Amines, N-Nitroso Compounds, and Natural Products*. Band 1. IARC Press, Lyon. 184 Seiten.
- IARC (1986). International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: *Tobacco Smoking*. Band 38. IARC Press, Lyon. 421 Seiten.
- IARC (1987). International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans Overall Evaluations of Carcinogenicity: *An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42*. Supplement 7. IARC Press, Lyon. 440 Seiten.
- IARC (2004). International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: *Tobacco Smoke and Involuntary Smoking*. Band 83. IARC Press, Lyon. 1452 Seiten.
- Imaoka, S., Yoneda, Y., Matsuda, T., Degawa, M., Fukushima, S. und Funae, Y. (1997). Mutagenic activation of urinary bladder carcinogens by CYP4B1 and the presence of CYP4B1 in bladder mucosa. *Biochemical Pharmacology* 54: 677 – 683.

Ishidate, Jr., M., Harnois, M. C. und Sofuni, T. (1988). A comparative analysis of the data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures. *Mutation Research* 195: 151 – 213.

Johansson, S. L. und Cohen, S. M. (1997). Epidemiology and etiology of bladder cancer. *Seminars in Surgical Oncology* 13: 291 – 298.

Johns, L. E. und Houlston, R. S. (2000). Glutathione S-transferase  $\mu$ 1 (GSTM1) status and bladder cancer risk: a meta-analysis. *Mutagenesis* 15: 399 – 404.

Kadlubar, F. F. und Badawi, A. F. (1995). Genetic susceptibility and carcinogen-DNA adduct formation in human urinary bladder carcinogenesis. *Toxicology Letters* 82 – 83: 627 – 632.

Kadlubar, F. F., Miller, J. A. und Miller, E. C. (1977). Hepatic microsomal N-glucuronidation and nucleic acid binding of N-hydroxy arylamines in relation to urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Research* 37: 805 – 814.

Kentucky Tobacco Research & Development Center (2003). In: Davies, H. M. und Vaught, A. (Hrsg.): *The Reference Cigarette*. The University of Kentucky Printing Services, Lexington, KY. 8 Seiten.

Kim, J. H., Stansbury, K. H., Walker, N. J., Trush, M. A., Strickland, P. und Sutter, T. R. (1998). Metabolism of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis* 19: 1847 – 1853.

Krebs in Deutschland (2006). 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken. 108 Seiten.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 – 685.

Lang, M. und Pelkonen, O. (1999). Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. *IARC Scientific Publications* 148:13 – 22.

Langenbach, R., Malick, L. und Nesnow, S. (1981). Rat bladder cell-mediated mutagenesis of Chinese hamster V79 cells and metabolism of benzo[a]pyrene. *Journal of the National Cancer Institute* 66: 913 – 917.

Leanderson, P. und Tagesson, C. (1990). Cigarette smoke-induced DNA-damage: role of hydroquinone and catechol in the formation of the oxidative DNA-adduct, 8-hydroxydeoxyguanosine. *Chemico-Biological Interactions* 75: 71 – 81.

- Leanderson, P. und Tagesson, C. (1992). Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human cells: role of hydroxyl radicals and endonuclease activation, *Chemico-Biological Interactions* 81: 197 – 208.
- Léonard, A., Gerber, G. B., Stecca, C., Rueff, J, Borba, H., Farmer, P. B., Sram, R. J., Czeizel, A. E. und Kalina, I. (1999). Mutagenicity, carcinogenicity, and teratogenicity of acrylonitrile. *Mutation Research* 436: 263 – 283.
- Lu, C. und Li, A. P. (2001). Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone, omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Spreague-Dawley rats, minipig, and beagle dog. *Chemico-Biological Interactions* 134: 271 – 281.
- Luceri, F., Pieraccini, G., Moneti, G. und Dolara, P. (1993). Primary aromatic amines from side-stream cigarette smoke are common contaminants of indoor air. *Toxicology and Industrial Health* 9: 405 – 413.
- Ma, Q. (2001). Induction of CYP1A1. The Ahr/DRE paradigm: transcription, receptor regulation, and expanding biological roles. *Current Drug Metabolism* 2: 149 – 164.
- Mackay, J. und Eriksen, M. (2002). *The Tobacco Atlas*. World Health Organization, Genf. 128 Seiten.
- Mähler, S., Kinne-Saffran, E., Fujisue, H., Kinne, R. K. und Föllmann, W. (1998). Regulation of sorbitol content in cultured porcine urinary bladder epithelial cells. *American Journal of Physiology* 274: F342 – F347.
- Mastrangelo, G., Fadda, E. und Marzia. V. (1996). Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environmental Health Perspectives* 104: 1166 – 1170.
- Matsuoka, A., Yamazaki, N., Suzuki, T., Hayashi, M. und Sofuni, T. (1992). Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional in vitro chromosomal aberration test. *Mutation Research* 272: 223 – 236.
- Matsuoka, A., Matsuura, K., Sakamoto, H., Hayashi, M. und Sofuni, T. (1999). A proposal for a simple way to distinguish aneugens from clastogens in the *in vitro* micronucleus test. *Mutagenesis* 14: 385 – 389.
- Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M., Kunihiro, J., Miura, F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. und Sofuni, T. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis* 14: 569 – 580.

- Miller, A. D. (1990). Flow cytometric techniques for measurement of cytochrome P-450 activity in viable cells. *Methods in Cell Biology* 33: 71 – 79.
- Miller, A. G. und Whitlock, Jr., J. P. (1981). Novel variants in benzo(a)pyrene metabolism, Isolation by fluorescence-activated cell sorting. *Journal of Biological Chemistry* 256: 2433 – 2437.
- Miller, A. G. und Whitlock, Jr., J. P. (1982a). Heterogeneity in the rate of benzo[a]pyrene metabolism in single cells: quantitation using flow cytometry. *Molecular and Cellular Biology* 2: 625 – 632.
- Miller, A. G. und Whitlock, Jr., J. P. (1982b). Efficient metabolism of benzo(a)pyrene at nanomolar concentrations by intact murine hepatoma cells. *Cancer Research* 42: 4473 – 4478.
- Miller, A. G., Israel, D. und Whitlock, Jr., J. P. (1983). Biochemical and genetic analysis of variant mouse hepatoma cells defective in the induction of benzo(a)pyrene-metabolizing enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 258: 3523 – 3527.
- Montesano, R. und Magee, P. N. (1970). Metabolism of dimethylnitrosamine by human liver slices *in vitro*. *Nature* 228: 173 – 174.
- Nakayama, T., Kaneko, M., Kodama, M. und C. Nagata, C. (1985). Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells. *Nature* 314: 462 – 464.
- Nemes, Z., Dietz, R., Lüth, J. B., Gomba, S., Hackenthal, E. und Gross, F. (1979). The pharmacological relevance of vital staining with neutral red. *Experientia* 35:1475 – 1476.
- Ostling, O. und Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123: 291 – 298.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. und Pisani, P. (2001). Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *International Journal of Cancer* 94: 153 – 156.
- Patrianakos, C. und Hoffmann, D. (1979). Chemical studies on tobacco smoke LXIV, on the analysis of aromatic amines in cigarette smoke. *Journal of Analytical Toxicology* 3: 150 – 154.
- Pesch, B., Haerting, J., Ranft, U., Klimpel, A., Oelschlägel, B. und Schill, W. (2000). Occupational risk factors for urothelial carcinoma: agent-specific results from a case-control study in Germany. MURC Study Group. Multicenter Urothelial and Renal Cancer. *International Journal of Epidemiology* 29: 238 – 247.
- Peter, H., Appel, K. E., Berg, R. und Bolt, H. M. (1983). Irreversible binding of acrylonitrile to nucleic acids. *Xenobiotica* 13: 19 – 25.

- Philips, D. H. (1983). Fifty years of benzo(a)pyrene. *Nature* 303: 468 – 472.
- Philips, D. H. (2002). Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis* 23: 1979 – 2004.
- Pieraccini, G., Luceri, F. und Moneti, G. (1992). New gas-chromatographic/mass spectrometric method for the quantitative analysis of primary aromatic amines in main- and side-stream cigarette smoke. I. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 6: 406 – 409.
- Poupko, J. M., Hearn, W. L. und Randski, J. L. (1979). N-Glucuronidation of N-hydroxy aromatic amines: a mechanism for their transport and bladder-specific carcinogenicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 50: 479 – 484.
- Proctor, R. N. (2001). Tobacco and the global lung cancer epidemic. *Nature Reviews Cancer* 1: 82 – 86.
- Recio, L. und Skopek, T. R. (1988). Mutagenicity of acrylonitrile and its metabolite 2-cyanoethylene oxide in human lymphoblasts in vitro. *Mutation Research* 206: 297 – 305.
- Rehn, L. (1895). Blasengeschwülste bei Fuchsin-Arbeitern. *Archiv für klinische Chirurgie* 50: 588 – 600.
- Rhoades, J. W. und Johnson, D. E. (1972). N-dimethylnitrosamine in tobacco smoke condensate. *Nature* 236: 307 – 308.
- Rodgman, A., Smith, C. J. und Perfetti, T. A. (2000). The composition of cigarette smoke: a retrospective, with emphasis on polycyclic components. *Human & Experimental Toxicology* 19: 573 – 595.
- Roemer, E., Stabbert, R., Rustemeier, K., Veltel, D. J., Meisgen, T. J., Reininghaus, W., Carchman, R. A., Garowski, G. L. und Podraza, K. F. (2004). Chemical composition, cytotoxicity and mutagenicity of smoke from US commercial and reference cigarettes smoked under two sets of machine smoking conditions. *Toxicology* 195: 31 – 52.
- Roos, P. H. (2002). Differential induction of CYP1A1 in duodenum, liver and kidney of rats after oral intake of soil contaminating polycyclic aromatic hydrocarbons. *Archives of Toxicology* 76: 75 – 82.
- Roos, P. H. und Bolt, H. M. (2005). Cytochrome P450 interactions in human cancers: new aspects considering CYP1B1. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 1: 187 – 202.

- Roos, P. H., Belik, R., Föllmann, W., Degen, G. H., Knopf, H. J., Bolt, H. M. und Golka, K. (2006). Expression of cytochrome P450 enzymes CYP1A1, CYP1B1, CYP2E1 and CYP4B1 in cultured transitional cells from specimens of the human urinary tract and from urinary sediments. *Archives of Toxicology* 80: 45 – 52.
- Rothman, N., Talaska, G., Hayes, R. B., Bhatnagar, V. K., Bell, D. A., Lakshmi, V. M., Kashyap, S. K., Dosemeci, M., Kashyap, R., Hsu, F. F., Jaeger, M., Hirvonen, A., Parikh, D. J., Davis, B. B. und Zenser, T.V. (1997). Acidic urine pH is associated with elevated levels of free urinary benzidine and N-acetylbenzidine and urothelial cell DNA adducts in exposed workers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 6: 1039 – 1042.
- Rübben, H. und Otto, T. (2001). Harnblasenkarzinom. In: Rübben, H. (Hrsg.): Uroonkologie. 3. Aufl. Springer, Heidelberg. 85 – 168.
- Ruggeri, B., DiRado, M., Zhang, S. Y., Bauer, B., Goodrow, T., und Klein-Szanto, A. J. (1993). Benzo[a]pyrene-induced murine skin tumors exhibit frequent and characteristic G to T mutations in the p53 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90: 1013–1017.
- Sarkar, M. A., Nseyo, U. O. und Zhong, B.-Z. (2002). Mutagenic outcome of the urinary carcinogen 4-aminobiphenyl is increased in acidic pH. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11: 23 – 26.
- Sasco, A. J., Secretan M. B. und Straif, K. (2004). Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer* 45 (Supplement 2): S3 – S9.
- Sims, P., Grover, P.L., Swaisland, A., Pal, K. und Hewer, A. (1974). Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature* 252: 326 – 328.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. und Schneider, E. L., (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175: 184 – 191.
- Skaanild, M. T. (2006). Porcine cytochrome P450 and metabolism. *Current Pharmaceutical Design* 12: 1421 – 1427.
- Slade, J. (1997). Historical notes on tobacco. In: Bollinger, C. T. und Fagerström, K. O. (Hrsg.): The tobacco epidemic. *Progress in Respiratory Research* 28. Karger, Basel. 1 – 11.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76 – 85.

- Smith, C. J., Livingston, S. D. und Doolittle, D. J. (1997). An international literature survey of "IARC group I carcinogens" reported in mainstream cigarette smoke. *Food and Chemical Toxicology* 35: 1107 – 1130.
- Smith, C. J., Perfetti, T. A., Rumble, M. A, Rodgman, A. und Doolittle, D. J. (2000). "IARC group 2A carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food and Chemical Toxicology* 38: 371 – 383.
- Smith, C. J., Perfetti, T. A., Rumble, M. A, Rodgman, A. und Doolittle, D. J. (2001). "IARC group 2B carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food and Chemical Toxicology* 39: 183 – 205.
- Smith, C. J., Dooly, G. L. und Moldoveanu, S. C. (2003). New technique using solid-phase extraction for the analysis of aromatic amines in mainstream cigarette smoke. *Journal of Chromatography A* 991: 99 – 107.
- Smithgall, T. E., Harvey, R. G. und Penning, T. M. (1988). Spectroscopic identification of ortho-quinones as the products of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol oxidation catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. A potential route of proximate carcinogen metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 263: 1814 - 1820.
- Sömmering, S. T. (1795). De morbis vasorum absorbentium corporis humani. Varrentrapp & Wenner, Frankfurt/Main. 109.
- Speit, G. und Hartmann, A. (1999). The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods in Molecular Biology* 113: 203 – 212.
- Speit, G., Hanelt, S., Helbig, R., Seidel, A. und Hartmann, A. (1996). Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. *Toxicology Letters* 88: 91 – 98.
- Stabbert, R., Schäfer, K.-H., Biefel, C. und Rustemeier, K. (2003). Analysis of aromatic amines in cigarette smoke. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17: 2125 – 2132.
- Stoner, G. D., Daniel, F. B., Schenck, K. M., Schut, H. A. J., Goldblatt, P. J. und Sandwisch, D. W. (1982). Metabolism and DNA binding of benzo[a]pyrene in cultured human bladder and bronchus. *Carcinogenesis* 3: 195 – 201.
- Talaska, G., Schamer, M., Skipper, P., Tannenbaum, S., Caporaso, N., Unruh, L., Kadlubar, F. F., Bartsch, H., Malaveille, C. und Vineis, P. (1991). Detection of carcinogen-DNA adducts in exfoliated urothelial cells of cigarette smokers: association with smoking, hemoglobin adducts, and urinary mutagenicity. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1: 61 – 66.

Tavares, R., Borba, H., Monteiro, M., Proença, M. J., Lynce, N., Rueff, J., Bailey, E., Sweetman, G. M. A., Lawrence, R. M. und Farmer, P. B. (1996). Monitoring of exposure to acrylonitrile by determination of N-(2-cyanoethyl)valine at the N-terminal position of haemoglobin. *Carcinogenesis* 17: 2655 – 2660.

Thakker, D. R., Yagi, H., Lu, A. Y., Levin, W. und Conney, A. H. (1976). Metabolism of benzo[a]pyrene: conversion of ( $\pm$ )-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene to highly mutagenic 7,8-diol-9,10-epoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 73: 3381 - 3385.

Thier, R., Lewalter, J., Kempkes, M., Selinski, S., Brüning, T. und Bolt, H. M. (1999). Haemoglobin adducts of acrylonitrile and ethylene oxide in acrylonitrile workers, dependent on polymorphisms of the glutathione transferases GSTT1 and GSTM1. *Archives of Toxicology* 73: 197 – 202.

Thier, R., Lewalter, J. und Bolt, H. M. (2000). Species differences in acrylonitrile metabolism and toxicity between experimental animals and humans based on observations in human accidental poisoning. *Archives of Toxicology* 74: 184 – 189.

Thier, R., Lewalter, J., Selinski, S. und Bolt, H. M. (2001). Re-evaluation of the effect of smoking on the methylation of N-terminal valine in haemoglobin. *Archives of Toxicology* 75: 270 – 273.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C. und Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 206 – 221.

Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 4350 – 4354.

Tsuneoka, Y., Dalton, T. D., Miller, M. L., Clay, C. D., Shertzer, H. G., Talaska, G., Medvedovic, M. und Nebert, D. W. (2003). 4-aminobiphenyl-induced liver and urinary bladder DNA adduct formation in Cyp1a2(-/-) and Cyp1a2(+/-) mice. *Journal of the National Cancer Institute* 95: 1227 – 1237.

Turesky, R. J., Constable, A., Richoz, J., Varga, N., Markovic, J., Martin, M. V. und Guengerich, F. P. (1998). Activation of heterocyclic aromatic amines by rat and human liver microsomes and by purified rat and human cytochrome P450 1A2. *Chemical Research in Toxicology* 11: 925 – 936.

Uhl, M., Helma, C. und Knasmüller, S. (1999). Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (Hep G2) cells. *Mutation Research* 441: 215 – 224.

Uhl, M., Helma, C. und Knasmüller, S. (2000). Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. *Mutation Research* 468: 231 – 225.

Valentin-Severin, I., Le Hegarat, L., Lhuguenot, J. C., Le Bon, A. M. und Chagnon, M. C. (2003). Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutation Research* 536: 79 – 90.

Vaziri, S. A., Hughes, N. C., Sampson, H., Darlington, G., Jewett, M. A. und Grant, D. M. (2001). Variation in enzymes of arylamine procarcinogen biotransformation among bladder cancer patients and control subjects. *Pharmacogenetics* 11: 7 – 20.

Vineis, P. (1991). Black (air-cured) and blond (flue-cured) tobacco and cancer risk I: bladder cancer. *European Journal of Cancer* 27: 1491 – 1493.

Weinstein, I. B., Jeffrey, A. M., Jennette, K. W., Blobstein, S. H., Harvey, R. G., Harris, C., Autrup, H., Kasai, H. und Nakanishi, K. (1976). Benzo(a)pyrene diol epoxides as intermediates in nucleic acid binding in vitro and in vivo. *Science* 193: 592 – 595.

Whitlock, Jr, J. P. (1989). The control of cytochrome P-450 gene expression by dioxin. *Trends in Pharmacological Sciences* 10: 285 – 288.

Whitlock, Jr., J. P. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology* 39: 103 – 125.

Whysner, J., Ross, P. M., Conaway, C. C., Verna, L. K. und Williams, G. M. (1998). Evaluation of possible genotoxic mechanisms for acrylonitrile tumorigenicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 27: 217 – 239.

Wilkening, S., Stahl, F. und Bader, A. (2003). Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metabolism and Disposition* 31: 1035 – 1042.

Wolf, A. E. H. (2003). Entwicklung eines Nachweissystems zur Quantifizierung ausgewählter Gentranskripte aus Zellkulturmaterial sowie für krebsrelevante Punktmutationen in Marker-Genen. Dissertation an der Fakultät für Chemie der Ruhr-Universität Bochum. 164 Seiten.

Wolf, A., Kutz, A., Plöttner, S., Behm, C., Bolt, H. M., Föllmann, W. und Kuhlmann, J. (2005). The effect of benzo(a)pyrene on porcine urinary bladder epithelial cells analyzed for the expression of selected genes and cellular toxicological endpoints. *Toxicology* 207: 255 – 269.

Wu, X.-J., Lu, W.-Q. und Mersch-Sundermann, V. (2003). Benzo[a]pyrene induced micronucleus formation was modulated by persistent organic pollutants (POPs) in metabolically competent human HepG2 cells. *Toxicology Letters* 144: 143 – 150.

Wu, H.-J., Chi, C.-W. und Liu, T.-Y. (2005). Effects of pH on nicotine induced DNA-damage and oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 68: 1511 – 1523.

Yang, C. S., Yoo, J.-S. H., Ishizaki, H. und Hong, J. (1990). Cytochrome P450IIE1: roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug Metabolism Reviews* 22: 147 – 159.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

3-MC	3-Methylcholanthren
4-ABP	4-Aminobiphenyl
8-oxoG	8-Oxoguanin
AA	aromatische/s Amin/e
Abb.	Abbildung
AhR	Arylhydrocarbon Rezeptor ( <i>arylhydrocarbon receptor</i> )
AN	Acrylnitril
AP	apurinisch/apyrimidinisch
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	Arylhydrocarbon Rezeptor nukläerer Translokator ( <i>arylhydrocarbon receptor nuclear translocator</i> )
B[a]P	Benzo[a]pyren
BCA	Bicinchoninsäure ( <i>bicinchoninic acid</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
COX	Cyclooxygenase
CP	Cyclophosphamid
CSC	Zigarettenrauchkondensat ( <i>cigarette smoke condensate</i> )
CYP	Cytochrom P450
DMN	Dimethylnitrosamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )
EH	Epoxidhydrolase
FACS	Durchflusszytometer ( <i>fluorescence activated cell scanner</i> )
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL1/FL2	Fluoreszenzkanal 1 bzw. 2 im Durchflusszytometer
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
FSC	Vorwärtsstreulicht ( <i>forward scatter</i> )
FTC	<i>US Federal Trade Commission</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde

---

IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IgG	Immunglobulin G
ISO	<i>International Organisation on Standardisation</i>
KDI	Kaliumdichromat
LMP	<i>low melting point</i>
min	Minute/n
MMS	Methylmethansulfonat
MN	Mikronukleus/Mikronuklei
NAT	N-Acetyltransferase
NNK	N-Nitrosornikotin
NNN	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese ( <i>polyacrylamid gel electrophoresis</i> )
PAK	polyzyklische/r aromatische/r Kohlenwasserstoff/e
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PUBEC	Schweineharnblasenepithelzelle/n ( <i>porcine urinary bladder epithelial cell</i> )
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-RT-PCR	Echtzeit-Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion ( <i>real time-reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i> )
s	Sekunde/n
S9	Überstand nach Zentrifugation bei 9000 g ( <i>supernatant 9000 g</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SSC	Seitwärtsstreulicht ( <i>side scatter</i> )
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TI	Tail Intensität (% der DNA im Kometenschweif)
TL	Tail Länge
TM	Tail Moment
TPM	Gesamtpartikelmasse ( <i>total particulate matter</i> )
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
v/v	Volumenprozent ( <i>volume/volume</i> )
VCR	Vincristin
w/v	Gewichtsprozent ( <i>weight/volume</i> )

## 7.2 Weitere Testergebnisse

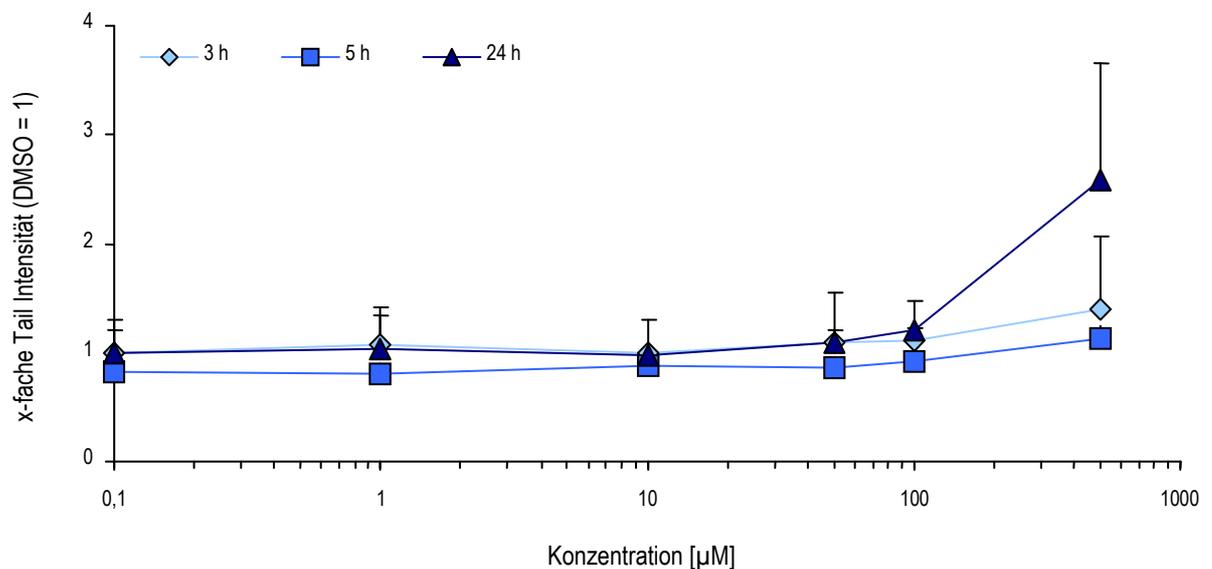
Unter den folgenden Punkten sind weitere Ergebnisse aus dem COMET Assay und dem Mikronukleus-Test aufgeführt, die im Ergebnisteil erwähnt, aber nicht quantitativ dargestellt wurden.

### 7.2.1 Weitere COMET Assay Ergebnisse

Im Folgenden sind weitere COMET Assay Ergebnisse aufgeführt, die mit Hilfe der konventionellen (alkalischen) Methode gewonnen und nicht im Ergebnisteil dargestellt wurden.

#### 7.2.1.1 COMET Assay Ergebnisse für 4-Aminobiphenyl

Zum besseren Vergleich der Daten untereinander sind in Abb. A72 die auf die jeweilige Lösemittelkontrolle bezogenen Tail Intensitäten der einzelnen Versuche dargestellt. Bis zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  4-ABP lagen die Ergebnisse für alle Inkubationszeiten im Bereich der DMSO-Kontrolle. Auch bei dieser Darstellungsweise bestätigt sich, dass nach 24 h langer Behandlung nur für 500  $\mu\text{M}$  4-ABP deutlich vermehrt DNA-Schäden gefunden wurden.

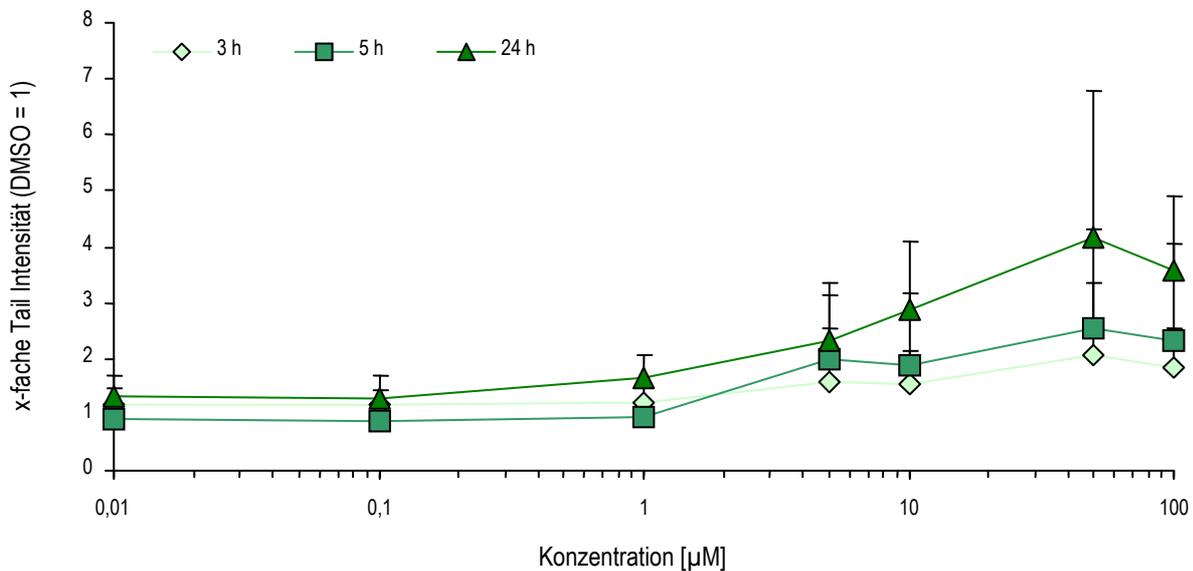


**Abb. A72:** COMET Assay Ergebnisse für die Inkubation mit 4-ABP (3 h, 5 h und 24 h). Die Tail Intensitäten für jeden Versuch wurden auf die entsprechende DMSO-Kontrolle bezogen. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung ( $n = 2 - 6$ ).

#### 7.2.1.2 COMET Assay Ergebnisse für Benzo[a]pyren

Im folgenden Diagramm sind die auf DMSO bezogenen Tail Intensitäten für alle eingesetzten Konzentrationen und für alle untersuchten Inkubationszeiten abgebildet (Abb. A73). Auch bei dieser Darstellung erkennt man die zeitabhängige Zunahme der DNA-Strangbrüche. Die Mittelwerte für 5 h Inkubation mit

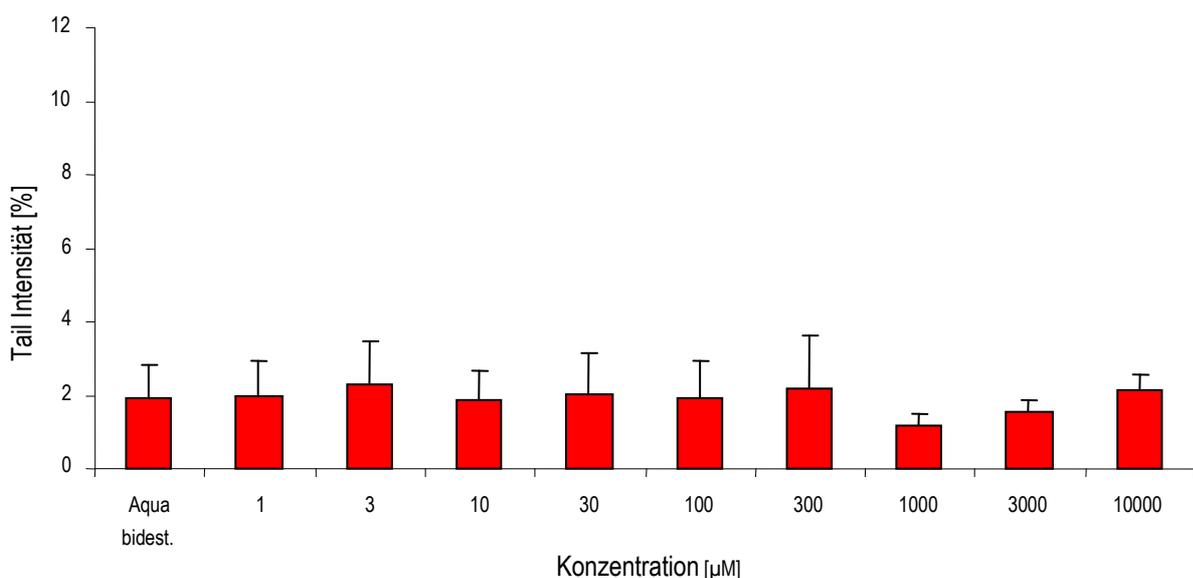
Benzo[a]pyren sind etwas höher als die für 3 h Behandlung. Die stärksten Schäden wurden, in Bezug auf die Lösemittelkontrolle, nach 24 h langer Inkubation mit B[a]P beobachtet.



**Abb. A73:** COMET Assay Ergebnisse für die Inkubation mit B[a]P (3 h, 5 h und 24 h). Die Tail Intensitäten wurden auf die entsprechenden Lösemittelkontrollen bezogen. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung (n = 4 – 13).

### 7.2.1.3 COMET Assay Ergebnisse für Dimethylnitrosamin

Die Genotoxizität von DMN wurde nur zu einem Zeitpunkt (24 h Inkubation) untersucht. In zuvor durchgeführten Versuchen mit Benzo[a]pyren hatte sich gezeigt, dass die stärksten genotoxischen Effekte nach 24 h langer Behandlung mit der Testsubstanz gefunden wurden. Nach der Inkubation mit DMN lagen die ermittelten Tail Intensitäten bis 10 mM DMN weitestgehend im Bereich der Negativkontrolle (Abb. A74).



**Abb. A74:** COMET Assay Ergebnisse für die Inkubation mit DMN (24 h). Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung der Tail Intensität (n = 3 – 6).

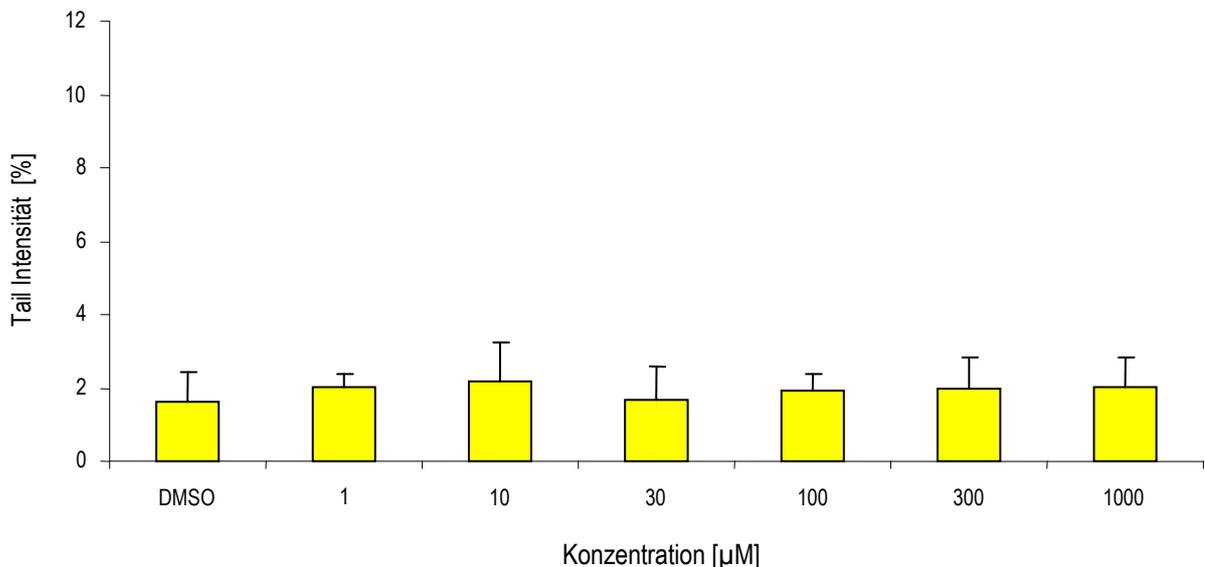
Die auf die jeweilige Negativkontrolle bezogenen Tail Intensitätswerte lagen bis zu einer Konzentration von 3 mM DMN im Bereich der Kontrolle (Tab. A17). Bei der höchsten eingesetzten Konzentration der Testsubstanz (10 mM) waren die DNA-Schäden nach Anpassung an die Lösemittelkontrolle um den Faktor 1,4 erhöht.

**Tab. A17:** COMET Assay Ergebnisse für die Inkubation mit DMN (24 h). Die Tail Intensitäten für jeden einzelnen Versuch wurden auf die entsprechende A. bidest.-Kontrolle bezogen.

A. bidest.	1 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	30 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	300 $\mu\text{M}$	1 mM	3 mM	10 mM
1,00			0,87		0,92				
1,00			0,72		1,00		0,91	0,91	1,50
1,00					0,94	1,21	0,78	1,02	1,40
1,00	0,80	1,00	0,89	0,87	1,01	1,06			
1,00	0,81	1,39	1,09	0,77	1,14	1,11	0,98		
1,00	1,02	0,75	0,90	1,01				0,95	1,14

#### 7.2.1.4 COMET Assay Ergebnisse für Acrylnitril

Acrylnitril wurde, wie auch schon Dimethylnitrosamin, nur zu einem Zeitpunkt (24 h) im COMET Assay auf sein genotoxisches Potential in PUBEC getestet. Bis zu einer Konzentration von 1 mM AN unterschieden sich die mittleren Tail Intensitäten kaum von denen der Lösemittelkontrolle (Abb. A75)



**Abb. A75:** COMET Assay Ergebnisse für die Inkubation mit DMN (24 h). Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung der Tail Intensität (n = 2 – 3).

Durch die Behandlung mit AN nahmen die DNA-Schäden nur in einem Versuch (hellgelbe Raute) konzentrationsabhängig im Bereich zwischen 1 und 100  $\mu\text{M}$  zu (Tab. A18). Die relativen Tail

Intensitäten in diesem Versuch waren ab 100  $\mu\text{M}$  AN doppelt so groß wie in der entsprechenden DMSO-Kontrolle. In zwei weiteren Versuchen wurde in Bezug auf die Lösemittelkontrolle keine Zunahme der DNA-Schäden beobachtet.

**Tab. A18:** COMET Assay Ergebnisse für die Inkubation mit AN (24 h). Die Tail Intensitäten wurden auf die entsprechenden Lösemittelkontrollen bezogen.

DMSO	1 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	30 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	300 $\mu\text{M}$	1 mM
1,00		1,47	1,50	2,16	2,26	2,09
1,00	1,02	1,36	1,04	1,05	1,32	1,30
1,00	0,95	1,32		1,05	0,72	0,94

### 7.1.2.5 Genotoxizität von 4-Aminobiphenyl in Kombination mit Benzo[a]pyren in PUBEC

Vergleicht man die auf die Lösemittelkontrolle normierten Werte miteinander, sieht man folgendes:

1. Wie bereits gezeigt (Abb. A72), führte die Behandlung mit 4-Aminobiphenyl alleine zu keinen vermehrten DNA-Schäden. Die normierten Tail Intensitäten für die verschiedenen 4-ABP-Konzentrationen lagen im Bereich der Lösemittelkontrolle.
2. Die normierten Tail Intensitäten für PUBEC, die mit dem binären Gemisch aus 4-ABP und 1  $\mu\text{M}$  B[a]P co-inkubiert wurden, lagen im Bereich der Tail Intensitätswerte für 1  $\mu\text{M}$  B[a]P (Tab. A19). Diese waren nur geringfügig größer als die Werte der Lösemittelkontrolle.

Eine Kombinationswirkung von 4-Aminobiphenyl mit Benzo[a]pyren konnte mit dem COMET Assay nicht detektiert werden.

**Tab. A19:** Normierte Tail Intensitäten (DMSO = 1) für Inkubation mit 4-ABP und Co-Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  B[a]P. Aufgeführt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Einzelsubstanz	x-fache Tail Intensität (DMSO = 1)	Einzelsubstanz + 1 $\mu\text{M}$ B[a]P	x-fache Tail Intensität (DMSO = 1)
0,2% DMSO	1,00 $\pm$ 0,00	0,2% DMSO	1,13 $\pm$ 0,39
1 $\mu\text{M}$ 4-ABP	0,90 $\pm$ 0,25	1 $\mu\text{M}$ 4-ABP	1,14 $\pm$ 0,27
3 $\mu\text{M}$ 4-ABP	1,02 $\pm$ 0,16	3 $\mu\text{M}$ 4-ABP	1,34 $\pm$ 0,12
10 $\mu\text{M}$ 4-ABP	0,87 $\pm$ 0,23	10 $\mu\text{M}$ 4-ABP	1,12 $\pm$ 0,34
50 $\mu\text{M}$ 4-ABP	1,12 $\pm$ 0,28	50 $\mu\text{M}$ 4-ABP	1,37 $\pm$ 0,79

### 7.2.1.6 COMET Assay Ergebnisse für 4-Aminobiphenyl – modifizierter COMET Assay

Nach 24 h langer Inkubation mit 4-ABP konnten mit Hilfe des modifizierten COMET Assay keine DNA-Schäden nachgewiesen werden (Abb. A76).

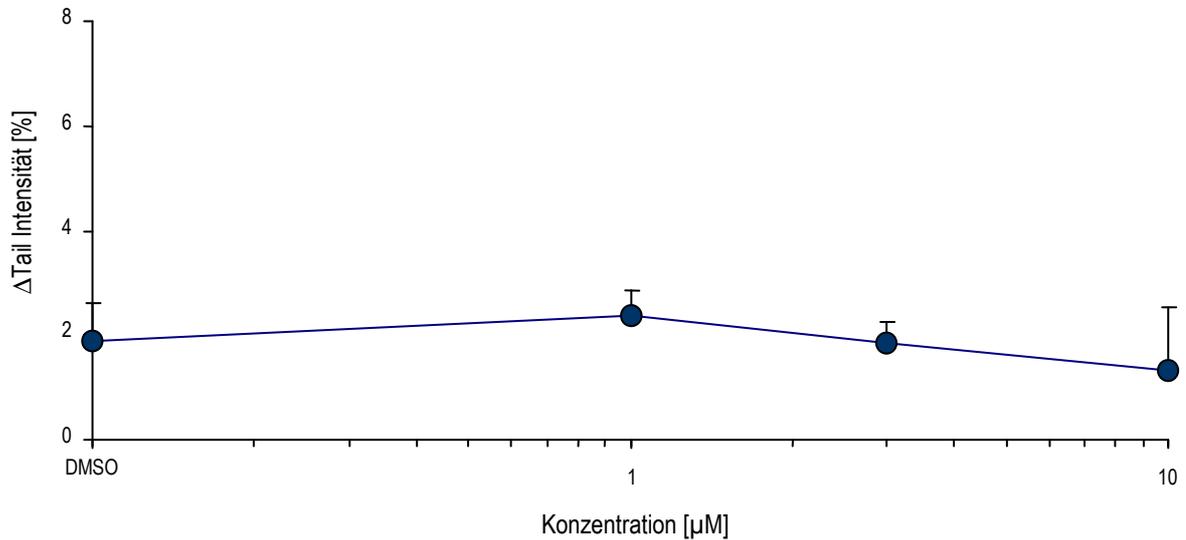


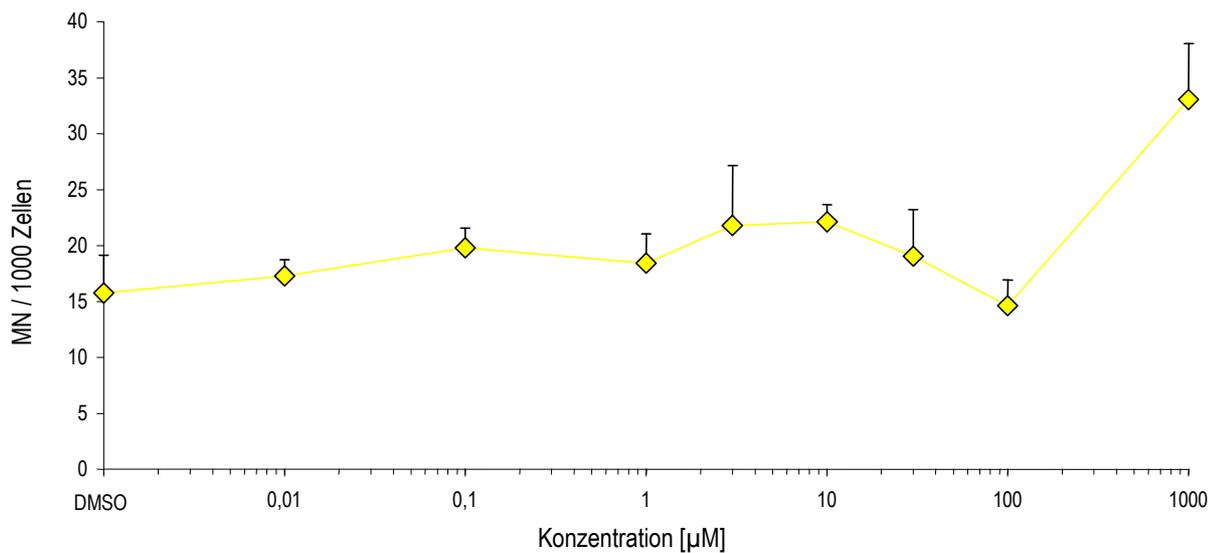
Abb. A76: Oxidative DNA-Schäden in PUBEC ( $\Delta$  Tail Intensität [%]) nach Inkubation mit 4--Aminobiphenyl (n = 3).

## 7.2.2 Weitere Mikrokern-Testergebnisse

In den folgenden Abschnitten sind weitere Mikrokern-Testergebnisse abgebildet, die nicht im Ergebnisteil dargestellt wurden. Außerdem sind die Daten zur Verdopplung der Mikrokernhintergrundrate tabellarisch unter 7.2.2.3 aufgeführt.

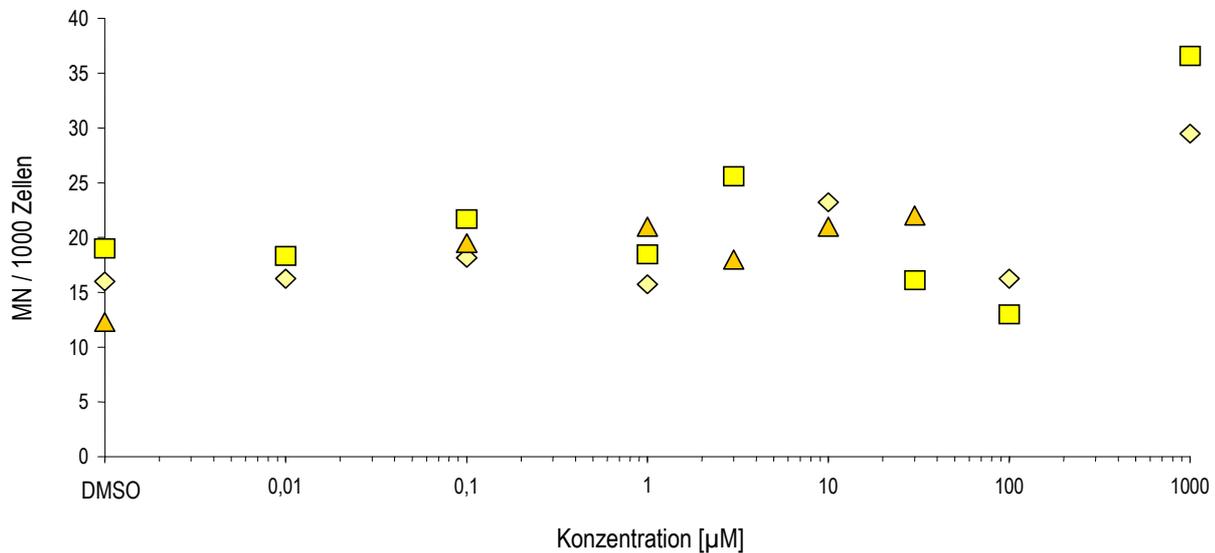
### 7.2.2.1 Mikrokern-Testergebnisse für Acrylnitril

Die Behandlung mit AN führte im sub-zytotoxischen Bereich zwischen 10 nM und 10  $\mu$ M zu einer sehr schwachen, konzentrationsabhängigen Induktion von Mikrokernen (Abb. A77). Im Vergleich zur Behandlung mit DMSO war die Mikronukleusrate nach Inkubation mit 1 mM AN um den Faktor 2,1 erhöht. Mit dem Neutralrot-Test war für diese Konzentration allerdings Zytotoxizität nachgewiesen worden.



**Abb. A77:** Mittelwerte und Standardabweichung der Mikrokernfrequenz in PUBEC nach 30 h Inkubation mit AN (n = 2 – 3).

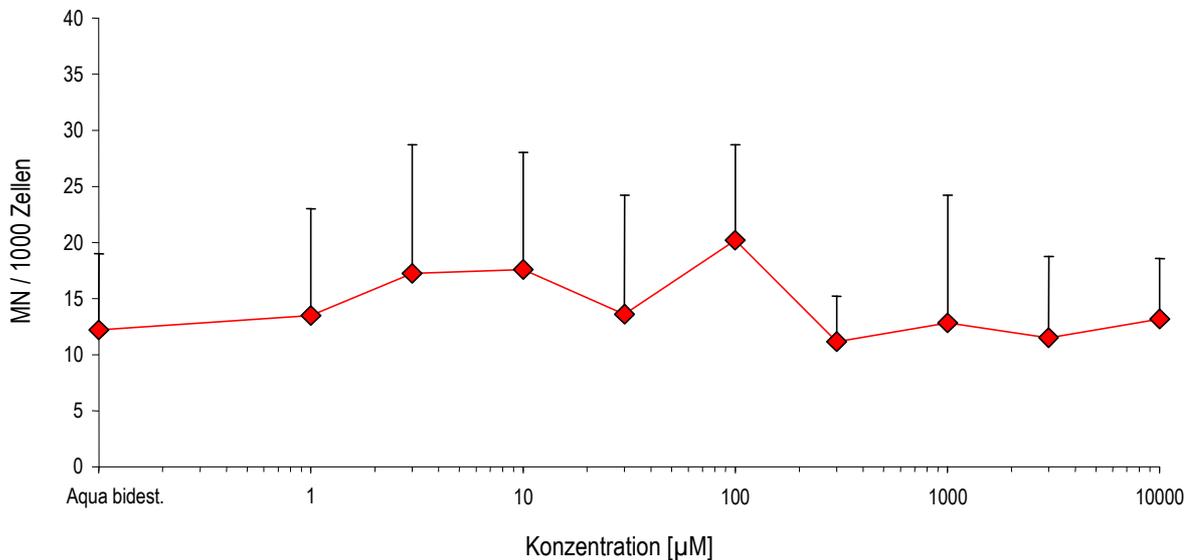
Die Einzeldaten der unabhängig voneinander durchgeführten Mikrokern-Tests liegen eng beieinander (Abb. A78). Bis zu 10 µM AN war eine schwache Zunahme der Mikrokernrate im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu beobachten. Zu einer Verdopplung der Mikrokern-Hintergrundrate kam es im subzytotoxischen Bereich jedoch bei keiner der untersuchten Konzentrationen.



**Abb. A78:** Einzelpunktdarstellung Mikrokern-Testergebnisse für Acrylnitril. Die einzelnen Werte aus jedem Versuch sind mit einem Symbol in einer anderen Farbe dargestellt.

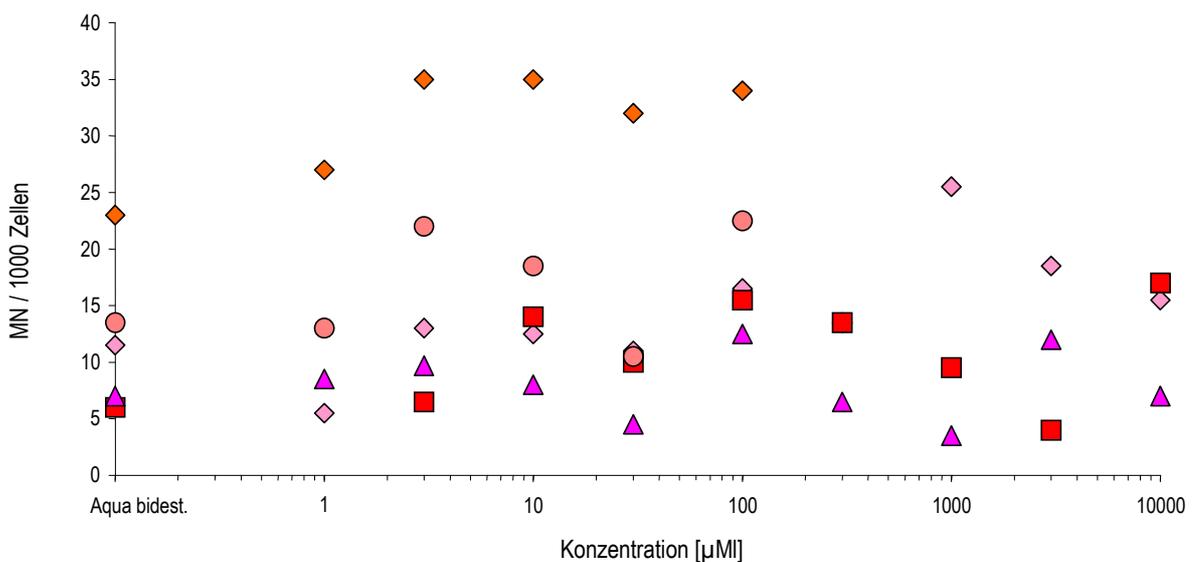
### 7.2.2.2 Mikrokern-Testergebnisse für Dimethylnitrosamin

DMN wurde bis 10 mM der Substanz auf die Induktion von Mikrokernen in PUBEC untersucht (Abb. A79). Im Vergleich zur Kontrolle (Aqua bidest.) wurden im Konzentrationsbereich zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  DMN vermehrt Mikronuklei gefunden.



**Abb. A79:** Mittelwerte und Standardabweichung der Mikrokernfrequenz in PUBEC nach 30 h Inkubation mit DMN ( $n = 3 - 5$ ).

Die Mikrokern-Testergebnisse für die Behandlung von PUBEC mit DMN variieren stark (Abb. A80). Eine Zunahme der Mikrokernrate – mit Tendenz zur Konzentrationsabhängigkeit – war für alle zu beobachten. Die Mikrokern-Hintergrundrate (Aqua bidest.) war in zwei von fünf Versuchen bei mindestens einer Konzentration verdoppelt (siehe 7.2.2.3).



**Abb. A80:** Einzelpunktdarstellung der durchgeführten Mikrokern-Tests für Dimethylnitrosamin. Die einzelnen Werte aus jedem Versuch sind mit einem Symbol in einer anderen Farbe dargestellt.

### 7.2.2.3 Tabellen zur Verdopplung der Mikrokern-Hintergrundrate

In den folgenden Tabellen wird für alle durchgeführten Mikrokern-Tests aufgeführt, um ein Wie Vielfaches die Mikronukleusrate nach Inkubation mit Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen im Vergleich zum Lösemittel („Hintergrundrate“) erhöht war. Zytotoxische Konzentrationen sind in den Tabellen grau hinterlegt.

#### 4-Aminobiphenyl

DMSO	0,1 µM	1 µM	3 µM	10 µM	30 µM	100 µM	300 µM	1 mM
1,0	1,4	0,9	1,5	1,9	0,9	1,6	1,4	2,7
1,0	1,3	0,8	0,6	1,5	1,4	0,7	1,0	0,5
1,0	0,3	2,8	2,2	1,4	2,4	2,0	1,9	4,6
1,0		1,6	1,4	1,4	1,1	1,5		
1,0		1,8	1,8	1,3	1,6	1,9	1,2	2,0

Verdopplung der Hintergrundrate in 1 von 5 (20%) Versuchen

Annähernd erreichte Verdopplung der Hintergrundrate in 4 von 5 (80%) Versuchen

Keine Verdopplung der Hintergrundrate in 0 von 5 (0%) Versuchen

#### Benzo[a]pyren

DMSO	0,1 µM	0,3 µM	1 µM	3 µM	5 µM	8 µM	10 µM	30 µM	50 µM	100 µM	500 µM
1,0	0,6		1,1		1,3		1,2		1,4	1,7	1,6
1,0	1,2		1,1		1,4		2,4		2,7	1,9	1,7
1,0	1,2		1,0		1,7		1,9		1,2	2,3	
1,0			3,2	2,3			2,7	2,2		1,2	
1,0			2,2	2,2			1,0	1,6		1,8	
1,0	1,4	1,3	2,0	2,0	2,3	1,7	1,7				
1,0	1,1	1,5	1,4	2,1	1,2	1,3	1,0				

Verdopplung der Hintergrundrate in 6 von 7 (86%) Versuchen

Annähernd erreichte Verdopplung der Hintergrundrate in 1 von 7 (14%) Versuchen

Keine Verdopplung der Hintergrundrate in 0 von 7 (0%) Versuchen

**Dimethylnitrosamin**

<b>A. bidest.</b>	<b>1 µM</b>	<b>3 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>30 µM</b>	<b>100 µM</b>	<b>300 µM</b>	<b>1 mM</b>	<b>3 mM</b>	<b>10 mM</b>
1,0	0,5	1,1	1,1	1,0	1,4	1,2	2,2	1,6	1,3
1,0		1,1	2,3	1,7	2,6	2,3	1,6	0,7	2,8
1,0	1,2	1,4	1,1	0,6	1,8	0,9	0,5	1,7	1,0
1,0	1,2	1,5	1,5	1,4	1,5				
1,0	1,0	1,6	1,4	0,8	1,7				

Verdopplung der Hintergrundrate in 1 von 5 (20%) Versuchen

Annähernd erreichte Verdopplung der Hintergrundrate in 4 von 5 (80%) Versuchen

Keine Verdopplung der Hintergrundrate in 0 von 5 (0%) Versuchen

**Acrylnitril**

<b>DMSO</b>	<b>0,01 µM</b>	<b>0,1 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>3 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>30 µM</b>	<b>100 µM</b>	<b>1 mM</b>
1,0	1,0	1,1	1,0		1,5		1,0	1,8
1,0	1,0	1,1	1,0	1,3		0,8	0,7	1,9
1,0		1,6	1,7	1,5	1,7	1,8		

Verdopplung der Hintergrundrate in 0 von 3 (0%) Versuchen

Annähernd erreichte Verdopplung der Hintergrundrate in 2 von 3 (67%) Versuchen

Keine Verdopplung der Hintergrundrate in 1 von 3 (33%) Versuchen

**Zigarettenrauchkondensat**

<b>DMSO</b>	<b>0,001 µg/ml</b>	<b>0,01 µg/ml</b>	<b>0,1 µg/ml</b>	<b>1 µg/ml</b>	<b>10 µg/ml</b>
1,0	1,1	1,2	2,0	1,2	1,7
1,0	1,0	1,3	1,2	1,1	1,0
1,0	0,9	1,8	1,1	2,1	

Verdopplung der Hintergrundrate in 2 von 3 (37%) Versuchen

Annähernd erreichte Verdopplung der Hintergrundrate in 0 von 3 (0%) Versuchen

Keine Verdopplung der Hintergrundrate in 1 von 3 (33%) Versuchen

### Co-Inkubation: 4-Aminobiphenyl + 1 $\mu$ M Benzo[a]pyren

DMSO	1 $\mu$ M 4-ABP	3 $\mu$ M 4-ABP	10 $\mu$ M 4-ABP	1 $\mu$ M B[a]P	1 $\mu$ M 4-ABP + 1 $\mu$ M B[a]P	3 $\mu$ M 4-ABP + 1 $\mu$ M B[a]P	10 $\mu$ M 4-ABP + 1 $\mu$ M B[a]P
1,0	1,4	1,0	2,2	2,7	1,7	2,2	3,3
1,0	2,2	1,6	1,6	2,2	3,0	3,5	1,7
1,0	0,8	0,8	0,6	0,8	1,2	1,0	1,6
1,0	1,2	1,1	1,2	0,9	1,0	1,4	1,5

Verdopplung der Hintergrundrate in: 2 von 4 (50%) Versuchen

Annähernd erreichte Verdopplung der Hintergrundrate in 2 von 4 (50%) Versuchen

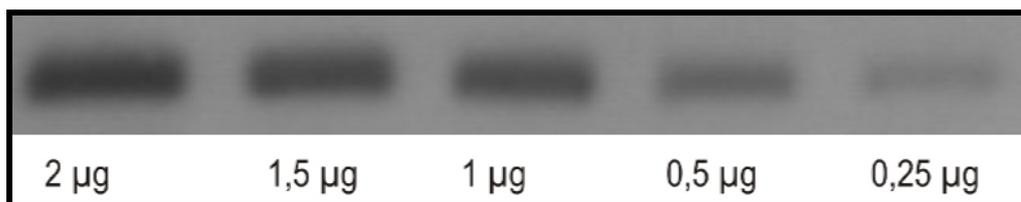
Keine Verdopplung der Hintergrundrate in 0 von 4 (0%) Versuchen

### 7.2.3 Weitere Western Blot Ergebnisse

Im Folgenden sind weitere Western Blot-Ergebnisse aufgeführt, die nicht im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit dargestellt wurden.

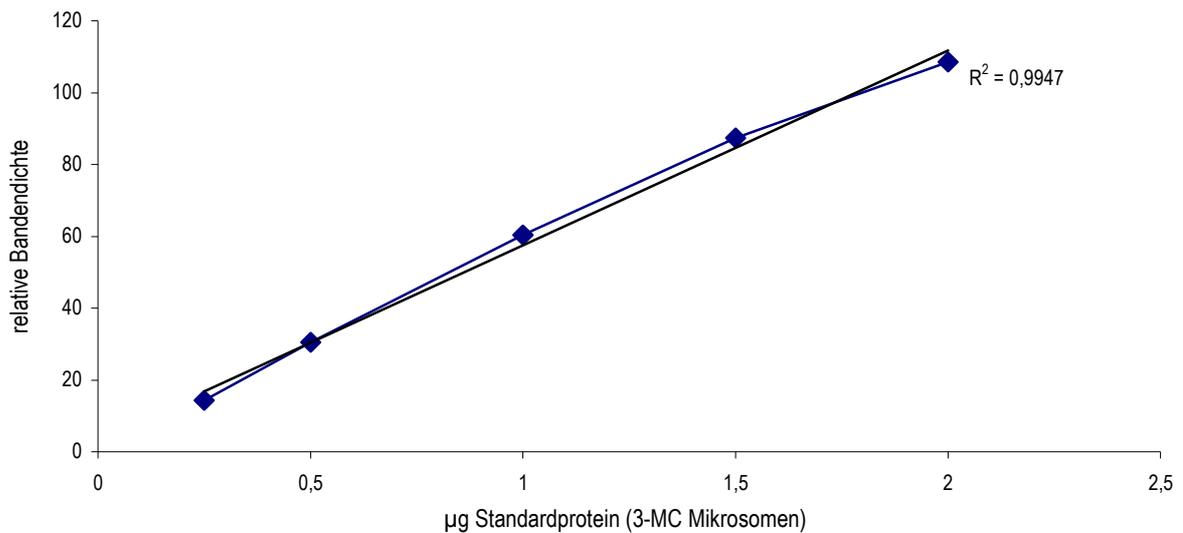
#### 7.2.3.1 Western Blot Standard für den Nachweis von CYP1A1 – 3-MC Mikrosomen

In den folgenden Abbildungen (Abb. A81 und Abb. A82) sind Western Blot Ergebnisse, die mit dem Standard zum Nachweis von CYP1A1 „3-MC Mikrosomen“ abgebildet.



**Abb. A81:** Western Blot Ergebnisse für den verwendeten Standard „3-MC Mikrosomen“. Pro Spur wurden die in  $\mu$ g angegebenen Mengen Protein aufgetragen.

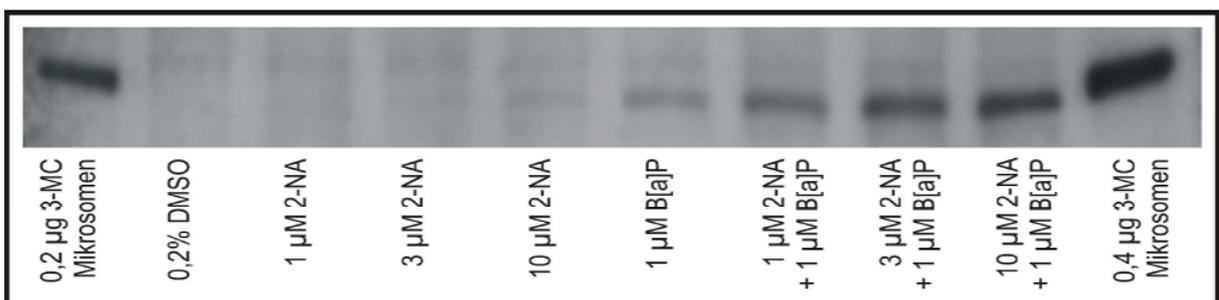
Zwischen Bandendichte und aufgetragener Proteinmenge Western Blot Standards („3-MC Mikrosomen“) wurde eine lineare Beziehung beobachtet (Abb. A82).



**Abb. A82:** Western Blot Ergebnisse für den verwendeten Standard „3-MC Mikrosomen“. In dieser Abbildung sind die relative Bandendichte, die mittels WinCam ausgewertet wurden und die eingesetzte Proteinmenge des Standards „3-MC Mikrosomen“ (in µg) gegeneinander aufgetragen.

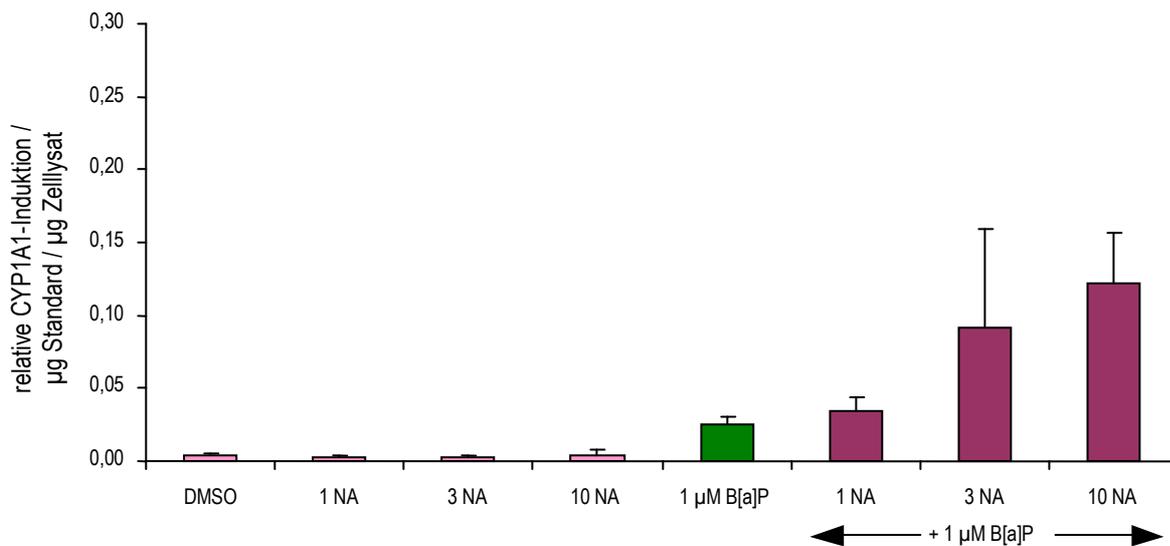
### 7.2.3.2 CYP1A1-Induktion in PUBEC durch 2-Naphthylamin in Kombination mit Benzo[a]pyren

Auch für 2-Naphthylamin (2-NA) konnte keine CYP1A1-Induktion durch die alleinige Behandlung mit dem Arylamin detektiert werden (Abb. A83, Spuren 3 – 5). Durch Co-Inkubation von PUBEC mit 1 µM B[a]P und verschiedenen 2-NA-Konzentrationen wurde auch in diesen Versuchen CYP1A1 in allen untersuchten Zelllysaten deutlich verstärkt induziert. Die Dichte der Proteinbanden nahm ebenfalls deutlich mit steigenden 2-NA-Konzentrationen zu (Abb. A83, Spuren 7 – 9).



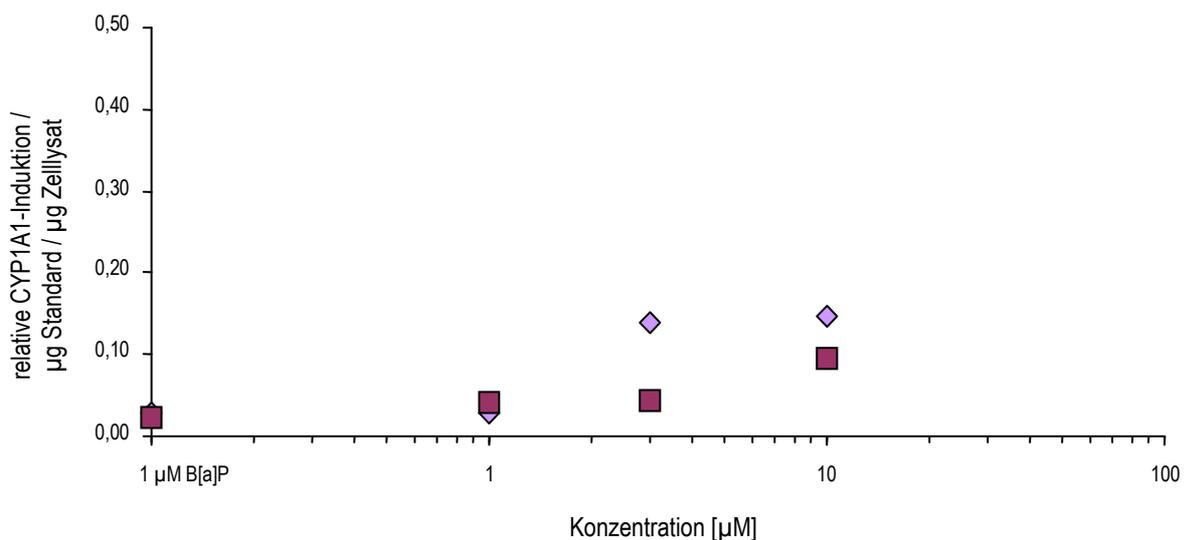
**Abb. A83:** Western Blot Ergebnis für 24 h lange Inkubation mit 2-Naphthylamin alleine oder in Kombination mit Benzo[a]pyren. In den Spuren 2 – 9 wurden jeweils 2 µg Zelllysate aufgetragen.

Die relative CYP1A1-Induktion durch 1 µM Benzo[a]pyren lag in diesen Versuchen nur bei 0,03, während in anderen Versuchen, die zuvor durchgeführt worden waren, die relative CYP1A1-Induktion ca. 0,07 pro µg Zelllysate betrug. Durch Co-Inkubation von PUBEC mit 1 µM B[a]P und 3 oder 10 µM 2-Naphthylamin konnte im Mittel eine überadditive Erhöhung der Proteinexpression beobachtet werden (Abb. A84).



**Abb. A84:** Relative CYP1A1-Induktion bezogen auf die Proteinmenge des mitgeführten Standards („3-MC Mikrosomen“) und die Menge eingesetzten Zellysats nach 24 h langer Co-Inkubation mit 2-NA und 1 µM B[a]P (n = 2). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung.

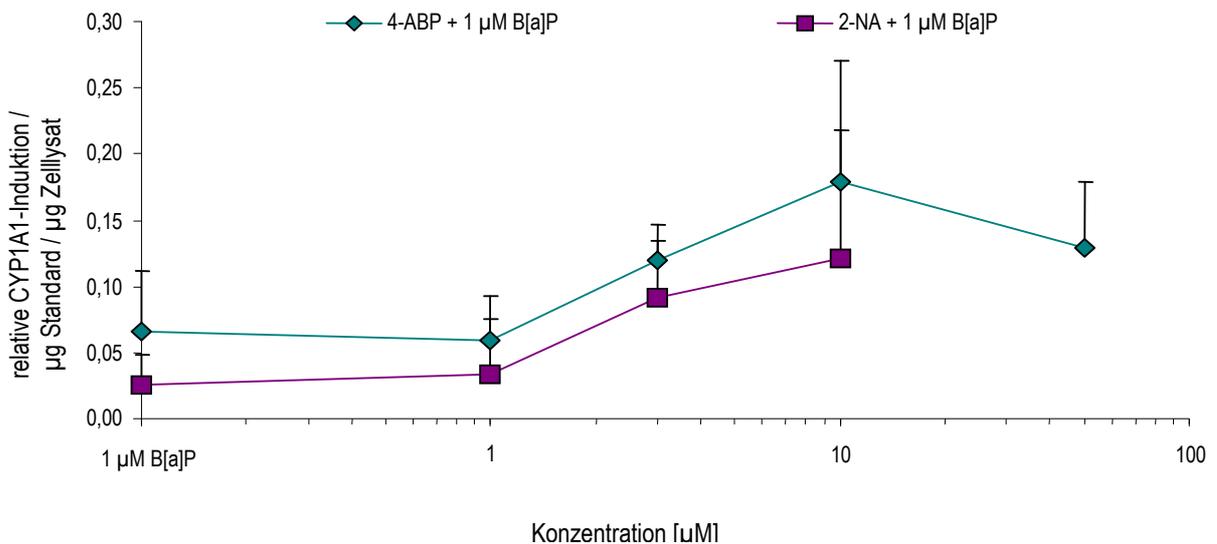
Bei Betrachtung der Einzeldaten aus den verschiedenen Versuchen, fällt auf, dass die CYP1A1-Induktion durch Benzo[a]pyren und das binäre Gemisch für die einzelnen Versuche unterschiedlich stark ausgefallen ist (Abb. A85). In beiden Versuchen kam jedoch heraus, dass die Co-Inkubation mit 1 µM B[a]P und 1 µM 2-NA, wie auch schon für 1 µM 4-ABP in Kombination mit 1 µM B[a]P gezeigt, zu keiner Verstärkung der CYP1A1-Proteinexpression über den Effekt durch den PAK hinaus führte.



**Abb. A85:** Einzelpunktdarstellung der relativen CYP1A1-Induktion bezogen auf die Proteinmenge des mitgeführten Standards („3-MC Mikrosomen“) und die Menge eingesetzten Zellysats nach 24 h langer Co-Inkubation mit 2-NA und 1 µM B[a]P. Die Ergebnisse aus individuellen Versuchen sind in unterschiedlichen Farben und mit verschiedenen Symbolen dargestellt.

### 7.2.3.3 Vergleich der CYP1A1-Induktion in PUBEC durch aromatische Amine in Kombination mit Benzo[a]pyren

Der Induktionseffekt durch die Co-Inkubation von PUBEC mit 1  $\mu\text{M}$  B[a]P und Arylaminen (1 – 10  $\mu\text{M}$ ) war sehr ähnlich. Die Kurven für der relativen CYP1A1-Induktion nach Co-Inkubation mit B[a]P und verschiedenen 4-ABP- oder 2-NA- Konzentrationen verliefen fast parallel (Abb. A86).

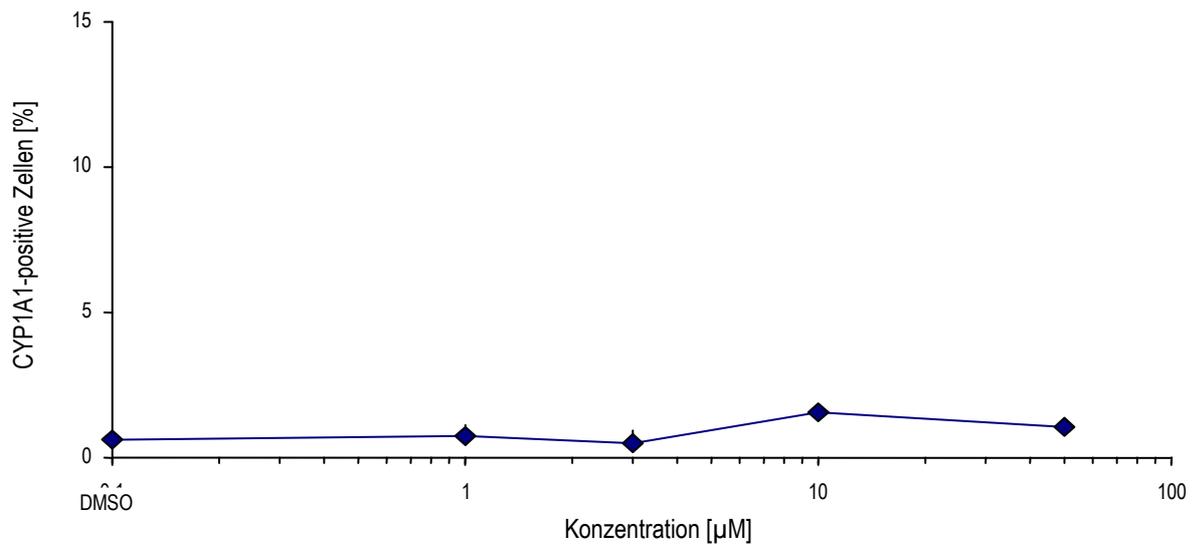


**Abb. A86:** Vergleich der CYP1A1-Induktion in PUBEC nach 24 h langer Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  Benzo[a]pyren und einem aromatischen Amin (AA) – 4-Aminobiphenyl (türkis) bzw. 2-Naphthylamin (violett) – in verschiedenen Konzentrationen alleine sowie in Kombination miteinander. Sämtliche Werte sind auf die CYP1A1-Induktion durch 1  $\mu\text{M}$  B[a]P bezogen worden. Abgebildet sind Mittelwert und Standardabweichung.

## 7.2.4 Weitere FACS Ergebnisse

### 7.2.4.1 FACS Ergebnisse für 4-Aminobiphenyl

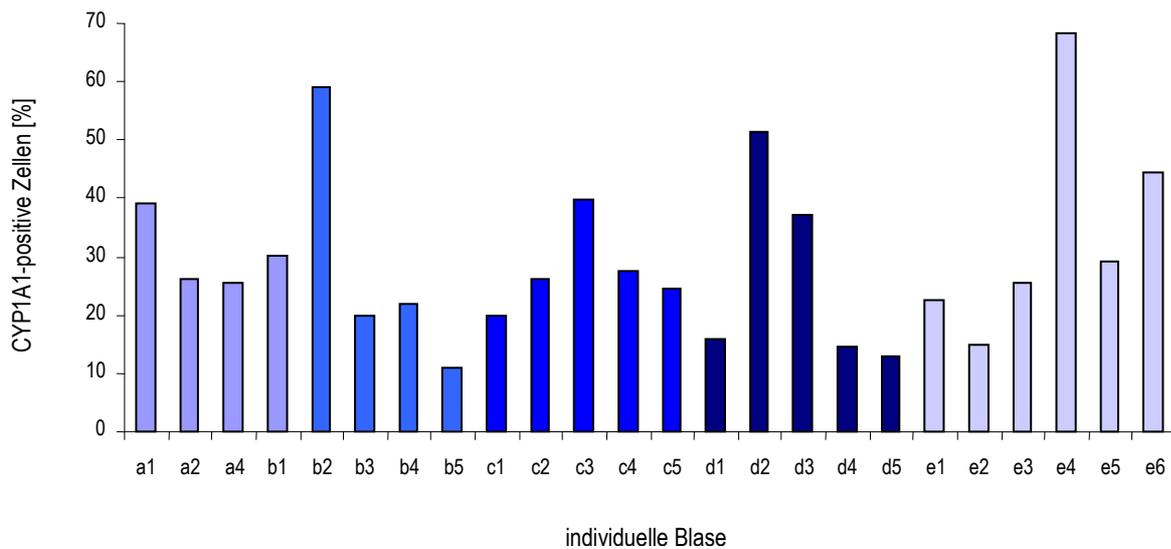
Nach 24 h langer Inkubation mit 4-Aminobiphenyl wurde keine auffällige Veränderung der CYP1A1-Induktion in individuellen Zellen beobachtet. Die prozentualen Anteile CYP1A1-positiver Zellen nach Behandlung mit 1, 3, 10 und 50  $\mu\text{M}$  4-ABP lagen im Bereich der Anteile nach DMSO-Inkubation (Abb. A87).



**Abb. A87:** Prozentualer Anteil CYP1A1-positiver Zellen nach 24 h langer Inkubation mit 4-Aminobiphenyl (n = 3). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichung.

#### 7.2.4.2 FACS Ergebnisse für frisch isolierte Schweineharnblasenepithelzellen am Tag 0

Am Tag 0 waren die aus frischen Harnblasen isolierten, noch nicht kultivierten Zellen unterschiedlich stark CYP1A1-induziert. Direkt nach Isolierung der Zellen wurden prozentuale Anteile von 10 bis zu 70% CYP1A1-positiver Zellen gefunden, die aus individuellen Harnblasen gewonnen worden waren (Abb. A88).



**Abb. A88:** CYP1A1-Induktion in frisch isolierten PUBEC. Abgebildet sind die Anzahlen CYP1A1-positiver PUBEC-Zellen, die aus einzelnen Blasen aus verschiedenen Präparationen (a, b, c, d und e) bestanden.

## 7.3 Statistik

### 7.3.1 Statistik zum COMET Assay

Im Folgenden sind die mittels SPSS errechneten p-Werten für jede Konzentration aufgetragen. Es wurden jeweils die Werte der einzelnen Konzentrationen mit denen der entsprechenden Lösemittelkontrollen verglichen.

#### 7.3.1.1 Konventioneller COMET Assay

##### Inkubation mit 4-Aminobiphenyl

Inkubationsdauer	Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
3 h	4-Aminobiphenyl	100 nM	1,000	nicht signifikant	2
3 h	4-Aminobiphenyl	1 µM	1,000	nicht signifikant	2
3 h	4-Aminobiphenyl	10 µM	0,667	nicht signifikant	2
3 h	4-Aminobiphenyl	50 µM	0,333	nicht signifikant	2
3 h	4-Aminobiphenyl	100 µM	0,667	nicht signifikant	2
3 h	4-Aminobiphenyl	500 µM	0,700	nicht signifikant	3
5 h	4-Aminobiphenyl	100 nM	0,343	nicht signifikant	4
5 h	4-Aminobiphenyl	1 µM	0,400	nicht signifikant	3
5 h	4-Aminobiphenyl	10 µM	0,548	nicht signifikant	5
5 h	4-Aminobiphenyl	50 µM	0,421	nicht signifikant	5
5 h	4-Aminobiphenyl	100 µM	0,485	nicht signifikant	6
5 h	4-Aminobiphenyl	500 µM	0,700	nicht signifikant	3
24 h	4-Aminobiphenyl	100 nM	1,000	nicht signifikant	3
24 h	4-Aminobiphenyl	1 µM	1,000	nicht signifikant	4
24 h	4-Aminobiphenyl	10 µM	0,841	nicht signifikant	5
24 h	4-Aminobiphenyl	50 µM	----	zytotoxisch	3
24 h	4-Aminobiphenyl	100 µM	----	zytotoxisch	6
24 h	4-Aminobiphenyl	500 µM	----	zytotoxisch	3

**Inkubation mit Benzo[a]pyren**

Inkubationsdauer	Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
3 h	Benzo[a]pyren	10 nM	0,310	nicht signifikant	5
3 h	Benzo[a]pyren	100 nM	0,394	nicht signifikant	6
3 h	Benzo[a]pyren	1 µM	0,240	nicht signifikant	6
3 h	Benzo[a]pyren	5 µM	0,886	nicht signifikant	4
3 h	Benzo[a]pyren	10 µM	0,038	signifikant	8
3 h	Benzo[a]pyren	50 µM	0,114	nicht signifikant	4
3 h	Benzo[a]pyren	100 µM	0,008	sehr signifikant	9
5 h	Benzo[a]pyren	10 nM	0,818	nicht signifikant	6
5 h	Benzo[a]pyren	100 nM	0,535	nicht signifikant	7
5 h	Benzo[a]pyren	1 µM	0,318	nicht signifikant	7
5 h	Benzo[a]pyren	5 µM	0,222	nicht signifikant	5
5 h	Benzo[a]pyren	10 µM	0,035	signifikant	10
5 h	Benzo[a]pyren	50 µM	0,093	nicht signifikant	6
5 h	Benzo[a]pyren	100 µM	0,002	sehr signifikant	11
24 h	Benzo[a]pyren	10 nM	0,886	nicht signifikant	4
24 h	Benzo[a]pyren	100 nM	0,548	nicht signifikant	5
24 h	Benzo[a]pyren	1 µM	0,013	signifikant	11
24 h	Benzo[a]pyren	5 µM	0,002	sehr signifikant	7
24 h	Benzo[a]pyren	10 µM	0,000	hoch signifikant	13
24 h	Benzo[a]pyren	50 µM	0,001	sehr signifikant	9
24 h	Benzo[a]pyren	100 µM	0,000	hoch signifikant	11

**Inkubation mit Dimethylnitrosamin**

Inkubationsdauer	Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
24 h	Dimethylnitrosamin	1 µM	1,000	nicht signifikant	3
24 h	Dimethylnitrosamin	3 µM	1,000	nicht signifikant	3
24 h	Dimethylnitrosamin	10 µM	0,548	nicht signifikant	5
24 h	Dimethylnitrosamin	30 µM	1,000	nicht signifikant	3
24 h	Dimethylnitrosamin	100 µM	1,000	nicht signifikant	5
24 h	Dimethylnitrosamin	300 µM	0,400	nicht signifikant	3
24 h	Dimethylnitrosamin	1 mM	0,700	nicht signifikant	3
24 h	Dimethylnitrosamin	3 mM	1,000	nicht signifikant	3
24 h	Dimethylnitrosamin	10 mM	0,400	nicht signifikant	3

### Inkubation mit Acrylnitril

Inkubationsdauer	Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
24 h	Acrylnitril	1 µM	1,000	nicht signifikant	2
24 h	Acrylnitril	10 µM	0,400	nicht signifikant	3
24 h	Acrylnitril	30 µM	0,667	nicht signifikant	2
24 h	Acrylnitril	100 µM	0,700	nicht signifikant	3
24 h	Acrylnitril	300 µM	1,000	nicht signifikant	3
24 h	Acrylnitril	1 mM	—	zytotoxisch	3

### Co-Inkubation mit 4-Aminobiphenyl + 1 µM Benzo[a]pyren

Inkubationsdauer	Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
24 h	4-Aminobiphenyl	1 µM	0,485	nicht signifikant	6
24 h	4-Aminobiphenyl	3 µM	1,000	nicht signifikant	3
24 h	4-Aminobiphenyl	10 µM	0,421	nicht signifikant	5
24 h	4-Aminobiphenyl	50 µM	—	zytotoxisch	3
24 h	Benzo[a]pyren	1 µM	0,818	nicht signifikant	6
24 h	1 µM Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	1 µM	0,699	nicht signifikant	6
24 h	1 µM Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	3 µM	0,400	nicht signifikant	3
24 h	1 µM Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	10 µM	0,937	nicht signifikant	6
24 h	1 µM Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	50 µM	—	zytotoxisch	3

### Inkubation mit Zigarettenrauchkondensat

Inkubationsdauer	Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
3 h	Kondensat	10 ng/ml	1,000	nicht signifikant	3
3 h	Kondensat	100 ng/ml	1,000	nicht signifikant	3
3 h	Kondensat	1 µg/ml	0,700	nicht signifikant	3
3 h	Kondensat	10 µg/ml	0,700	nicht signifikant	3
5 h	Kondensat	10 ng/ml	0,700	nicht signifikant	3
5 h	Kondensat	100 ng/ml	1,000	nicht signifikant	3

5 h	Kondensat	1 µg/ml	0,400	nicht signifikant	3
5 h	Kondensat	10 µg/ml	0,400	nicht signifikant	3
24 h	Kondensat	10 ng/ml	0,841	nicht signifikant	5
24 h	Kondensat	100 ng/ml	0,841	nicht signifikant	5
24 h	Kondensat	1 µg/ml	0,310	nicht signifikant	5
24 h	Kondensat	10 µg/ml	0,151	nicht signifikant	5

### 7.3.1.2 Modifizierter COMET Assay mit Reparaturenzym

#### 24 h Inkubation mit 4-Aminobiphenyl

Siehe Tabelle zur Co-Inkubation mit 4-Aminobiphenyl + 1 µM Benzo[a]pyren.

#### 24 h Inkubation mit Benzo[a]pyren

Testsubstanz	Konzentration	Fpg / Puffer	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
Benzo[a]pyren	1 µM	Puffer	0,200	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	3 µM	Puffer	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	5 µM	Puffer	0,200	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	10 µM	Puffer	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	30 µM	Puffer	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	50 µM	Puffer	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	100 µM	Puffer	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	1 µM	Fpg	0,333	nicht signifikant	2
Benzo[a]pyren	3 µM	Fpg	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	5 µM	Fpg	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	10 µM	Fpg	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	30 µM	Fpg	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	50 µM	Fpg	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	100 µM	Fpg	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	1 µM	Δ TI [%]	0,667	nicht signifikant	2
Benzo[a]pyren	3 µM	Δ TI [%]	0,200	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	5 µM	Δ TI [%]	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	10 µM	Δ TI [%]	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	30 µM	Δ TI [%]	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	50 µM	Δ TI [%]	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	100 µM	Δ TI [%]	0,100	nicht signifikant	3

**24 h Co-Inkubation mit 4-Aminobiphenyl + 1  $\mu$ M Benzo[a]pyren**

Testsubstanz	Konzentration	Fpg / Puffer	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
4-Aminobiphenyl	1 $\mu$ M	Puffer	0,400	nicht signifikant	3
4-Aminobiphenyl	3 $\mu$ M	Puffer	1,000	nicht signifikant	3
4-Aminobiphenyl	10 $\mu$ M	Puffer	0,667	nicht signifikant	2
Benzo[a]pyren	1 $\mu$ M	Puffer	0,400	nicht signifikant	3
1 $\mu$ M Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	1 $\mu$ M	Puffer	0,700	nicht signifikant	3
1 $\mu$ M Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	3 $\mu$ M	Puffer	0,400	nicht signifikant	3
1 $\mu$ M Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	10 $\mu$ M	Puffer	0,400	nicht signifikant	3
4-Aminobiphenyl	1 $\mu$ M	Fpg	0,700	nicht signifikant	3
4-Aminobiphenyl	3 $\mu$ M	Fpg	1,000	nicht signifikant	3
4-Aminobiphenyl	10 $\mu$ M	Fpg	0,333	nicht signifikant	2
Benzo[a]pyren	1 $\mu$ M	Fpg	0,200	nicht signifikant	3
1 $\mu$ M Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	1 $\mu$ M	Fpg	0,100	nicht signifikant	3
1 $\mu$ M Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	3 $\mu$ M	Fpg	0,100	nicht signifikant	3
1 $\mu$ M Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	10 $\mu$ M	Fpg	0,100	nicht signifikant	3
4-Aminobiphenyl	1 $\mu$ M	$\Delta$ TI [%]	0,400	nicht signifikant	3
4-Aminobiphenyl	3 $\mu$ M	$\Delta$ TI [%]	1,000	nicht signifikant	3
4-Aminobiphenyl	10 $\mu$ M	$\Delta$ TI [%]	1,000	nicht signifikant	2
Benzo[a]pyren	1 $\mu$ M	$\Delta$ TI [%]	0,400	nicht signifikant	3
1 $\mu$ M Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	1 $\mu$ M	$\Delta$ TI [%]	0,100	nicht signifikant	3
1 $\mu$ M Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	3 $\mu$ M	$\Delta$ TI [%]	0,400	nicht signifikant	3
1 $\mu$ M Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	10 $\mu$ M	$\Delta$ TI [%]	0,200	nicht signifikant	3

### 24 h Inkubation mit Zigarettenrauchkondensat

Testsubstanz	Konzentration	Fpg / Puffer	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
Zigarettenrauchkondensat	10 ng/ml	Puffer	1,000	nicht signifikant	3
Zigarettenrauchkondensat	100 ng/ml	Puffer	1,000	nicht signifikant	3
Zigarettenrauchkondensat	1 µg/ml	Puffer	0,400	nicht signifikant	3
Zigarettenrauchkondensat	10 µg/ml	Puffer	0,100	nicht signifikant	3
Zigarettenrauchkondensat	10 ng/ml	Fpg	1,000	nicht signifikant	3
Zigarettenrauchkondensat	100 ng/ml	Fpg	1,000	nicht signifikant	2
Zigarettenrauchkondensat	1 µg/ml	Fpg	0,400	nicht signifikant	3
Zigarettenrauchkondensat	10 µg/ml	Fpg	0,100	nicht signifikant	3
Zigarettenrauchkondensat	10 ng/ml	Δ TI [%]	1,000	nicht signifikant	3
Zigarettenrauchkondensat	100 ng/ml	Δ TI [%]	1,000	nicht signifikant	2
Zigarettenrauchkondensat	1 µg/ml	Δ TI [%]	1,000	nicht signifikant	3
Zigarettenrauchkondensat	10 µg/ml	Δ TI [%]	0,200	nicht signifikant	3

### 7.3.2 Statistik zum Mikrokern-Test

Tabellen zu den mit Hilfe von SPSS 13.0 errechneten Signifikanzen für den Mikrokern-Test. Es wurden jeweils die Werte der einzelnen Konzentrationen mit denen der entsprechenden Lösemittelkontrollen verglichen.

### 30 h Inkubation mit 4-Aminobiphenyl

Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
4-Aminobiphenyl	100 nM	0,700	nicht signifikant	3
4-Aminobiphenyl	1 µM	0,310	nicht signifikant	5
4-Aminobiphenyl	3 µM	0,222	nicht signifikant	5
4-Aminobiphenyl	10 µM	0,095	nicht signifikant	5
4-Aminobiphenyl	30 µM	----	zytotoxisch	5
4-Aminobiphenyl	100 µM	----	zytotoxisch	5
4-Aminobiphenyl	300 µM	----	zytotoxisch	4
4-Aminobiphenyl	1 mM	----	zytotoxisch	4

**30 h Inkubation mit Benzo[a]pyren**

Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
Benzo[a]pyren	100 nM	0,421	nicht signifikant	5
Benzo[a]pyren	300 nM	0,333	nicht signifikant	2
Benzo[a]pyren	1 µM	0,004	sehr signifikant	7
Benzo[a]pyren	3 µM	0,029	signifikant	4
Benzo[a]pyren	5 µM	0,008	sehr signifikant	5
Benzo[a]pyren	8 µM	0,333	nicht signifikant	2
Benzo[a]pyren	10 µM	0,038	signifikant	7
Benzo[a]pyren	30 µM	0,333	nicht signifikant	2
Benzo[a]pyren	50 µM	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	100 µM	0,016	signifikant	5
Benzo[a]pyren	500 µM	0,333	nicht signifikant	2

**30 h Inkubation mit Dimethylnitrosamin**

Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
Dimethylnitrosamin	1 µM	0,886	nicht signifikant	4
Dimethylnitrosamin	3 µM	0,690	nicht signifikant	5
Dimethylnitrosamin	10 µM	0,310	nicht signifikant	5
Dimethylnitrosamin	30 µM	0,841	nicht signifikant	5
Dimethylnitrosamin	100 µM	0,151	nicht signifikant	5
Dimethylnitrosamin	300 µM	0,400	nicht signifikant	3
Dimethylnitrosamin	1 mM	1,000	nicht signifikant	3
Dimethylnitrosamin	3 mM	0,700	nicht signifikant	3
Dimethylnitrosamin	10 mM	0,200	nicht signifikant	3

**30 h Inkubation mit Acrylnitril**

Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
Acrylnitril	10 nM	1,000	nicht signifikant	2
Acrylnitril	100 nM	0,200	nicht signifikant	3
Acrylnitril	1 µM	0,700	nicht signifikant	3
Acrylnitril	3 µM	0,667	nicht signifikant	2
Acrylnitril	10 µM	0,333	nicht signifikant	2
Acrylnitril	30 µM	0,667	nicht signifikant	2
Acrylnitril	100 µM	0,667	nicht signifikant	2
Acrylnitril	1 mM	----	zytotoxisch	2

### 30 h Co-Inkubation mit 4-Aminobiphenyl + 1 µM Benzo[a]pyren

Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
4-Aminobiphenyl	1 µM	0,343	nicht signifikant	4
4-Aminobiphenyl	3 µM	0,686	nicht signifikant	4
4-Aminobiphenyl	10 µM	0,486	nicht signifikant	4
Benzo[a]pyren	1 µM	0,200	nicht signifikant	4
1 µM Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	1 µM	0,114	nicht signifikant	4
1 µM Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	3 µM	0,114	nicht signifikant	4
1 µM Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	10 µM	0,114	nicht signifikant	4

### 30 h Inkubation mit Zigarettenrauchkondensat

Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
Zigarettenrauchkondensat	1 ng/ml	1,000	nicht signifikant	3
Zigarettenrauchkondensat	10 ng/ml	0,200	nicht signifikant	3
Zigarettenrauchkondensat	100 ng/ml	0,400	nicht signifikant	3
Zigarettenrauchkondensat	1 µg/ml	0,200	nicht signifikant	3
Zigarettenrauchkondensat	10 µg/ml	1,000	nicht signifikant	2

## 7.3.3 Statistik zur Western Blot Analyse

### 24 h Inkubation mit Benzo[a]pyren

Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
Benzo[a]pyren	10 nM	0,667	nicht signifikant	2
Benzo[a]pyren	100 nM	1,000	nicht signifikant	2
Benzo[a]pyren	500 nM	0,009	sehr signifikant	6
Benzo[a]pyren	1 µM	0,008	sehr signifikant	5
Benzo[a]pyren	3 µM	0,029	signifikant	4
Benzo[a]pyren	5 µM	0,008	sehr signifikant	5
Benzo[a]pyren	10 µM	0,008	sehr signifikant	5
Benzo[a]pyren	30 µM	0,029	signifikant	4
Benzo[a]pyren	50 µM	0,029	signifikant	4

**24 h Co-Inkubation mit 4-Aminobiphenyl + 1 µM Benzo[a]pyren**

Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
4-Aminobiphenyl	1 µM	0,886	nicht signifikant	4
4-Aminobiphenyl	3 µM	1,000	nicht signifikant	2
4-Aminobiphenyl	10 µM	0,486	nicht signifikant	4
4-Aminobiphenyl	50 µM	—	zytotoxisch	3
Benzo[a]pyren	1 µM	0,029	signifikant	4
1 µM Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	1 µM	0,029	signifikant	4
1 µM Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	3 µM	0,333	nicht signifikant	2
1 µM Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	10 µM	0,029	signifikant	4
1 µM Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	50 µM	—	zytotoxisch	3

**24 h Co-Inkubation mit 2-Naphthylamin + 1 µM Benzo[a]pyren**

Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
2-Naphthylamin	1 µM	0,667	nicht signifikant	2
2-Naphthylamin	3 µM	0,667	nicht signifikant	2
2-Naphthylamin	10 µM	1,000	nicht signifikant	2
Benzo[a]pyren	1 µM	0,333	nicht signifikant	2
1 µM Benzo[a]pyren + 2-Naphthylamin	1 µM	0,333	nicht signifikant	2
1 µM Benzo[a]pyren + 2-Naphthylamin	3 µM	0,333	nicht signifikant	2
1 µM Benzo[a]pyren + 2-Naphthylamin	10 µM	0,333	nicht signifikant	2

### 24 h Inkubation mit Zigarettenrauchkondensat

Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
Kondensat	10 ng/ml	0,333	nicht signifikant	2
Kondensat	100 ng/ml	0,100	nicht signifikant	3
Kondensat	1 µg/ml	0,200	nicht signifikant	4
Kondensat	5 µg/ml	0,333	nicht signifikant	2
Kondensat	10 µg/ml	0,029	signifikant	4

### 7.3.4 Statistik zur Durchflusszytometrie

#### 24 h Inkubation mit Benzo[a]pyren

Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
Benzo[a]pyren	1 nM	0,667	nicht signifikant	2
Benzo[a]pyren	10 nM	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	100 nM	0,114	nicht signifikant	4
Benzo[a]pyren	500 nM	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	1 µM	0,000	hoch signifikant	8
Benzo[a]pyren	3 µM	0,008	sehr signifikant	5
Benzo[a]pyren	5 µM	0,029	signifikant	4
Benzo[a]pyren	10 µM	0,000	hoch signifikant	8
Benzo[a]pyren	30 µM	0,100	nicht signifikant	3
Benzo[a]pyren	50 µM	0,008	sehr signifikant	5

#### 24 h Co-Inkubation mit 4-Aminobiphenyl + 1 µM Benzo[a]pyren

Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
4-Aminobiphenyl	1 µM	1,000	nicht signifikant	3
4-Aminobiphenyl	3 µM	1,000	nicht signifikant	3
4-Aminobiphenyl	10 µM	0,400	nicht signifikant	3
4-Aminobiphenyl	50 µM	—	zytotoxisch	3
Benzo[a]pyren	1 µM	0,100	nicht signifikant	3
1 µM Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	1 µM	0,100	nicht signifikant	3
1 µM Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	3 µM	0,100	nicht signifikant	3

1 µM Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	10 µM	0,100	nicht signifikant	3
1 µM Benzo[a]pyren + 4-Aminobiphenyl	50 µM		zytotoxisch	3

### 24 h Inkubation mit Zigarettenrauchkondensat

Testsubstanz	Konzentration	p-Wert	Signifikanz	Anzahl (n)
Kondensat	10 ng/ml	1,000	nicht signifikant	2
Kondensat	100 ng/ml	0,686	nicht signifikant	4
Kondensat	1 µg/ml	0,008	sehr signifikant	5
Kondensat	5 µg/ml	0,100	nicht signifikant	3
Kondensat	10 µg/ml	0,002	sehr signifikant	6

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Hermann M. Bolt danke ich für die interessante Themenstellung, die ständige Gesprächsbereitschaft und Unterstützung. Darüber hinaus möchte ich mich herzlich für die Gelegenheit zur Teilnahme an verschiedenen Kongressen und zahlreichen Fortbildungsveranstaltungen bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Frank Wunderlich bedanke ich mich herzlich für die Betreuung der vorliegenden Arbeit innerhalb des Internationalen Graduiertenkollegs „*Molecular Mechanisms of Food Toxicology*“ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Herrn Prof. Dr. Hartmut Greven möchte ich für die Übernahme des Koreferats dieser Arbeit danken.

Bei Frau Prof. Dr. Regine Kahl bedanke ich mich herzlich für die Aufnahme als Kollegiatin in das Internationale Graduiertenkolleg „*Molecular Mechanisms of Food Toxicology*“ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Mein aufrichtiger Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Dr. Gisela H. Degen für ihre rege Anteilnahme an der vorliegenden Arbeit, die unzähligen lehrreichen Diskussionen und wertvollen Anregungen.

Besonders danke ich Herrn Dr. Wolfram Föllmann für seine Unterstützung während der gesamten Promotionszeit, die hilfreichen Diskussionen und die vielen wertvollen Ratschläge.

Herrn Dr. Walter Schlage von der Philip Morris Research Laboratories GmbH in Köln danke für die Bereitstellung des Zigarettenrauchkondensats „2R4F“.

Herrn PD Dr. Peter H. Roos danke ich für die Bereitstellung des monoklonalen anti-CYP1A1 Antikörpers „MAb1A3-03“ und des Western Blot Standards „3-MC Mikrosomen“.

Bei Herrn Dr. Sascha Birkner, meinem ehemaligen Laborleiter im Marienhospital Herne II, bedanke ich mich für die guten Ratschläge.

Gerd Zimmermann danke ich herzlich für die zahlreichen Fahrten zum Schlachthof nach Lünen und die vielen Arbeiten im Hintergrund, die einen reibungslosen Laboralltag ermöglicht haben.

Martina Koch, Anke Jung und Ingrid Ester danke ich für die Unterstützung im Labor und die sehr nette Zusammenarbeit.

Ingeborg Bichbäumer danke ich herzlich für die Einweisung in die Western Blot Technik.

Mein ganz besonderer Dank geht an Nina Ludwigs für ihre wertvolle Hilfe im Labor.

---

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Mitglieder des Verbundprojektes – Dr. Claudia Behm, Dr. Alexandra Kutz, Dr. Alexander Wolf, PD Dr. Jürgen Kuhlmann und Dr. Wolfram Föllmann – für die gute Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft. Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle noch einmal bei Claudia für die Überlassung von Mikrokern Daten bedanken.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Dr. Stefan Lebrun, Susanne Dorn, Sebastian Tschirbs, Christina Köhler, Stefan Moors, Dr. Ana Laura Di Virgilio, Dr. Daniela Bonacker und Yury Lektarau für die gute Zusammenarbeit und ihre Freundschaft bedanken.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung für Toxikologie des IfADo für das phantastische Betriebsklima und die sehr angenehme Zusammenarbeit. Stellvertretend möchte ich Doris Dannappel, Silke Hankinson, Beate Graf und Brigitte Tibbe nennen.

Meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben, danke ich für ihre ständige Unterstützung.

Lieber Olaf, Dir danke ich für Deine Geduld und Ehrlichkeit, wodurch Du mir sehr geholfen hast.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Sabine Plöttner  
geboren am 24.01.1975 in Lünen  
Diplom-Biologin

## Schulbildung

1981 – 1985                      Leoschule in Lünen  
1985 – 1994                      Freiherr-vom-Stein-Gymnasium in Lünen  
Mai 1994                          Abitur

## Schülerauslandsaufenthalt

Aug. 1991 – März 1992              Mayde Creek High School in Houston, Texas, USA  
  
Stipendium im Rahmen des Parlamentarischen Patenschaftsprogramms, getragen vom Deutschen Bundestag und vom Kongress der Vereinigten Staaten von Amerika

## Hochschulstudium

Okt. 1994 – Jan. 2000              Biologiestudium an der Ruhr-Universität Bochum (RUB)  
März 1997                          Vordiplom  
Nov. 1998 – Jan. 2000              Diplomarbeit bei Prof. Dr. Frank W. Falkenberg in der Arbeitsgruppe für Immunologie am Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie, RUB  
  
Titel der Diplomarbeit: „Untersuchungen über die Wirksamkeit von depotgebundenen biologisch wirksamen Molekülen als Adjuvantien in Vakzinen gegen Tumoren und lösliches Antigen“  
  
Jan. 2000                          Diplom

## Beruflicher Werdegang

- Feb. 2000 – Apr. 2000      Wissenschaftliche Hilfskraft von Prof. Dr. Frank W. Falkenberg in der Arbeitsgruppe für Immunologie am Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie, RUB
- Mai 2000 – Mai 2002      Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Wissenschaftlichen Labor der Urologischen Klinik Marienhospital II in Herne, Universitätsklinik der RUB, unter der Leitung von Prof. Dr. Theodor Senge, in der Arbeitsgruppe von Dr. Andreas Hinkel
- Wissenschaftliche Mitarbeit am DFG-Projekt „Autologe Tumorantigen-beladene Dendritische Zellen: Entwicklung eines therapeutischen Konzepts für fortgeschrittene urologische Tumoren“
- seit Juni 2002              Kollegiatin im Internationalen Graduiertenkolleg „*Molecular Mechanisms of Food Toxicology*“ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund (IfADo) in der Projektgruppe „Biomarker und Fremdstoffwirkungen“, experimentelle Arbeiten zur Dissertation am IfADo bei Prof. Dr. Dr. Hermann M. Bolt
- Wissenschaftliche Mitarbeit am Kooperationsprojekt „*Development and application of an in vitro system for detection and quantitation of urothelial genotoxicity of tobacco smoke-specific constituents utilizing classical genotoxic endpoints and cDNA expression profiling*“ zwischen dem IfADo (Dr. Wolfram Föllmann, Prof. Dr. Dr. Hermann M. Bolt) und dem Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund (PD Dr. Jürgen Kuhlmann)

## Berufliche Fortbildung

- seit Feb. 2001              Weiterbildung zur Fachtoxikologin der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)

Dortmund, den 31.08.2006

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Dortmund, den 31.08.2006

