

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie

der Universität Würzburg

Lehrstuhl für Toxikologie

Vorstand: Professor Dr. rer. nat. Helga Stopper

**In vitro Untersuchung zur Genotoxizität ausgewählter
Pyrrolizidinalkaloide**

**Assessment of in vitro genotoxicity of selected pyrrolizidine
alkaloids**

Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Graduate School of Life Sciences

Vorgelegt von

Lea Marie Schott

aus Hösbach

Würzburg 2021



Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Thomas Haaf

1. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper
2. Betreuer: Prof. Dr. Leane Lehmann
3. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Samuel Samnick
4. Betreuer: Dr. Ezgi Eylül Bankoglu

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:
.....

Die Promovendin ist Zahnärztin

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Pyrrolizidinalkaloide.....	1
1.1.1 Vorkommen	1
1.1.2 Chemische Struktur und Klassifizierung	2
1.1.3 Bioaktivierung und Metabolisierung.....	5
1.1.4 Toxizität	7
1.2 Gesetzliche Regulierungen	10
1.3 PA-kontaminierte Lebensmittel	11
1.4 Zielsetzung.....	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Testsubstanzen	15
2.1.2 Allgemeine Chemikalien	16
2.1.3 Geräte und Materialien	17
2.1.4 Puffer und Lösungen	18
2.1.5 Software	20
2.2 Zellkultur.....	20
2.2.1 Zelllinie Huh6	20
2.2.2 Auftauen der Zellen	21
2.2.3 Kultivierung der Zellen	21
2.2.4 Mykoplasmentest.....	21
2.3 Mikrokerntest.....	22
2.3.1 Theoretische Grundlagen	22
2.3.2 Durchführung.....	23
2.3.3 Auswertung.....	24
2.4 Ethoxyresorufin-O-deethylase – Assay	25
2.4.1 Theoretische Grundlagen	25
2.4.2 Durchführung.....	25
2.4.3 Auswertung.....	27
2.5 Glutathion – Assay	27

2.5.1	Theoretische Grundlagen	27
2.5.2	Durchführung	27
2.5.3	Auswertung.....	28
2.6	Dihydroethidium – Assay.....	28
2.6.1	Theoretische Grundlagen	28
2.6.2	Durchführung	29
2.6.3	Auswertung.....	30
2.7	Tetramethylrhodamine-Ethyl-Ester – Assay	30
2.7.1	Theoretische Grundlagen	30
2.7.2	Durchführung	30
2.7.3	Auswertung.....	31
2.8	Statistische Methoden	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Mikrokerntest – mit und ohne Cytochalasin-B	33
3.2	Genotoxizität der Testsubstanzen	35
3.2.1	Lasiocarpin	35
3.2.2	Senecionin	36
3.2.3	Seneciphyllin.....	38
3.3	Bestimmung der CYP1A-Enzymaktivität	40
3.4	Oxidativer Stress in der Genotoxizität von Lasiocarpin	42
3.4.1	Einfluss von Lasiocarpin auf den Glutathion-Gehalt	42
3.4.2	Induktion von oxidativem Stress im Mikrokerntest	43
3.5	Protektive Effekte des Anthocyans Delphinidin gegen die Genotoxizität von Lasiocarpin im Mikrokerntest	45
3.5.1	Untersuchung der Superoxid-Produktion	49
3.5.2	Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials	50
4	Diskussion	52
4.1	Mikrokerntest – mit und ohne Cytochalasin-B	52
4.2	Genotoxizität der Testsubstanzen	52
4.3	Enzymaktivität der CYP1A in den Huh6 Zellen	56
4.4	Lasiocarpin - Die Rolle von Glutathion und der Einfluss auf die Genotoxizität	58
4.5	Protektive Effekte des Anthocyans Delphinidin im Mikrokerntest.....	61
5	Zusammenfassung	67
6	Summary	69
	Literaturverzeichnis	71

Verzeichnisse

Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Eidesstattliche Erklärung.....	81
Danksagung.....	82

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Grundstruktur der Pyrrolizidinalkaloide	2
Abb. 2: Necinbasengruppen	3
Abb. 3: Metabolisierungswege der PA	6
Abb. 4: Strukturelle Voraussetzungen der PA-Toxizität.....	8
Abb. 5: Wege der Metabolisierung des reaktiven Pyrrolesters (DHPA).....	9
Abb. 6: Chemische Struktur von Lasiocarpin	15
Abb. 7: Chemische Struktur von Senecionin und Seneciphyllin	15
Abb. 8: Darstellung der Huh6 Zellen nach GelGreen Färbung.....	22
Abb. 9: Umwandlung von Ethoxyresorufin in Resorufin	25
Abb. 10: Darstellung der Zellkerne in den Huh6 Zellen mittels DHE-Färbung..	29
Abb. 11: Darstellung der Mitochondrien in den Huh6 Zellen mittels TMRE-Färbung.....	31
Abb. 12: Genotoxizität von Lasiocarpin: links mit Cyt-B, rechts ohne Cyt-B.....	33
Abb. 13: Mikrokernfrequenz von Lasiocarpin: links mit Cyt-B, rechts ohne Cyt-B	34
Abb. 14: Genotoxizität von Lasiocarpin	35
Abb. 15: Mikrokernfrequenz von Lasiocarpin	36
Abb. 16: Genotoxizität von Senecionin.....	37
Abb. 17: Mikrokernfrequenz von Senecionin.....	38
Abb. 18: Genotoxizität von Seneciphyllin	39
Abb. 19: Mikrokernfrequenz von Seneciphyllin.....	40
Abb. 20: Fluoreszenzintensität der Standardreihe zur Bestimmung der CYP1A-Aktivität.....	41
Abb. 21: Enzymaktivität der CYP1A (in %) der Huh6 Zellen	42
Abb. 22: Glutathion-Gehalt in Huh6 Zellen nach Lasiocarpin-Behandlung.....	43
Abb. 23: Glutathion-Reduktion in Huh6 Zellen	44
Abb. 24: Genotoxizität von Lasiocarpin unter Glutathion-Depletion	45
Abb. 25: Reduktion des Delphinidin-Signals	46
Abb. 26: Anstieg des Carbinol-Pseudobasen-Signals	46
Abb. 27: Kombinationsbehandlung von Delphinidin (10 µM) und Lasiocarpin..	48
Abb. 28: Kombinationsbehandlung von Delphinidin (3,2 µM) und Lasiocarpin.	49

Verzeichnisse

Abb. 29: Superoxidproduktion nach Lasiocarpin-Behandlung.....	50
Abb. 30: Änderung des mitochondrialen Membranpotentials (% pro Zelle).....	51

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Typische Verbindungen von Nucinbasen mit Nucin säuren	4
Tab. 2: Aufstellung belasteter Lebensmittel	12
Tab. 3: Spezielle Chemikalien	16
Tab. 4: Laborgeräte	17
Tab. 5: Verbrauchsmaterialien	18
Tab. 6: Puffer und Lösungen	19
Tab. 7: Software und Auswertungsprogramme	20
Tab. 8: Pipettierschema	26
Tab. 9: Konzentrationen und Funktion der Substanzen	26

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
#	Zahl
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µMol	Mikromol
AMA	Antimycin A
B	behandelte Zellen
BaP	Benzo(a)pyren
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMDL ₁₀	Benchmark-Dose-Lower-Limit
BSA	bovines Serumalbumin
BSO	L-Buthionin-sulfoximin
bzw.	beziehungsweise
cm ³	Kubikzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPA	Cyclophosphamid
CYP	Cytochrom P450
Cyt-B	Cytochalsin-B
d	Tag (day)
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan
degrad. Del	gelagertes Delphinidin
Del	Delphinidin
DHE	Dihydroethidium (5-ethyl-5,6-dihydro-6-phenyl-3,8-diaminophenanthridine)
DHP	6,7-Dihydropyrrolizidin-Alkohole
DHPA	Pyrrolester/Dehydropyrrolizidinalkaloid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
Durch.	Durchschnitt

Verzeichnisse

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	European Food Safety Authority (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit)
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylase
etc.	et cetera
FACS	fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FDA	Food and Drug Administration (Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der USA)
g	Gramm
GSH	Glutathion, (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin)
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
Kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
LC	Lasiocarpin
LC/MS/MS	liquid chromatography/tandem mass spectrometry
M	Molar (mol/L)
MBC	Monochlorobiman
mg	Milligramm
min	Minute(n)
MK	Mikrokern
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOE	Margin-of-Exposure
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADP ⁺ / NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat

Verzeichnisse

NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NB	Nicht-behandelte Zellen
nM	Nanomol
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanz)
Nu	Nukleophile Gruppe
O ₂	Sauerstoff
PA	Pyrrrolizidinalkaloid(e)
PANO	PA-N-Oxid
PBS	phosphat buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
pH	negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
NP	Natriumphosphat
rpm	rotations per minute (Umdrehung pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SC	Senecionin
SP	Seneciophyllin
Tab.	Tabelle
TMRE	Tetramethylrhodamine-Ethyl-Ester
USA	United States of America
UV	ultraviolet
VOD	veno-occlusive-disease (venöse okklusive Leberkrankheit)
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
γH2AX	phosphoryliertes Mitglied X der H2A-Histonfamilie

1 Einleitung

1.1 Pyrrolizidinalkaloide

1.1.1 Vorkommen

Pyrrolizidinalkaloide (PA) sind sekundäre Pflanzenstoffe, die in erster Linie zur Abwehr von Herbivoren produziert werden. Gelangen PA über die Nahrung in den menschlichen Organismus, werden sie in der Literatur als hepatotoxisch, genotoxisch und karzinogen beschrieben (Mattocks, Driver et al. 1986).

Über 95 % der Pyrrolizidinalkaloide kommen in den Pflanzenfamilien der *Asteraceae* (Korbblütler), *Boraginaceae* (Raublattgewächse), *Fabaceae* (Hülsenfrüchtler) sowie *Orchidaceae* (Orchideengewächse) vor (Hartmann und Witte 1995). Die Biosynthese der PA wird im Laufe der Vegetationsperiode durch die Pflanze reguliert (Schramm, Kohler et al. 2019) und ist exemplarisch von Hartmann, Ehmke et al. (1989) in *Senecio*-Spezies untersucht worden. Dabei spielt das Enzym Homospermidin-Synthase im ersten Syntheseschritt des Vorläufermoleküls Homospermidin eine entscheidende Rolle (Ober und Hartmann 1999). Die Homospermidin-Synthase wird vor allem zu Beginn der Wachstumsperiode exprimiert, nimmt mit fortschreitender Blütenentwicklung ab und ist schließlich zum Zeitpunkt der Fruchtproduktion nicht mehr nachzuweisen (Anke, Niemüller et al. 2004).

Eine Studie mit *Senecio vulgaris* (gewöhnliches Greiskraut) konnte zeigen, dass die Synthese der PA ausschließlich in den Wurzeln stattfindet und anschließend ein Transport des Endprodukts, des PA Senecionin-N-Oxid, in die Blüten erfolgt (Hartmann, Ehmke et al. 1989). Andere Pflanzenfamilien dagegen produzieren die PA direkt in den Blüten, beispielsweise *Heliotropium* (Sonnenwenden) (*Boraginaceae*) (Birecka, Birecki et al. 1987) oder *Crotalaria spectabilis* (*Fabaceae*) (Nowacki und Byerrum 1962). Daher unterscheidet sich innerhalb der Pflanze die Verteilung der PA. Hohe Konzentrationen sind vor allem in den Wurzeln, Trieben sowie Blütenständen zu finden, wohingegen die Blätter einen vergleichsweise geringen PA-Gehalt aufweisen (Hartmann, Ehmke et al. 1989). Insgesamt herrscht hier eine große Varianz unter den Pflanzenspezies.

1.1.2 Chemische Struktur und Klassifizierung

Chemisch gesehen bestehen PA aus einer Necinbase, die mit einer Necinsäure verestert ist. Bei der Necinbase handelt es sich um ein Derivat des bicyklischen Alkohols 1-Hydroxymethylpyrrolizidin, der grundsätzlich aus zwei gesättigten C5-Ringe besteht, welche über ein Stickstoffatom verbunden sind (Molyneux, Gardner et al. 2011, Abb. 1). Die Necinbase hat eine bzw. zwei Hydroxylgruppen entweder an C1 und/oder C7 gebunden, in einigen Fällen sogar eine dritte Hydroxylgruppe an C2 oder C6 (Moreira, Pereira et al. 2018). PA existieren nicht nur als sogenannte freie oder tertiäre Basen, sondern liegen vor allem in Pflanzen auch als N-Oxide vor (PA-N-Oxid, PANO) (Schramm, Kohler et al. 2019). PANOs stellen zwar Derivate der jeweiligen PA dar, sie unterscheiden sich jedoch in ihren physikalischen Merkmalen und ihrer Metabolisierung. Beispielsweise sind PANOs, im Gegensatz zu den eher lipophilen freien Basen, sehr gut wasserlöslich (Molyneux, Gardner et al. 2011).

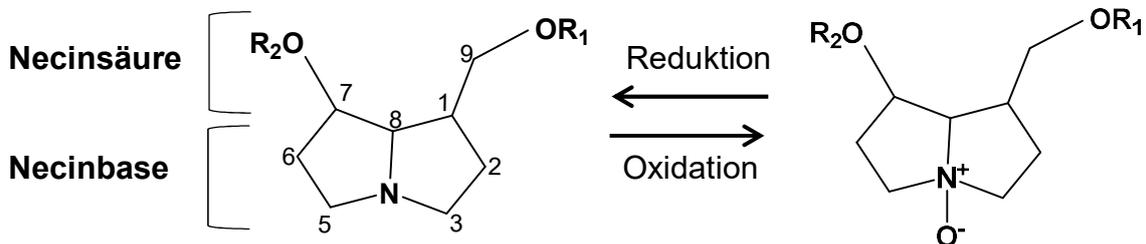


Abb. 1: Grundstruktur der Pyrrolizidinalkaloide

Zu sehen ist die Umwandlung der tertiären Base in das zugehörige N-Oxid durch einfache Oxidation bzw. Reduktion (modifiziert nach (Kempf 2009, Chen, Mei et al. 2010)).

Anhand der Necinbase lassen sich PA in vier Hauptgruppen unterteilen: Retronecin-, Heliotridin-, Otonecin- und Platynecin-Typen (Moreira, Pereira et al. 2018, Abb. 2). Die ungesättigte Doppelbindung zwischen dem C1- und C2-Atom der Retronecin-, Heliotridin sowie Otonecin-Typen spielt eine wichtige Rolle für deren Toxizität. In der Natur sind am häufigsten PA des Retronecin-Typs zu finden (Schramm, Kohler et al. 2019).

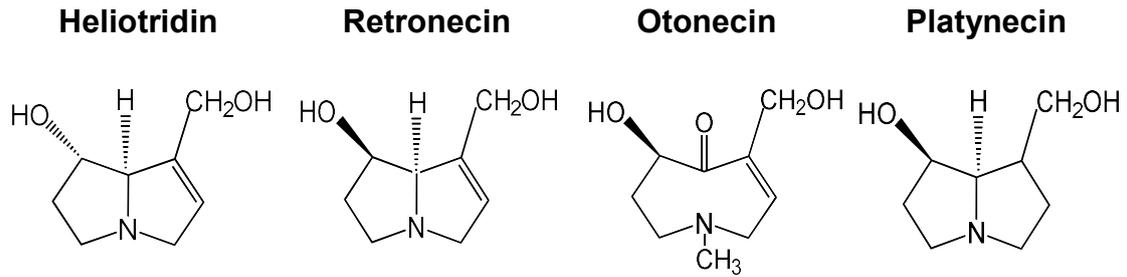


Abb. 2: Necinbasengruppen

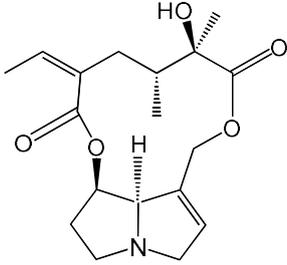
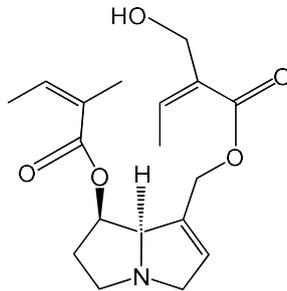
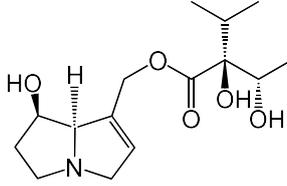
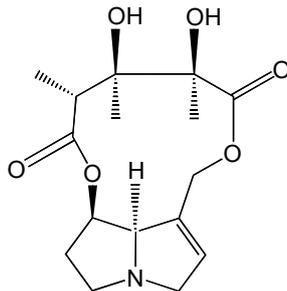
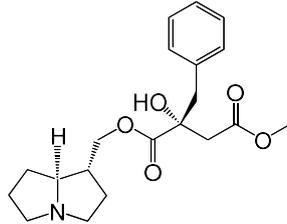
Dargestellt sind die vier Necinbasengruppen: Heliotridin und Retronecin sind Stereoisomere (am C7 Atom orientiert); Otonecin besitzt am N-Atom eine zusätzliche Methylgruppe; Platynecin besitzt keine Doppelbindung (modifiziert nach (Moreira, Pereira et al. 2018)).

Bei den Necinsäuren handelt es sich um Mono- oder Dicarbonsäuren, die häufig durch verschiedene Substituenten, wie beispielsweise Hydroxy-, Epoxy-, Carboxy-, Acetoxy oder Methoxy-Gruppen modifiziert sind (Kempf 2009). Die Veresterung mit der Necinbase findet typischerweise an deren C1- und/oder C7-Atom statt, sodass sich Monoester, offenkettige Diester oder makrozyklische Diester bilden.

Je verzweigter die Säure, desto größer sind sterische Hindernisse und umso schwieriger der Abbau durch beispielsweise Esterasen. Daher unterscheiden sich PA in ihrer toxischen Potenz. Als schädlichste Gruppe gelten makrozyklische Diester, gefolgt von offenkettigen Diestern und den Monoestern, welche am leichtesten hydrolysiert werden können (Mattocks, Driver et al. 1986).

Zahlreiche chemische Variationen der Necinsäuren führen zu einer außerordentlich hohen Strukturvielfalt von über 600 unterschiedlichen PA in mehr als 6.000 Pflanzenarten (Ober und Kaltenecker 2009, Schramm, Kohler et al. 2019). Anhand der bevorzugten Verbindung von bestimmten Necinsäuren mit Necinbasen wurden die PA in fünf Gruppen unterteilt (Hartmann und Witte 1995, Tab. 1).

Tab. 1: Typische Verbindungen von Necinbasen mit Necinsäuren
(modifiziert nach (Hartmann und Witte 1995, Kempf 2009))

Gruppe	Vorkommen	Anteil an PA-Gesamtzahl	
1) Senecionin-Typ (>100 Strukturen)		Asteraceae (Senecioneae)	88 %
2) Triangularin-Typ (> 50 Strukturen)		Asteraceae (Senecioneae) Boraginaceae	13 % 11 %
3) Lycopsamin-Typ (>100 Strukturen)		Asteraceae (Eupatorieae) Boraginaceae	88 % 88 %
4) Monocrotalin-Typ (>30 Strukturen)		Fabaceae (Crotalaria)	72 %
5) Phalaenopsin-Typ (>20 Strukturen)		Orchidaceae	94 %

Die Substanzen der Senecionin- und Lycopsamin-Gruppe mit >100 Strukturen sind in der Natur am häufigsten zu finden. Dabei entstehen durch kleine chemische Modifikationen viele unterschiedliche PA aus derselben Grundstruktur (Tamariz, Burgueno-Tapia et al. 2018).

Auffällig ist, dass die chemische Struktur der offenen Diester (Gruppe 2) den jeweiligen makrozyklischen Diestern aus Gruppe 1 bzw. Gruppe 3 sehr ähnlich sind (Hartmann und Witte 1995). Der Phalaenopsin-Typ (Gruppe 5) stellt aus zwei Gründen eine Besonderheit dar. Er wird ausschließlich in *Orchidaceae* gebildet und seine Necinbase (Platynecin) enthält keine Doppelbindung, weshalb diese PA als weniger toxisch gelten (Molyneux, Gardner et al. 2011).

1.1.3 Bioaktivierung und Metabolisierung

Nach der oralen Aufnahme und Absorption im Gastrointestinaltrakt, werden PA in der Leber über drei unterschiedliche Stoffwechselwege metabolisiert (Abb. 3). Eine Möglichkeit stellt die Hydrolyse der Estergruppe durch Carboxylesterasen dar, sodass anschließend eine Necinbase und eine Necinsäure entstehen, welche über die Niere ausgeschieden werden (Roeder 1995, Fu, Xia et al. 2004). Zwei weitere Optionen sind die N-Oxidation zu einem PANO oder die Aktivierung zu einem reaktiven Pyrrolester (Moreira, Pereira et al. 2018). Dieser reaktive Pyrrolester - ein sehr instabiler Metabolit - entsteht aus PA der Retronecin- und Heliotridin-Gruppe durch Hydroxylierung eines C3 oder C8-Atoms mit darauffolgender spontaner Dehydratation zu einem (\pm)-6,7-Dehydro-7-hydroxy-1-Hydroxymethyl-5H-pyrrolizidin-Ester (DHPA). Für PA der Otonecin-Gruppe findet anstelle der Hydroxylierung eine oxidative N-Demethylierung mit anschließender Ringschließung statt (Fu, Xia et al. 2004). Vermutlich verursacht unter anderem dieser Pyrrolester die schädliche Wirkung der PA, indem er mit OH-, SH-, oder NH-Gruppen von Proteinen und der DNA interagiert (Schramm, Kohler et al. 2019). Er konnte allerdings wegen seiner sehr hohen Reaktivität bisher nur indirekt durch Addukte nachgewiesen werden (Lin, Cui et al. 2000).

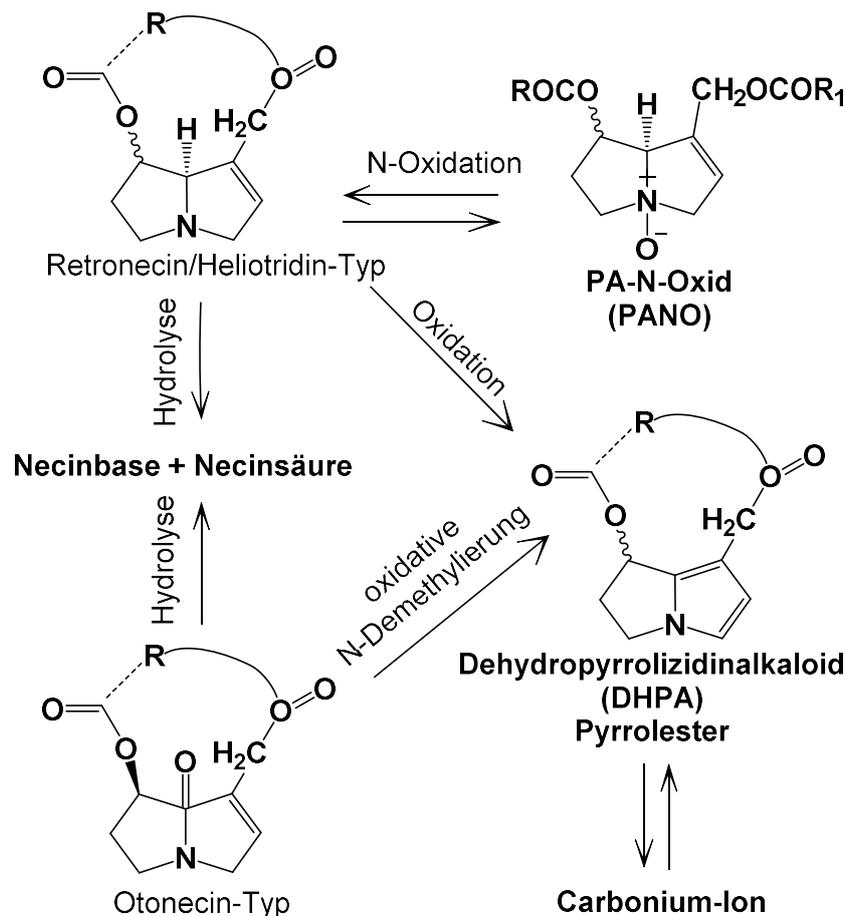


Abb. 3: Metabolisierungswege der PA

Zu sehen sind drei verschiedene Metabolisierungswege der Pyrrrolizidinalkaloide (PA): Hydrolyse, N-Oxidation zu einem PA N-Oxid (PANO) sowie Oxidation bzw. oxidative N-Demethylierung. Der entstandene Pyrrolester (DHPA) ist sehr instabil und kann sich in den Zwischenmetaboliten, das Carbonium-Ion umwandeln (modifiziert nach (Fu, Xia et al. 2004, Moreira, Pereira et al. 2018)).

Die Metabolisierung der PA wird durch Isoformen der Cytochrom-P450-Enzyme (CYP-Enzyme) katalysiert, die jeweils eine unterschiedliche Aktivität für verschiedene PA zeigen. Die Arbeitsgruppe um Ruan, Yang et al. (2014) konnte nachweisen, dass in der Metabolisierung der Retronecin-Typen generell CYP3A4 und CYP3A5 sehr wichtig sind. Zudem zeigte sich für das bekannte PA Lasiocarpin unter anderem eine Induktion der CYP1A1. Als weitere wichtige Isoform für die Metabolisierung zahlreicher PA wird in der Fachliteratur außerdem CYP2B genannt (Fu, Xia et al. 2004, Moreira, Pereira et al. 2018). Für die N-Oxidierung von PA sind zusätzlich flavinhaltige Monooxygenasen verantwortlich (Fu, Xia et al. 2004).

Als Entgiftungsweg wird eine Konjugation der PANOs mit anschließender Ausscheidung über den Urin beschrieben (Mattocks 1968, Moreira, Pereira et al. 2018). Dennoch sollten PANOs nicht generell als unschädlich angesehen werden, da eine Untersuchung von Molyneux, Johnson et al. (1991) darauf hin deutet, dass die freie Base und das PANO des PA Riddelliin in Kälbern toxische Eigenschaften besitzen.

Neben der N-Oxidation wird zudem eine Entgiftung der PA mittels Glutathion von zahlreichen Autoren in Betracht gezogen (Fu, Xia et al. 2004, Schramm, Kohler et al. 2019). Die Bildung eines 7-GSH-DHPA-Konjugats konnte bereits mittels NMR-Spektroskopie für Clivorin nachgewiesen werden (Lin, Cui et al. 2000). Offene Fragen bleiben bezüglich der weiteren Auswirkungen eines solchen GSH-DHPA-Addukts. Werden beispielsweise große Mengen an Glutathion depletiert, können oxidativer Stress und Zellschäden die Folge sein.

1.1.4 Toxizität

Wie bereits erwähnt, besitzen PA genotoxische, hepatotoxische und karzinogene Eigenschaften. Als Auslöser gelten die durch CYP-Enzyme gebildeten reaktiven Pyrrolester (genauer Mechanismus: Abschnitt 1.1.3). Strukturelle Voraussetzungen der PA stellen dabei die 1,2-ungesättigte Bindung (A), eine Veresterung der Allyl-Hydroxy-Gruppe am C9 (B) und eine freie oder veresterte Hydroxygruppe am C7 (C) dar (Culvenor, Edgar et al. 1976, Kempf 2009, Abb. 4).

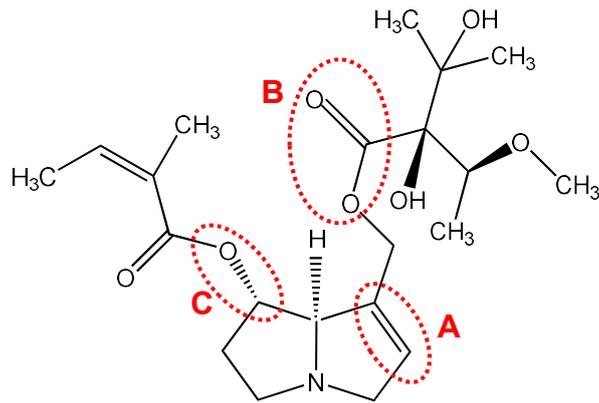


Abb. 4: Strukturelle Voraussetzungen der PA-Toxizität

Am Beispiel von Lasiocarpin ist die Doppelbindung (A), die Esterbindung der Allyl-Hydroxy-Gruppe am C9 (B) sowie eine veresterte Hydroxygruppe am C7 (C) dargestellt (modifiziert nach (Kempf 2009)).

1.1.4.1 Genotoxizität – Mechanismus

In zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen wurden DNA-Addukte, DNA-Quervernetzungen, DNA-Brüche, Schwesterchromatidaustausche, Chromosomenaberration, Mikrokernentstehung sowie Gen- und Chromosomenmutationen durch PA nachgewiesen (Chen, Mei et al. 2010). Diese genotoxischen Schäden werden entweder durch den Pyrrolester direkt oder eventuell auch durch pyrrolesterhaltige Addukte verursacht (Allemang, Mahony et al. 2018).

Die Pyrrolester können durch Hydrolyse der Estergruppen in die etwas stabileren, aber dennoch toxischen 6,7-Dihydropyrrolizidin-Alkohole umgewandelt werden (Edgar, Colegate et al. 2011). Aufgrund der Stereoisomerie der Necinbase existieren für diesen Metabolit zwei Formen: Dehydroretronecin und Dehydroheliotridin. Beide Metabolite können über den Zwischenschritt eines Carbonium-Ions ineinander umgewandelt werden (Fu, Xia et al. 2004). Addukte mit nukleophilen funktionelle Gruppen können über das C7-Atom des Carbonium-Ions (Edgar, Colegate et al. 2011) oder über eine Bindung mit dem C9-Atom der Necinbase geformt werden (Chen, Mei et al. 2010). Dabei reagieren sowohl der Pyrrolester, als auch die stabileren 6,7-Dihydropyrrolizidin-Alkohole mit der DNA bzw. Proteinen (Abb. 5).

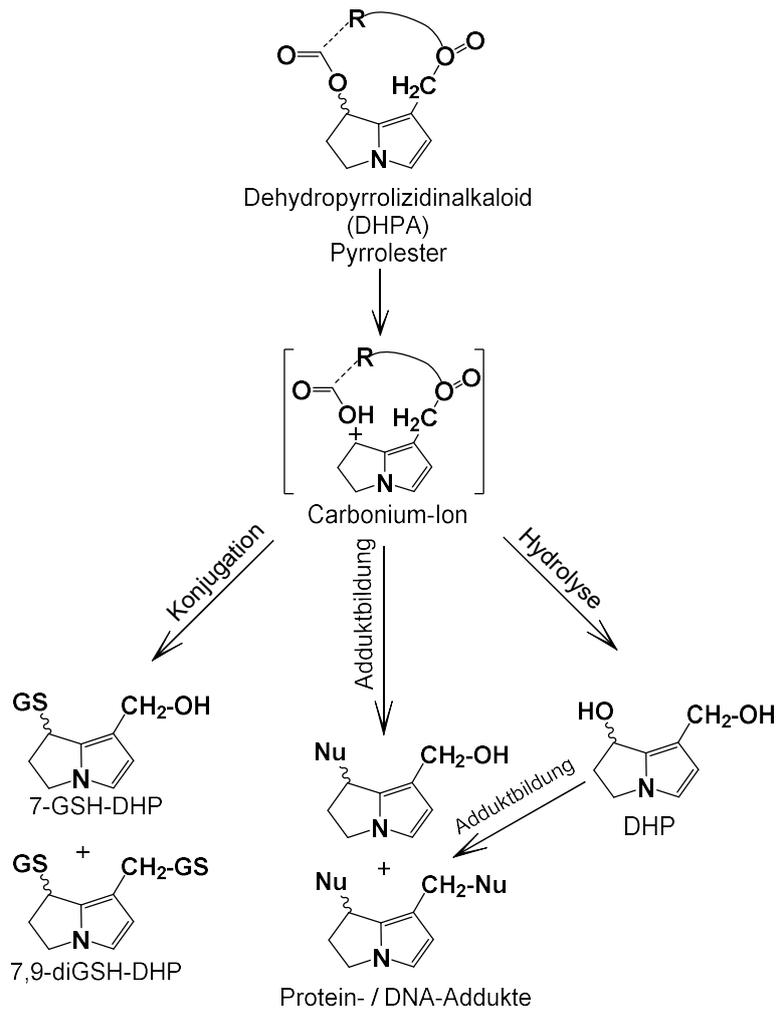


Abb. 5: Wege der Metabolisierung des reaktiven Pyrrolesters (DHPA)

Zu sehen ist die Adduktbildung des Pyrrolesters (DHPA) bzw. Carbonium-Ions mit nukleophilen Gruppen (Nu) wie S-Protein oder N-DNA, die Konjugation mit Glutathion (GSH) und die Hydrolyse zu den etwas stabileren 6,7-Dihydropyrrolizidin-Alkoholen (DHP) (modifiziert nach (Fu, Xia et al. 2004)).

1.1.4.2 Akute und chronische Toxizität

Der Verzehr von pyrrolizidinhaltigen Pflanzen(-bestandteilen) oder verunreinigten Lebensmitteln hat in der Vergangenheit bei Menschen und Tieren zu Vergiftungsfällen geführt (Molyneux, Gardner et al. 2011). Das typische Krankheitsbild einer subakuten PA-Vergiftung ist die sogenannte hepatische venöse okklusive Leberkrankheit ("veno-occlusive-disease"; VOD). Die in der Leber aktivierten kurzlebigen Pyrrolester schädigen dort unmittelbar die Hepatozyten und endothelialen Zellen der Sinusoide (Edgar, Colegate et al. 2011). Langlebigere Metabolite hingegen werden über das Blut in die Lunge

transportiert und führen in den alveolären Kapillaren zu gefäßobstruktiven Effekten (Edgar, Colegate et al. 2011). Weitere Organe wie die Niere, der Pankreas oder der Cortex können in Einzelfällen ebenfalls geschädigt werden (Mattocks, Driver et al. 1986, Fu, Xia et al. 2004).

Eine akute Vergiftung geht mit hochgradiger Hepatotoxizität sowie hämorrhagischen Nekrosen einher. Symptome sind Schmerzen im Oberbauch, Oligurie, Übelkeit und Erbrechen (BfR 2007). Nach Schätzungen führt die akute Toxizität bei Menschen in etwa 20 % der Fälle zum Tod (Prakash, Pereira et al. 1999). Es kann auch eine vollständige Heilung innerhalb weniger Wochen stattfinden, jedoch entwickeln einige Personen im Laufe ihres Lebens anschließend eine VOD (Molyneux, Gardner et al. 2011).

Die niedrigste bekannte Dosis, welche eine akute Toxizität im Menschen verursacht, liegt bei 3 mg PA/kg Körpergewicht pro Tag (Junge, 4 Tage, Tod) und 0,8–1,7 mg PA/kg Körpergewicht pro Tag (Mädchen, zweiwöchige Exposition, VOD). Für die Entstehung einer chronischen VOD liegt der aktuelle Grenzwert bei 15 µg PA/kg Körpergewicht pro Tag über einen Zeitraum von sechs Monaten (EFSA 2011).

1.2 Gesetzliche Regulierungen

Bereits im Jahr 1988 hat die "World Health Organization" (WHO) im "International Programme on Chemical Safety" auf die gesundheitlichen Risiken durch PA aufmerksam gemacht (WHO 1988). Daraufhin wurden in Deutschland vorerst Grenzwerte für pflanzliche Arzneimittel festgelegt. Nachdem jedoch in den vergangenen Jahren vermehrt gesundheitliche Risiken durch PA-kontaminierte Lebensmittel bekannt wurden, hat das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR 2013) einen allgemeinen Grenzwert von täglich maximal 0,007 µg PA/kg Körpergewicht festgesetzt. Problematisch hierbei ist, dass für erbgutverändernde Substanzen kein sicherer Grenzwert festgelegt werden kann, da im Prinzip jede noch so geringe Menge zur Erhöhung des Krebsrisikos beitragen kann, wenn der Wirkmechanismus eine direkte DNA-Veränderung ist. Für die Risikoeinschätzung von Lebensmitteln wird daher anstelle von festen Grenzwerten das Margin-of-Exposure (MOE)-Konzept angewendet. Hier wird

ein MOE-Wert aus dem Quotienten der kleinsten Dosis, bei der eine geringe messbare nachteilige Wirkung beobachtet wird, und einer Schätzung zur Höhe der Exposition berechnet. Zur Abschätzung der kleinsten Dosis wird der Benchmark-Dose-Lower-Limit (BMDL₁₀) herangezogen. Diese Grenze wird als Dosis für eine zu erwartende Zunahme des Krebsrisikos von 10 % bestimmt. Der BMDL₁₀ für PA liegt aktuell bei 237 µg/kg Körpergewicht pro Tag und wurde anhand einer chronischen Tierstudie mit Riddelliin bzw. Lasiocarpin abgeleitet (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Knutsen et al. 2017).

Zwar werden Lebensmittel mit MOE-Werten von ≥ 10.000 prinzipiell als unbedenklich angesehen, dennoch lautet die generelle Empfehlung, die Exposition gegenüber PA möglichst gering zu halten (EFSA 2011). Für alle europäischen Länder gelten die Richtlinien der "European Food Safety Authority" (EFSA) mit dem "zero tolerance principle" (Null-Toleranz-Prinzip) in Lebens- und Futtermitteln (Ma, Liu et al. 2018).

1.3 PA-kontaminierte Lebensmittel

PA sind ausschließlich pflanzlichen Ursprungs. Daher sollten im Umkehrschluss alle Lebensmittel, die PA-haltige Pflanzen(-bestandteile) enthalten, als potentielle Kontaminationsquelle angesehen werden. Doch über verunreinigte Futtermittel gelangen PA auch in tierische Produkte wie Honig, Milch, Eier oder Fleisch (Edgar, Colegate et al. 2011).

Die Datenlage für viele Lebensmittel ist noch äußerst gering. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) veröffentlichte in den vergangenen Jahren Stellungnahmen zu Honig, verunreinigten Salatmischungen, Kräutertees/Tees sowie Gewürzen bzw. getrockneten Kräutern. Außerdem wurden durch die EFSA 17 PA vorgeschlagen, die im Screening von Lebensmitteln hauptsächlich zu berücksichtigen sind: Intermedin, Lycopsamin, Senecionin, Senecivernin, Seneciphyllin, Retrorsin, Echimidin, Lasiocarpin und die dazugehörigen N-Oxide sowie Senkirkin (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Knutsen et al. 2017).

Tabelle 2 gibt einen Einblick über die vom BfR publizierten Daten zum PA-Gehalt und den daraus berechneten Expositionsszenarien durch verunreinigte Nahrungsmittel.

Tab. 2: Aufstellung belasteter Lebensmittel

Dargestellt sind jeweils die niedrigste und höchste PA-Belastung aus den durchschnittlichen Langzeitverzehrsmengen belasteter Lebensmittel (BfR 2007, 2013, 2016, 2019).

	Honig	Tee	Salat- mischung	Kräuter
PA-Gehalt (MW) (µg/kg)	19–120	50,8–763,2	220–349	88–20.000
Langzeit- verzehrsmenge (g/kg KG/d)	0,05–0,28	0,03–0,15	20,5	0,024–0,087
PA-Aufnahme (µg/kg KG/d)	0,001–0,018	0,006–0,154	3,7–5,8	0,002–0,348

Aus den Daten wird deutlich, dass vor allem die Summe der Einzelexpositionen zu einer chronischen PA-Belastung zwischen 0,009–0,520 µg/kg Körpergewicht pro Tag (ohne Salat) bzw. 3,709–6,320 µg/kg Körpergewicht pro Tag (mit Salat) führen. Damit wird die empfohlene maximale Tagesdosis von 0,007 µg PA/kg Körpergewicht pro Tag bereits bei den konservativ berechneten Verzehr-Szenarien überschritten.

Von der Kontamination in Tees sind vor allem die Sorten Pfefferminz, Rooibos, Kamille, schwarzer & grüner Tee, Kräuter- und Melissentee sowie Aufgüsse aus Borretsch und Huflattich, betroffen (BfR 2013, Chen, Mulder et al. 2017). Im Falle der Kontamination einer abgepackten Salatmischung aus dem Supermarkt wurden Bestandteile der *Senecio vulgaris* gefunden. Der PA-Gehalt in den Blüten liegt zwischen 0,63–1,00 mg/g Frischgewicht (Borstel, Witte et al. 1989), sodass laut BfR (2007) „akute bis mittelfristige Leberschäden infolge des Verzehrs [...] verunreinigte[r] Salatmischung[en] nicht ausgeschlossen werden können“. Für PA-belastete Kräuter zeigen vorläufige Expositionsszenarien anhand von Modellgerichten, dass die absolute Verzehrsmenge zwar relativ gering ist, aber durch hochbelastete Kräuter, bei längerfristiger Aufnahme

dennoch MOE-Werte kleiner als 10.000 erreicht werden. Liebstöckel, Oregano sowie Majoran enthalten mit 1.781–4.038 µg/kg größere Mengen an PA. Doch vor allem Borretsch, der selbst PA produziert, fällt mit einem sehr hohen durchschnittlichen PA-Gehalt von 50.562 µg/kg auf (BfR 2019) und wird in der „Frankfurter Grünen Soße“ verwendet (essen&trinken 2015).

Ein weiteres Risiko stellen Nahrungsergänzungsmittel aus Blütenpollen PA-haltiger Pflanzen dar. Mit einem mittleren PA-Gehalt von 5,17 µg/g bei einer angeratenen Verzehrmenge von 1–2 Teelöffeln am Tag (ca. 10 g), besteht ein beträchtliches Risiko für eine Vergiftung (Kempf, Heil et al. 2010, BfR 2013).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch kontinuierlichen Verzehr belasteter Lebensmittel MOE-Werte ≤ 10.000 erreicht werden können. Daher ist eine generelle Vermeidung dieser Lebensmittel am sinnvollsten, jedoch lässt sich auch bereits durch die Abwechslung von Produktmarken eine Minimierung hoher Expositionen über längere Zeiträume erreichen.

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit wird das genotoxische Potential der drei ausgewählten PA Lasiocarpin, Senecionin und Seneciophyllin in vitro anhand einer metabolisch kompetenten, vom Menschen stammenden Hepatomzelllinie (Huh6) getestet. Zu diesem Zweck wird der Mikrokerntest als Standardverfahren zur Untersuchung von genotoxischen Substanzen durchgeführt. Zudem wird erstmalig die Enzymaktivität der CYP1A in den Huh6 Zellen in Bezug auf Lasiocarpin bestimmt. Darüber hinaus wird Lasiocarpin als Modell-PA gewählt, um die Wirkungsweise der PA zu analysieren. Dabei soll die Rolle von Glutathion und oxidativem Stress, bei der durch Lasiocarpin induzierten Genotoxizität, untersucht werden. Hierfür wird eine Glutathion-Depletion in den Huh6 Zellen im Mikrokerntest vor der Behandlung mit Lasiocarpin durchgeführt sowie der direkte Einfluss von Lasiocarpin auf den intrazellulären Glutathion-Gehalt gemessen.

Durch eine Kombinationsbehandlung aus Lasiocarpin und dem natürlichen Anthocyan Delphinidin im Mikrokerntest soll eine humane Exposition möglichst realistisch nachgeahmt werden. Da mögliche Schutzeffekt des Delphinidin vor

allem auf antioxidativen Eigenschaften beruhen wird in diesem Zusammenhang zellulärer oxidativer Stress mit Hilfe von zwei verschiedenen Fluoreszenzfärbungen beispielhaft für Lasiocarpin untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Testsubstanzen

Lasiocarpin

Lasiocarpin (Abb. 6) als Beispiel für einen offenkettigen Diester der Heliotridin-Gruppe hat sich bisher als eines der potentesten PA gezeigt (Chen, Mulder et al. 2017, Allemang, Mahony et al. 2018).

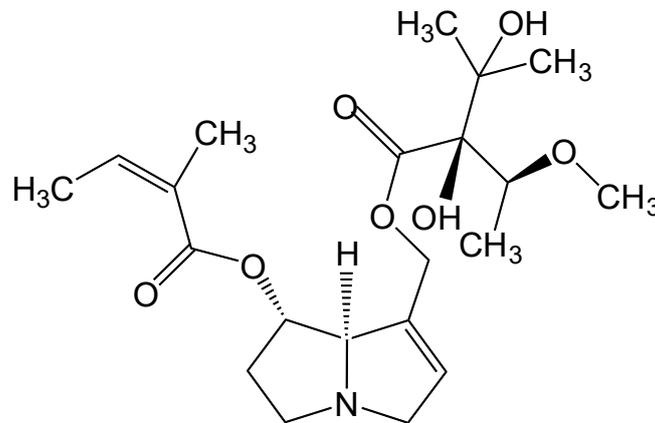


Abb. 6: Chemische Struktur von Lasiocarpin

Senecionin und Seneciphyllin

Als Vertreter der Retronecin-Gruppe mit einem makrozyklischen Diester gehören Senecionin und Seneciphyllin (Abb. 7) zu der am häufigsten in der Natur vorkommenden PA-Gruppe.

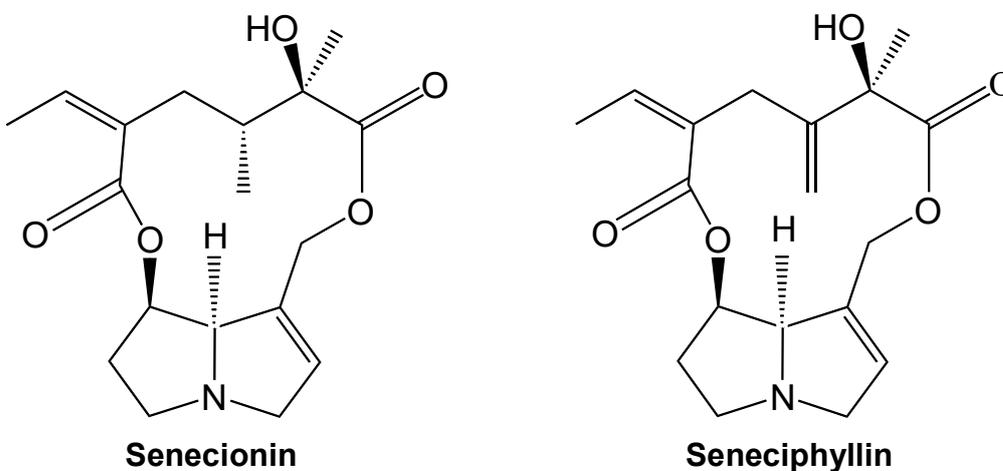


Abb. 7: Chemische Struktur von Senecionin und Seneciphyllin

2.1.2 Allgemeine Chemikalien

Alle zur Erstellung der Arbeit verwendeten Chemikalien werden in Tabelle 3 mit Bezugsquelle aufgeführt.

Tab. 3: Spezielle Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle	
1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan	Sigma-Aldrich	D - München
7-Ethoxyresorufine	SantaCruz Biotechnology	D - Heidelberg
Acetonitril	Carl Roth GmbH	D - Karlsruhe
Antimycin A	Sigma - Aldrich	D - München
Benzo(a)pyren	Sigma - Aldrich	D - München
Cyclophosphamid	Alfa Aesar	D - Karlsruhe
Cytochalasin-B	Sigma-Aldrich	D - Steinheim
Delphinidin	Cayman Chem	MI - Ann Arbor
Dihydroethidium	Merck	D - Schwalbach
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH	D - Karlsruhe
EDTA-Lösung (1 % in PBS)	Biochrom AG	D - Berlin
Fetales Kälberserum	Biochrom GmbH	D - Berlin
Fluorescamine	SantaCruz Biotechnology	D - Heidelberg
GelGreen	Biotium	CA - Fremont
Lasiocarpin	Phyto Lab GmbH	D - Vestenbergsgreuth
L-Buthionin-(S,R)- sulfoximin	Cayman Chemical Company	D- Hamburg
L-Glutamin (200 mM)	Sigma - Aldrich	D - Steinheim
Monochlorobiman	AAT Bioquest	CA - Sunnyvale
Natriumhydrogen- carbonat	Carl Roth GmbH	D - Karlsruhe

Chemikalien	Bezugsquelle	
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat	Sigma - Aldrich	D - München
Penicillin-Streptomycin	Sigma - Aldrich	D - Steinheim
Protein Standard (BSA)	Sigma - Aldrich	D - München
Resorufin	SantaCruz Biotchnology	D - Heidelberg
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich	D - Steinheim
Salzsäure	Merck	D - Schwalbach
Senecionin	Phyto Lab GmbH	D - Vestenbergsgreuth
Seneciphyllin	Phyto Lab GmbH	D - Vestenbergsgreuth
Tetramethylrhodamine-ethyl-ester	Thermo Fisher Scientific	D - Dreieich
Trypsin (1:250) / EDTA-Lösung (0,2 %)	Sigma-Aldrich	D - Steinheim

2.1.3 Geräte und Materialien

Folgende Tabellen enthalten die verwendeten Geräte (Tab. 4) und Verbrauchsmaterialien (Tab. 5).

Tab. 4: Laborgeräte

Geräte	Hersteller	
Brutschrank	Typ B 5060 EK-CO2, Heraus	D - Düsseldorf
Counter	Hartenstein	D - Würzburg
Feinwaage	Sartorius	D - Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse TE 55i, Nikon + Fluoro Pro MP 5000 Kamera, Nikon	D - Düsseldorf
Hämatozytometer	„Neubauerkammer“, Hartenstein	D - Würzburg
Kamera für Fluoreszenzmikroskop	CF 15/2R GB, Kappa Messtechnik GmbH	D - Gleichen
Lichtmikroskop	Eclipse TS 100, Nikon	D - Düsseldorf

Geräte	Hersteller	
Plattenlesegerät	Clariostar BMG LABTECH GmbH	D - Ortenberg
Sterile Werkbank	Gelair BH26, Flow Laboratories GmbH	D - Meckenheim
Zentrifuge	Laborfuge 400e, Heraeus Instruments	D - Hanau
Zytozentrifuge	Cytospin 3, Shandon	GB - Astmore

Tab. 5: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	
"6-well-Plate"	Sarstedt AG	D - Nümbrecht
"12-well-Plate"	Sarstedt AG	D - Nümbrecht
"96-well-Plate"	Sarstedt AG	D - Nümbrecht
Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH	D - Lauda-Königshofen
Eppendorf-Tubes 0,5 ml	Eppendorf AG	D - Hamburg
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH	D - Sondheim
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Carl Roth GmbH	D - Karlsruhe
Röhrchen 15 ml	Sarstedt AG, Thermo Fisher Scientific	D - Nümbrecht D - Schwerte
Röhrchen 50 ml	Sarstedt AG	D - Nümbrecht
Zellkulturflasche (25 cm ³)	Sarstedt AG	D - Nümbrecht
Zellkulturflasche (75 cm ³)	Sarstedt AG	D - Nümbrecht

2.1.4 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden verwendet (Tab. 6). Die Puffer, Lösungen und Verbrauchsmaterialien wurden nach Fertigstellung bzw. vor Gebrauch autoklaviert oder steril gefiltert (0,2 µM Filterporen).

Tab. 6: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Herstellung und Bestandteile	Menge
Bisbenzimid (Gebrauchslösung)	Stammlösung (HOECHST 33858 1 mg/ml in DMSO)	0,5 ml
	PBS	99,5 ml
DABCO (pH 8,6) (Gebrauchslösung)	1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan	250 mg
	Glycerin	90 ml
GelGreen (Gebrauchslösung)	Gel Green nucleic acid stain	10 µl
	destilliertes Wasser	990 µl
Natronlauge (5 M)	Natriumhydroxid	200 g
	destilliertes Wasser	1.000 ml
Nährmedium	RPMI - 1640	500 ml
	Fetales Kälberserum (FBS)	50 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	NaHCO ₃	1.000 mg
PBS-Puffer (pH 7,4)	NaCl	8.000 mg
	KCl	200 mg
	NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O	575 mg
	KH ₂ PO ₄	200 mg
	<u>Vorgehen:</u> Phosphatverbindungen in H ₂ O lösen und zu den bereits in H ₂ O gelösten NaCl und KCl zugeben	
PBS-Puffer (Zellkultur)	100 ml PBS-Puffer mit 900 ml destilliertem Wasser verdünnen	Verhältnis 1:10
PBS/EDTA	1 % EDTA-Lösung mit PBS verdünnt	Verhältnis 1:20
Natriumphosphat- Puffer (50 mM)	Na ₂ HPO ₄	6,7102 g
	NaH ₂ PO ₄	0,47 g
	destilliertes Wasser	800 ml
	(pH auf 8 einstellen und auf 1 l	

Puffer/Lösungen	Herstellung und Bestandteile	Menge
	auffüllen)	
Trypsin (Gebrauchslösung)	Trypsin (1:250) / EDTA-Lösung (0,2 %) mit PBS verdünnt	Verhältnis 1:10

2.1.5 Software

Die Versuche wurden mit den in Tabelle 7 aufgeführten Programmen bzw. Softwares ausgewertet.

Tab. 7: Software und Auswertungsprogramme

Softwares/Auswertungsprogramme	
DHE-Assay/TRME-Assay	Q Capture Pro, Q Imaging Corporation 2003, Media Cybernetics ImageJ, Wayne Rasband, National Institute of Health USA (http://imagej.nih.gov/ij/index.html)
GSH-Assay/ EROD-Assay	Mars Datenanalyse Software, Version des Plattenlesegeräts
Statistik	IBM SPSS Statistic
Literatur	Endnote, Version X8.2
Zeichenprogramm	ChemDraw 18.0

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinie Huh6

Die Huh6 Zelllinie wurde uns von Siegfried Knasmüller (Universität Wien) zur Verfügung gestellt und stammt aus dem Hepatoblastom eines sechsjährigen Jungen aus Japan (Doi 1976, Waldherr, Misik et al. 2018). Die Huh6 Zellen wurden bisher kaum in Genotoxizitätstests verwendet, obwohl ein Vergleich von zwölf verschiedenen Leberzelllinien zeigte, dass sie sehr gut zur Detektion von genotoxischen Substanzen geeignet sind, da sie im Mikrokerntest DNA-Schäden durch Promutagene ohne Zugabe eines exogenen Enzym-Mixes detektierten (Waldherr, Misik et al. 2018, Misik, Nersesyan et al. 2019).

2.2.2 Auftauen der Zellen

Der Auftauvorgang der Zellen wurde in einem 37 °C warmen Wasserbad durchgeführt. Nach dem Auftauen wurden die Zellen unter der sterilen Arbeitsbank mit 6 ml Medium aufgenommen und in ein 15 ml Röhrchen pipettiert. Diese Zellsuspension wurde zentrifugiert (1.000 rpm, 5 Minuten) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 5 ml Medium resuspendiert und in ein Kulturgefäß (25 cm³) überführt. Nach 24 h erfolgte ein Wechsel des Mediums, um tote und nicht adhärente Zellen zu entfernen. Nach weiteren 24 h bzw. 36 h wurden die Zellen in eine größere Kulturflasche (75 cm³) überführt.

2.2.3 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in einem festen Rhythmus von drei bzw. vier Tagen subkultiviert. Unter der sterilen Werkbank wurde das alte Medium entfernt, eine Waschung mit PBS (5 ml) durchgeführt und dann mit PBS/EDTA (3 ml) für 3 Minuten inkubiert. Danach wurde das PBS/EDTA abpipettiert, Trypsin (2 ml) hinzugegeben und erneut für sieben Minuten im Brutschrank inkubiert. Schließlich erfolgte die Inhibition des Trypsins durch Zugabe von Medium (5 ml). Nach Aufnahme der Zellsuspension in eine sterile Glaspipette wurde mehrmals resuspendiert, um die Zellen voneinander zu lösen und sie anschließend in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführen zu können. Es erfolgte die Bestimmung der Zellzahl unter dem Inversionsmikroskop mittels „Neubauerkammer“. Die Zellsuspension (im Röhrchen 15 ml) wurde zentrifugiert (1.000 rpm, 5 Minuten), der Überstand verworfen und das Zellpellet mit frischem Medium (1 ml) resuspendiert. Die gewünschte Anzahl an Zellen (circa 3 x10⁶) wurde mit einer sterilen Pipette aufgenommen und in eine neue Kulturflasche (75 cm³) mit Medium (20 ml) umgesiedelt.

2.2.4 Mykoplasmentest

Zur Kontrolle auf Mykoplasmenbefall wurde in einem Abstand von vier Wochen regelmäßig ein Mykoplasmentest durchgeführt. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert, ein Teil der Zellsuspension auf mehrere Objektträger zentrifugiert und anschließend in Methanol für 2 h fixiert. Zur Färbung wurde der noch feuchte Zellspot mit einem Tropfen Bisbenzimid (Konzentration: 5 µg/ml in PBS)

und einem 21 x 26 mm Deckglas für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach mit PBS abgewaschen und mit DABCO abgedeckt. Für die direkt im Anschluss durchgeführte fluoreszenzmikroskopische Kontrolle wurde ein Filter verwendet, der den Farbstoff mit UV-Licht anregt (UV-Filter).

2.3 Mikrokerntest

2.3.1 Theoretische Grundlagen

Der Mikrokerntest ist ein Standardverfahren zur Untersuchung von genotoxischen Substanzen. Dabei werden DNA-Schäden in Form von Mikrokernfrequenzen quantifiziert. Die Mikrokernfärbung ist beispielhaft für die Huh6 Zellen in Abbildung 8 dargestellt.

Bei einem Mikrokern handelt es sich um eine chromatinhaltige Struktur im

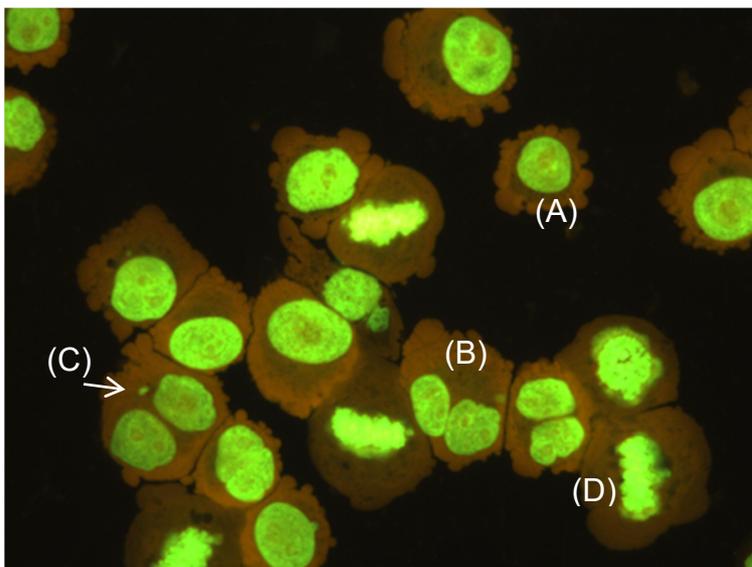


Abb. 8: Darstellung der Huh6 Zellen nach GelGreen Färbung

Zu sehen sind einkernige Zellen (A), doppelkernige Zellen (B), Mikrokerne (C) und Mitosefiguren (D).

Zytoplasma, welche von einer Membran umgeben ist und keine Verbindung zum Zellkern aufweist (Stopper und Muller 1997). Die Größe eines Mikrokerns schwankt zwischen 1/3 bis 1/16 des Durchmessers des Hauptkerns und kann sowohl ein vollständiges Chromosom,

als auch ein oder mehrere Chromosomen-Fragmente enthalten (Fenech 2007). Durch die Behandlung der Zellen mit Cytochalasin-B kommt es zu einer Inhibition der Zytokinese, jedoch nicht der Kernteilung, sodass doppelkernige Zellen entstehen. In der mikroskopischen Auswertung werden die Mikrokerne ausschließlich in doppelkernigen Zellen gezählt, da diese exakt eine einzige Mitose seit Substanzexposition durchlaufen haben. Zusätzlich ist die Erfassung

des Proliferationsindexes möglich, der Aussagen zu zytostatischen Effekten der Testsubstanzen ermöglicht.

Bei der Auswertung von Objektträgern ohne Cytochalasin-B Behandlung werden die Mikrokerne in einkernigen Zellen gezählt. Man kann in diesem Fall nicht sicher sagen, ob die mikrokernhaltigen Zellen eine Mitose durchlaufen haben (Fenech 2007). Dies ist relevant, da Läsionen nur in der Mitose als Mikrokern exprimiert werden können.

2.3.2 Durchführung

Versuchsdurchführung

Für den Mikrokerntest wurden an Tag 1 in einer Kulturplatte mit sechs Vertiefungen circa 350.000 Zellen in 3 ml Medium ausgesät. Über Nacht wurden die Zellen adhärent, sodass an Tag 2 die Behandlung mit den Testsubstanzen erfolgen konnte. Dafür wurde im ersten Schritt das Medium entfernt, mit 1 ml warmen PBS gewaschen und 3 ml frisches Medium pipettiert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen für eine Dauer von 24 h. Als Positivkontrolle wurde stets mit Cyclophosphamid (100 µM) über 24 h behandelt. An Tag 3 wurde das Medium gewechselt, und Cytochalasin-B mit einer Endkonzentration von 1,5 µg/ml (Konzentration der Stammlösung: 500 µg/ml) für 48 h hinzugegeben. Die Behandlungszeit für Cytochalasin-B wurde entsprechend der Zyklusdauer der Zelllinie gewählt. Für die Huh6 Zellen mit einer Verdopplungszeit von 45–50 h werden 48 h als geeignete Zeitdauer in der Fachliteratur empfohlen (Misik, Nersesyan et al. 2019). An Tag 5 wurde das Experiment abgeschlossen und die Zellen geerntet.

Herstellung der Objektträger

Für die mikroskopische Auswertung wurden je Probe vier Objektträger mit idealerweise 35.000–40.000 Zellen hergestellt. Dafür wurde jede Probe entsprechend ihrer Zellzahl verdünnt oder durch Zentrifugation konzentriert und 100 µl der Zellsuspension in die Zytozentrifuge pipettiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation mit 600 rpm für 5 Minuten. Die Objektträger wurden entnommen, lichtmikroskopisch auf ihre Qualität überprüft und abschließend in Methanol bei –20 °C für mindestens 2 h fixiert.

Färbung

Für die Färbung wurden die Objektträger nach der Fixierung auf ein Tablett ausgelegt und kurz getrocknet. Dann wurden je Objektträger 10 µl der GelGreen-Gebrauchslösung (GelGreen 10.000x im Verhältnis 1:100 mit PBS verdünnt) auf den zellhaltigen Bereich pipettiert, mit einem 18 x 18 mm Deckglas abgedeckt und sieben Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger mit PBS-Puffer abgespült, kurz getrocknet und der zellhaltige Bereich mit 10 µl DABCO und einem 18 x 18 mm Deckglas abgedeckt. Die Objektträger wurden danach lichtgeschützt aufbewahrt.

Löslichkeit der Testsubstanzen

Die Positivkontrolle Cyclophosphamid wurde in PBS gelöst. Lasiocarpin wurde in DMSO gelöst. Senecionin und Seneciphyllin wurden in einer Mischung aus HCl/NaOH gelöst. Dabei lag für Senecionin die maximale Löslichkeit bei einer Konzentration von 300 µM und für Seneciphyllin bei 320 µM. Als Kontrolle wurde stets das Lösungsmittel der jeweilige Testsubstanz verwendet.

2.3.3 Auswertung

Die Auswertung der Objektträger erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie bei 400-facher Vergrößerung. Pro Konzentration wurden aus zwei Objektträgern je 1.000 Zellen ausgewertet. Dabei wurden einkernige, doppelkernige, dreikernige und mehrkernige Zellen sowie Apoptosen und Mitosen erfasst. Die Mikrokerne wurden pro 1.000 doppelkernige Zellen gezählt. Außerdem wurde für alle Mikrokerntests mit Cytochalasin-B Behandlung der Proliferationsindex erhoben. Dieser setzt sich aus dem Verhältnis von einkernigen (EK), doppelkernigen (DK), dreikernigen (DRK) und mehrkernigen (MK) Zellen in insgesamt 1.000 gezählten Zellen zusammen.

$$\text{Proliferationsindex} = \frac{(1 \times \text{EK}) + (2 \times \text{DK}) + (3 \times \text{DRK}) + (4 \times \text{MK})}{\text{EK} + \text{DK} + \text{DRK} + \text{MK}}$$

2.4 Ethoxyresorufin-O-deethylase – Assay

2.4.1 Theoretische Grundlagen

Um die Rolle der CYP-Enzyme im Zusammenhang mit der Toxizität von PA besser verstehen zu können, wurde die Enzymaktivität der CYP1A in den Huh6 Zellen gemessen. Als Nachweis der Enzymaktivität diente die Fluoreszenz von Resorufin, welches durch Hydroxylierung, katalysiert durch die CYP1A, aus Ethoxyresorufin und den Co-Substraten NADPH und O₂ entsteht (Kennedy, Jones et al. 1995).

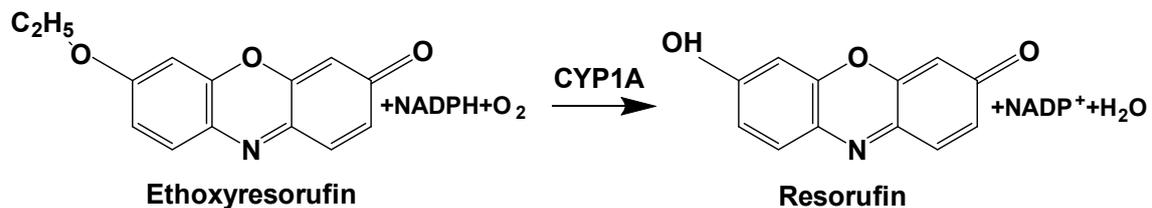


Abb. 9: Umwandlung von Ethoxyresorufin in Resorufin

Zu sehen ist eine schematische Darstellung der Umwandlung von Ethoxyresorufin zu Resorufin durch die CYP1A (modifiziert nach (Kennedy, Jones et al. 1995)).

2.4.2 Durchführung

In einer Kulturplatte mit 96 Vertiefungen wurden jeweils 10.000 Zellen in 200 µl Medium ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung der Zellen mit den entsprechenden Substanzen in Triplikaten über einen Zeitraum von 24 h, sodass am dritten Tag die Messung durchgeführt werden konnte. Um die CYP1A-Enzymaktivität und Proteinkonzentration zu bestimmen, wurden am Tag der Messung sechs Vertiefungen mit einer definierten Menge an bovinem Serumalbumin (BSA) und Resorufin in der Kulturplatte, als sogenannte Standardreihe, angelegt. Auch hier wurde mit Triplikaten gearbeitet.

Für die Messung wurde das Medium entfernt, mit PBS gewaschen und anschließend der Natriumphosphat-Puffer in alle Vertiefungen hinzugegeben. Die Ethoxyresorufin Zugabe erfolgte zu einer Endkonzentration von 5 µM. Die Platte wurde anschließend im Brutschrank für 15 Minuten inkubiert. Zur Vorbereitung der Standardreihe wurden eine BSA-Stammlösung (2 mg/ml in Natriumphosphat-Puffer) und eine Resorufin-Stammlösung (7 µM in Natriumphosphat-Puffer) hergestellt. Zur Initiierung der Reaktion wurden 25 µl NADPH (14 mM Stammlösung) zu allen Kulturen außer "Zellen-NB",

hinzugefügt und sieben Minuten lang im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion mit 150 µl Acetonitril, in welchem zuvor 150 µg/ml Fluorescamin gelöst wurde, gestoppt. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation (in Alufolie, bei Raumtemperatur), wurde die Fluoreszenz beider Farbstoffe mittels eines Plattenlesegerätes zeitgleich gemessen. Die exakten Mengenangaben für alle Substanzen pro Vertiefung wurden in Tabelle 8 als Pipettierschema dargestellt. Die Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die Konzentrationen, Endmengen und die Funktion der jeweiligen Substanzen.

Tab. 8: Pipettierschema

Erläuterung: bovines Serumalbumin (BSA), Natriumphosphat-Puffer (NP-Puffer), Ethoxyresorufin (ER), Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), Acetonitril (ACN), behandelte Zellen (B), nicht behandelte Zellen (NB)

		Standardreihe						Zellen		
		1	2	3	4	5	6	B	NB	
BSA	µl	0	10	20	30	40	50	-	-	
Resorufin	µl	0	1,25	3,75	12,5	18,75	25	-	-	
NP-Puffer	µl	125	113,75	101,25	82,5	66,25	55,0	125	150	
ER	µl	50							50	
	µM	5							5	
NADPH	µl	25							0	
	µM	1,0							0	
ACN + Fluorescamin	µl	150							150	
Gesamtvolumen pro Ansatz	µl	350							350	

Tab. 9: Konzentrationen und Funktion der Substanzen

Erläuterung: bovines Serumalbumin (BSA), Ethoxyresorufin (ER), Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), Acetonitril (ACN)

	Stamm-lösung	Endkonzentration/Menge	Funktion
BSA	2 mg/ml	0-57-114-171-229-285 µg/ml	Proteinmenge

	Stamm- lösung	Endkonzentration/Menge	Funktion
Resorufin	7 μ M	0-2,5-75-250-375-500 nM	Enzymmenge
ER	35 μ M	5 μ M	Farbstoff-Enzym
NADPH	14 mM	1mM	Reaktionsstart
Fluorescamin (in ACN)	150 μ g/ml	150 μ g/ml	Reaktionsstopp, Farbstoff- Protein

2.4.3 Auswertung

Für die Messung mittels Plattenlesegerät wurde für Resorufin ein Anregungsfilter mit 530 nm und ein Emissionsfilter mit 400 nm Wellenlänge gewählt. Für Fluorescamin wurde ein Anregungsfilter mit 400 nm und ein Emissionsfilter mit 460 nm Wellenlänge verwendet (Kennedy, Jones et al. 1995). Die Messwerte der Standardreihe wurden als Referenzwerte für die Fluoreszenz der behandelten Zellen verwendet. Die Fluoreszenz des Fluorescamin, zur Bestimmung der Proteinmenge, wurde in Relation zur Fluoreszenz des Resorufin gesetzt und dadurch die Enzymaktivität pro μ g Protein bestimmt.

2.5 Glutathion – Assay

2.5.1 Theoretische Grundlagen

Glutathion ist ein Tripeptid, welches aus den Aminosäuren Glycin, Cystein und Glutamin aufgebaut ist. Die Synthese findet in allen Körperzellen statt; die größte Menge an Glutathion wird in Leberzellen produziert (Lu 2013). Mit Hilfe des Glutathion-Assays sollen Veränderungen des intrazellulären Glutathion-Gehalts durch Lasiocarpin und L-Buthionin-sulfoximin gezeigt werden. L-Buthionin-sulfoximin hemmt die Glutamat-Cystein-Ligase, ein Enzym, das an der Glutathion-Synthese beteiligt ist (Griffith und Meister 1979, Chen, Dong et al. 2013).

2.5.2 Durchführung

In einer Kulturplatte mit zwölf Vertiefungen wurden circa 150.000 Zellen pro Vertiefung in 2 ml Medium ausgesät. Nach einem Zeitraum von 24 h, in dem die

Zellen adhärirt haben, wurde das Medium entfernt, mit PBS gewaschen und jeweils 2 ml frisches Medium pipettiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit den Testsubstanzen. Für die Auswertung des Glutathion-Gehalts in den Zellen wurde 30 Minuten vor Ende der Behandlungszeit der Farbstoff Monochlorobiman mit einer Endkonzentration von 100 μ M hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation des Farbstoffs im Brutschrank wurde das Medium entfernt, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und 1 ml frisches PBS zugegeben. Die Platte wurde mit Alufolie verpackt und direkt im Anschluss die Messung am Plattenlesegerät durchgeführt. Pro Substanzkonzentration wurde mit zwei Replikaten gearbeitet.

2.5.3 Auswertung

Die Messung des Glutathion-Gehalts erfolgt über die Fluoreszenzintensität des Monochlorobiman. Die maximale Absorptionswellenlänge des Farbstoffs liegt bei 394 nm, die Wellenlänge des Emissionsmaximums bei 490 nm.

Die Menge des Glutathions in den Zellen korreliert linear mit der Fluoreszenzintensität, da der Farbstoff ein Addukt mit intrazellulärem Glutathion bildet.

2.6 Dihydroethidium – Assay

2.6.1 Theoretische Grundlagen

Die Beteiligung von Sauerstoff an zellulären Stoffwechselprozessen führt zur Bildung reaktionsfähiger Radikale (Superoxide). Diese Radikale können Schäden an der DNA, Proteinen sowie Membranlipiden verursachen (Pospisil, Prasad et al. 2019). Mit Hilfe des rot fluoreszierenden Farbstoffs Dihydroethidium kann die Superoxidbildung einer Zelle mikroskopisch nachgewiesen werden. Das normalerweise hydrophobe, ungeladene Dihydroethidium kann Membranen passieren.

Wird es jedoch während eines Zusammentreffens mit einem $O_2^{\cdot-}$ (Super-

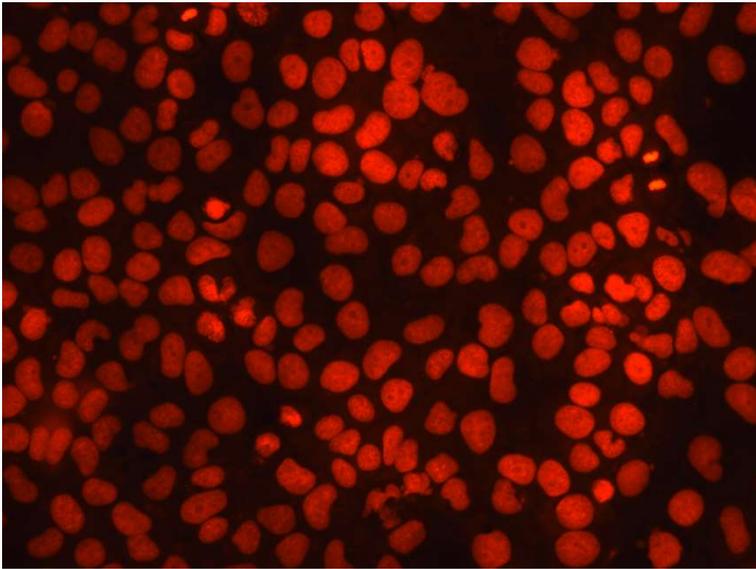


Abb. 10: Darstellung der Zellkerne in den Huh6 Zellen mittels DHE-Färbung

Zu sehen ist die rote Fluoreszenz des oxidierten Dihydroethidium, das sich intrazellulär an die DNA anlagert. Das Bild stammt aus einer Probe mit der Positivkontrolle Antimycin A.

oxidanion) zu einem 2-Hydroxyethidium oder Ethidium oxidiert, bekommt es eine positive Gesamtladung und reichert sich im Zellkern an (Abb. 10).

Grund hierfür sind vor allem elektrostatische Wechselwirkungen mit den Phosphatgruppen der DNA (Garbett, Hammond et al. 2004, Laurindo, Fernandes et al. 2008)

2.6.2 Durchführung

In eine Kulturplatte mit sechs Vertiefungen wurden autoklavierte Deckgläschen gelegt und anschließend circa 450.000 Zellen in 3 ml Medium ausgesät. Nach einem Zeitraum von 24 h, in dem die Zellen an die Platte adhären, wurde das Medium entfernt, mit PBS gewaschen und anschließend 3 ml frisches Medium zugegeben. Nun erfolgte die Behandlung mit den entsprechenden Substanzen. Dabei wurden die Zellen für die Dauer von 8 h, 4 h bzw. 2 h mit Lasiocarpin (32 μ M) behandelt. Für die Positivkontrolle mit Antimycin A (50 μ M und 25 μ M), eine Substanz, welche die Übertragung von Elektronen in der Atmungskette blockiert, wurde eine Behandlungszeit von 2 h gewählt. Für die Färbung wurde Dihydroethidium für die letzten 15 Minuten der Behandlungszeit in einer Endkonzentration von 10 μ M zugegeben und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt, die Deckgläschen mit kaltem PBS gewaschen und 1 ml frisches PBS zugegeben. Die Platte wurde ab dem Zeitpunkt der Farbstoffzugabe in Alufolie gewickelt,

um Lichteinfall zu vermeiden. Für die mikroskopische Auswertung wurden die Zellen fotografiert.

2.6.3 Auswertung

Die mikroskopische Auswertung erfolgte mittels TRITC-Filter bei 200-facher Vergrößerung. Mit Hilfe einer Kamera am Mikroskop und der Software Q Capture Pro wurden Bilder der rot fluoreszierenden Zellkerne angefertigt. Dafür wurde zu Beginn die Belichtungszeit einmal anhand der Negativ- und Positivkontrolle ausgewählt und für alle weiteren Objektträger beibehalten. Fünf Bilder pro Behandlungsgruppe wurden mithilfe der ImageJ Software quantifiziert. Hierfür wurde die Dreifarbkanal-Aufnahme (blau, grün, rot) gesplittet und ausschließlich der rote Kanal ausgewertet. Mit Hilfe eines Kreises wurden jeweils 40 Zellkerne pro Bild ausgewählt und deren Grauwert gemessen. Insgesamt konnte auf diese Weise die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von insgesamt 200 Zellkernen je Probe erfasst werden.

2.7 Tetramethylrhodamine-Ethyl-Ester – Assay

2.7.1 Theoretische Grundlagen

In den Mitochondrien wird innerhalb der Atmungskette mittels Redoxreaktionen Energie freigesetzt, um Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum zu pumpen und so eine Spannungsdifferenz, das mitochondriale Membranpotential zu erzeugen (Löffler und Petrides 2014). Das mitochondriale Membranpotential kann mittels eines positiv geladenen Farbstoffs, dem Tetramethylrhodamine-Ethyl-Ester, visualisiert werden (Abb.9). Dieser lagert sich an die in gesunden Mitochondrien negativ geladene, innere Membran an (Crowley, Christensen et al. 2016). Über die Intensitätsunterschiede seiner roten Fluoreszenz können Änderungen des mitochondriale Membranpotentials mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht werden.

2.7.2 Durchführung

In eine Kulturplatte mit sechs Vertiefungen wurden autoklavierte Deckgläschen gelegt und anschließend circa 450.000 Zellen in 3 ml Medium pro Kultur ausgesät. Nach einem Zeitraum von 24 h, in dem die Zellen an die Platte

adhäriert haben, wurde das Medium entfernt, mit PBS gewaschen und anschließend 3 ml frisches Medium pipettiert. Nun erfolgte die Behandlung mit den entsprechenden Substanzen. Dabei wurden die Zellen für eine Dauer von 8 h, 4 h bzw. 2 h mit Lasiocarpin (32 μM) behandelt. Für die Positivkontrolle mit Antimycin A (50 μM und 25 μM) wurde eine Behandlungszeit von 2 h gewählt. Der Tetramethylrhodamine-Ethyl-Ester wurde für die letzten 15 Minuten der Behandlungszeit in einer Endkonzentration von 50 nM hinzugegeben. Um

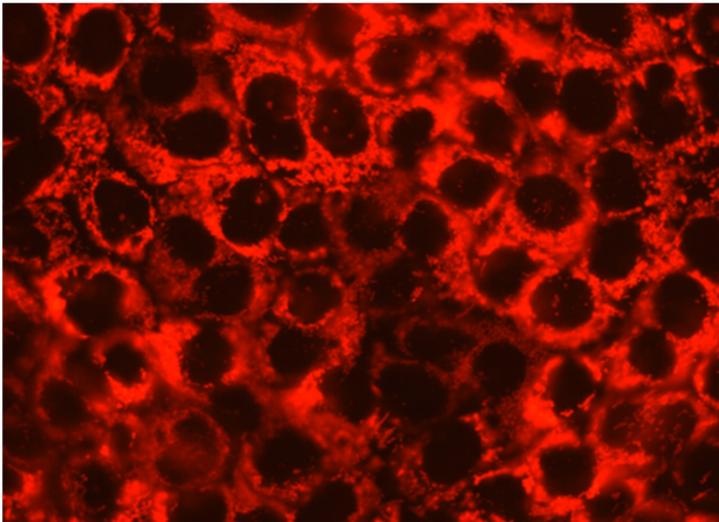


Abb. 11: Darstellung der Mitochondrien in den Huh6 Zellen mittels TMRE-Färbung

Zu sehen ist die rote Fluoreszenz des Tetramethylrhodamine-Ethyl-Esters, der sich intrazellulär an die Mitochondrienmembran anlagert. Das Bild stammt aus einer Probe der Negativkontrolle mit Dimethylsulfoxid.

Lichteinfall zu vermeiden, wurde die Platte unmittelbar nach Zugabe des Farbstoffs in Alufolie gewickelt und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Deckgläschen mit kaltem PBS gewaschen und 1 ml frisches PBS zugegeben. Für die Auswertung wurden die Zellen am Mikroskop fotografiert.

2.7.3 Auswertung

Die mikroskopische Auswertung erfolgte mittels TRITC-Filter bei 400-facher Vergrößerung. Die Einstellung der Kamera für die Bildaufnahmen wurde auf die gleiche Weise durchgeführt, wie für den Dihydroethidium-Assay. Fünf Bilder pro Behandlungsgruppe (mit etwa 30–50 Zellen pro Bild) wurden mithilfe der ImageJ Software quantifiziert. Hierfür wurde die Dreifarbkanaal-Aufnahme (blau, grün, rot) gesplittet, die Grauwerte der Mitochondrien ausschließlich im roten Kanal erfasst und diese anschließend durch die Anzahl der Zellen dividiert.

2.8 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS, Version 25.

Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt, daraus der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet und dies statistisch geprüft. Mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests wurden die Ergebnisse auf Normalverteilung mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ getestet. Lag eine Normalverteilung vor, wurde der t-Test durchgeführt. Lag keine Normalverteilung der Daten vor, wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Gruppen mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ in Bezug zur Kontrolle im t-Test, wurden stets mit (*) oder (Δ) markiert. Wurden Gruppen untereinander mit Hilfe des t-Tests als signifikant getestet, so wurde dies mit (\circ) gekennzeichnet. Nicht signifikante Daten $p \geq 0,05$ wurden in den Abbildungen nicht explizit hervorgehoben.

3 Ergebnisse

3.1 Mikrokerntest – mit und ohne Cytochalasin-B

Der Mikrokerntest mit bzw. ohne Cytochalasin-B Behandlung wurde zur Detektion von genotoxischen Schäden durchgeführt. Als Testsubstanz wurde Lasiocarpin verwendet, dessen genotoxisches Potential bereits aus der Fachliteratur bekannt ist. Die eine Hälfte der Proben wurde mit Cytochalasin-B für 48 h behandelt, während bei der anderen Hälfte lediglich ein Wechsel des Mediums durchgeführt wurde. Nach der Auswertung war in beiden Versuchsprotokollen ein deutlicher konzentrationsabhängiger Anstieg der mikrokernhaltigen Zellen durch Lasiocarpin zu sehen (Abb. 12). Der Anstieg der mikrokernhaltigen Zellen war für das Protokoll mit Cytochalasin-B und ohne Cytochalasin-B für Lasiocarpin (32 μM) statistisch signifikant. Ebenfalls signifikant zeigte sich in beiden Protokollen die Positivkontrolle mit Cyclophosphamid. Der Proliferationsindex wies keine signifikante Veränderung auf.

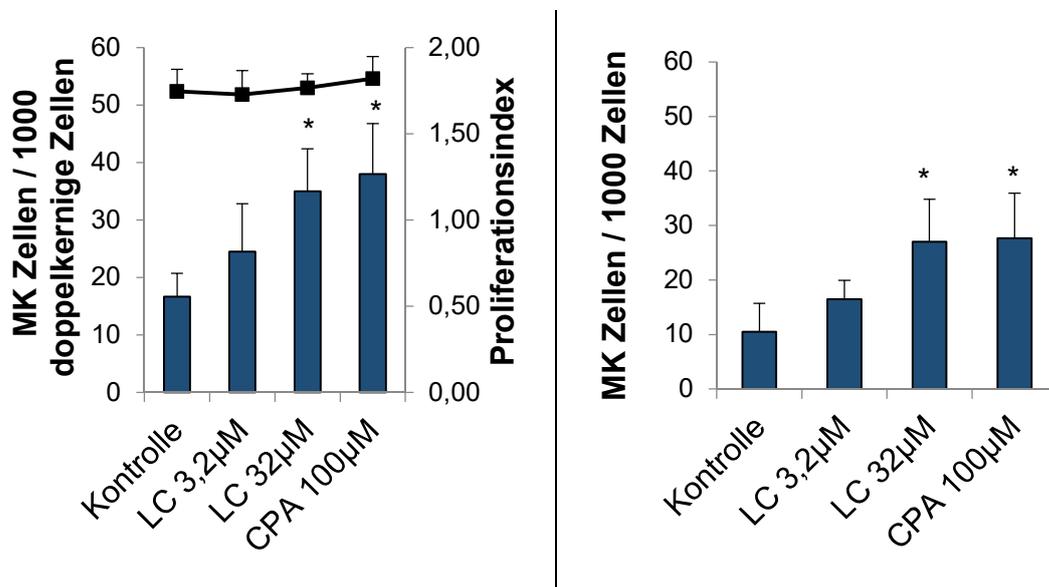


Abb. 12: Genotoxizität von Lasiocarpin: links mit Cyt-B, rechts ohne Cyt-B

Zu sehen ist die Anzahl der mikrokernhaltigen Zellen nach 24 h Lasiocarpin (LC) Behandlung mit Cytochalasin-B (Cyt-B) in doppelkernigen Zellen (links) und ohne Cyt-B in einkernigen Zellen (rechts). Als Positivkontrolle wurde Cyclophosphamid (CPA) verwendet. Die Auswertung des Proliferationsindex erfolgte für die Proben mit Cyt-B. Die Ergebnisse wurden aus dem Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten gemittelt. Signifikante Werte nach t-Test ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle wurden mit einem (*) markiert.

Auch in der graphischen Darstellung der Mikrokernanzahl zeigte sich der konzentrationsabhängige Anstieg der Mikrokernanzahl durch Lasiocarpin deutlich (Abb. 13). In beiden Protokollen lag ein statistisch signifikanter Unterschied in der Anzahl der induzierten Mikrokerne durch Lasiocarpin (32 μM) und der Positivkontrolle Cyclophosphamid im Vergleich zur Kontrolle vor.

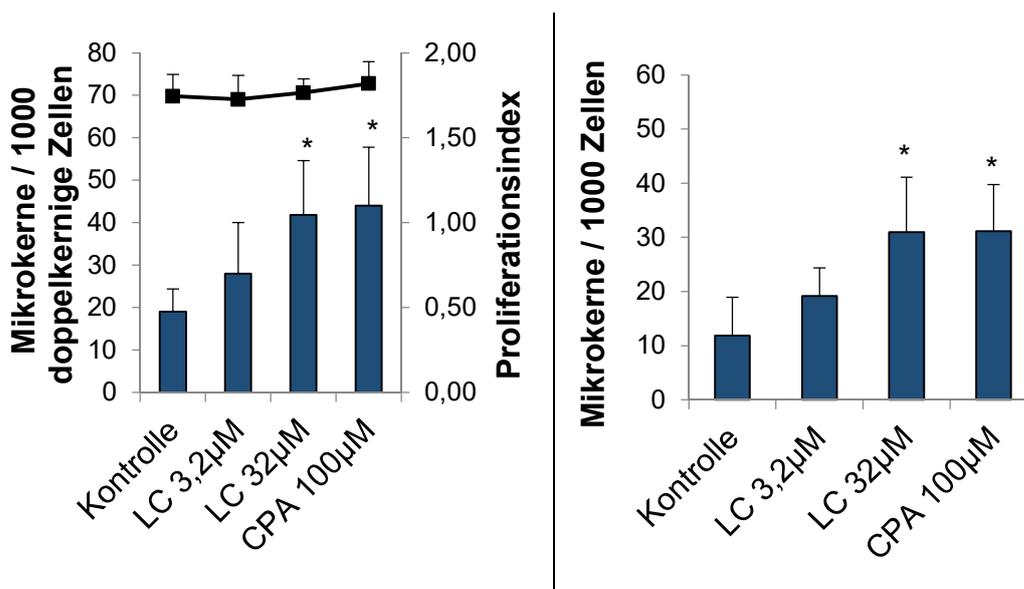


Abb. 13: Mikrokernfrequenz von Lasiocarpin: links mit Cyt-B, rechts ohne Cyt-B

Zu sehen ist die Anzahl der Mikrokerne in Huh6 Zellen nach 24 h Lasiocarpin (LC) Behandlung mit Cytochalasin-B (Cyt-B) in doppelkernigen Zellen (links) und ohne Cyt-B in einkernigen Zellen (rechts). Als Positivkontrolle wurde Cyclophosphamid (CPA) verwendet. Die Auswertung des Proliferationsindex erfolgte für die Proben mit Cyt-B. Die Ergebnisse wurden aus dem Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten gemittelt. Signifikante Werte nach t-Test ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle wurden mit einem (*) markiert.

Insgesamt wurde gezeigt, dass beide Versuchsprotokolle gut geeignet sind, um das genotoxische Potential von Lasiocarpin zu bestimmen. Die Sensitivität zur Detektion von Lasiocarpin zeigte sich für das Versuchsprotokoll ohne Cytochalasin-B geringfügig höher. Jedoch konnte für Zellproben mit Cytochalasin-B der Proliferationsindex, welcher wichtige Informationen zu zytostatischen Effekten liefert, deutlich einfacher bestimmt werden. Daher wurden alle weiteren Mikrokernexperimente mit Cytochalasin-B Behandlung durchgeführt.

3.2 Genotoxizität der Testsubstanzen

3.2.1 Lasiocarpin

Das genotoxische Potential von Lasiocarpin konnte bereits anhand des Protokollvergleichs gezeigt werden. Lasiocarpin wurde in den Konzentrationen 3,2 μM und 32 μM getestet. Nach weiteren drei Experimenten zeigte der Durchschnitt aus insgesamt sechs Mikrokernexperimenten mit Lasiocarpin wiederum, dass eine dosisabhängige Steigerung der mikrokernhaltigen Zellen im Vergleich zur Kontrolle vorhanden war (Abb. 14). Die Anzahl der mikrokernhaltigen Zellen war für Lasiocarpin (3,2 μM und 32 μM) und die Positivkontrolle Cyclophosphamid statistisch signifikant erhöht. Der Proliferationsindex blieb weitestgehend unverändert.

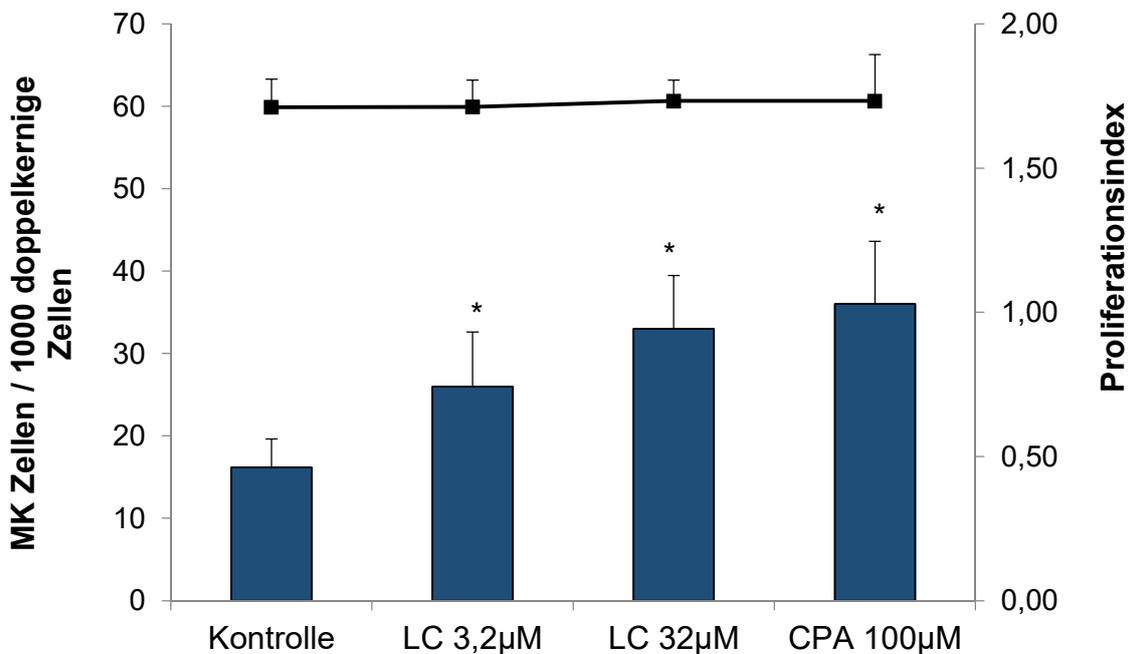


Abb. 14: Genotoxizität von Lasiocarpin

Zu sehen ist die Anzahl der mikrokernhaltigen Huh6 Zellen nach 24 h Lasiocarpin (LC) Behandlung. Als Positivkontrolle wurde Cyclophosphamid (CPA) verwendet. Signifikante Werte nach t-Test ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle wurden mit einem (*) markiert. Die sechs hier gemittelten Experimente stammen aus den Experimenten der Abb. 12 (3 Experimente) sowie Abb. 24 (3 Experimente).

Die Anzahl der durch Lasiocarpin induzierten Mikrokern zeigt Abbildung 15. Ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Mikrokernanzahl von 3,2 μM auf 32 μM wurde ebenfalls sichtbar, wobei sich die Proben 32 μM Lasiocarpin und die Positivkontrolle Cyclophosphamid als statistisch signifikant zeigten.

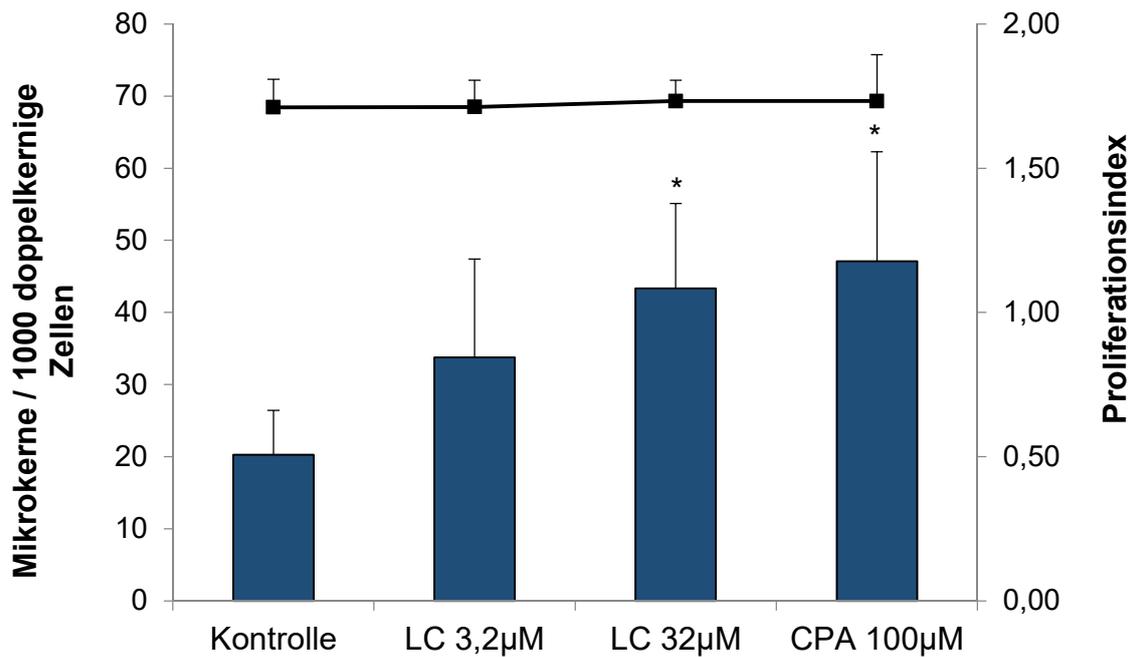


Abb. 15: Mikrokernfrequenz von Lasiocarpin

Zu sehen ist die Anzahl der Mikrokerne in den Huh6 Zellen nach 24 h Lasiocarpin (LC) Behandlung. Als Positivkontrolle wurde Cyclophosphamid (CPA) verwendet. Signifikante Werte nach t-Test ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle wurden mit einem (*) markiert. Die sechs hier gemittelten Experimente stammen aus den Experimenten der Abb. 13 (3 Experimente) sowie Abb. 24 (3 Experimente).

3.2.2 Senecionin

Um das genotoxische Potential von Senecionin zu erfassen, wurden drei verschiedene Konzentrationen (30 µM, 100 µM und 300 µM) getestet. Für alle drei Konzentrationen von Senecionin wurde ein statistisch signifikanter Anstieg der mikrokernhaltigen Zellen im Vergleich zur Kontrolle gefunden. Auch die Positivkontrolle Cyclophosphamid zeigte sich statistisch signifikant. Die Steigerung in der Anzahl der mikrokernhaltigen Zellen war für Senecionin nicht dosisabhängig. Der Proliferationsindex zeigte eine minimale Reduktion (nicht signifikant) für 30 µM Senecionin.

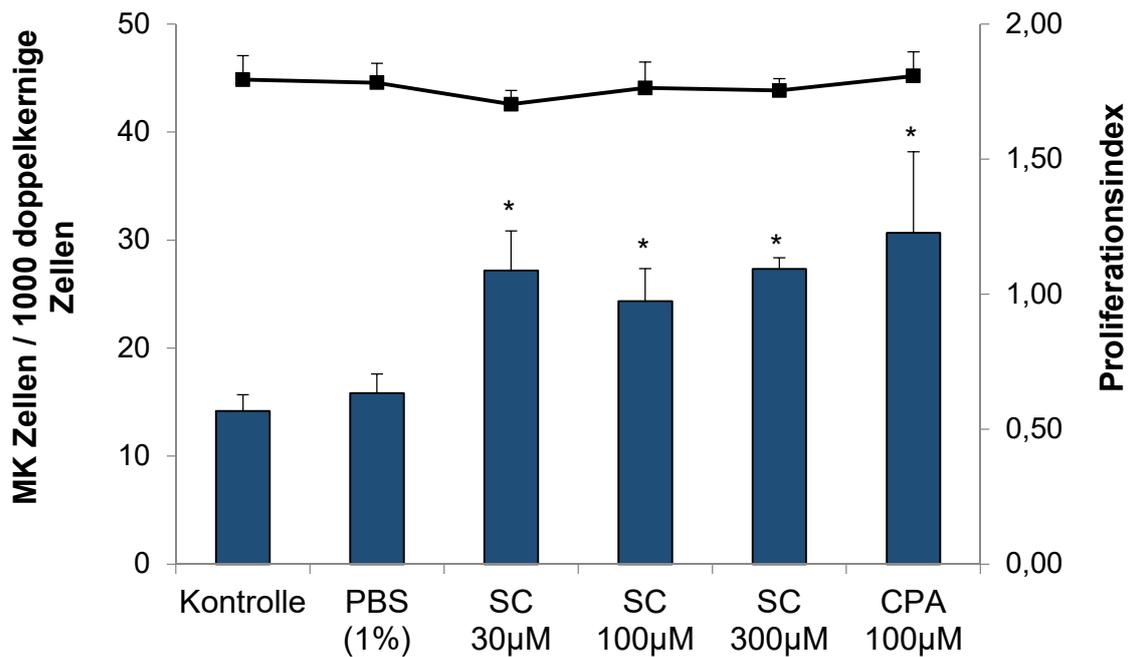


Abb. 16: Genotoxizität von Senecionin

Zu sehen ist die Anzahl der mikrokernhaltigen Huh6 Zellen nach 24 h Senecionin (SC) Behandlung. Als Positivkontrolle wurde Cyclophosphamid (CPA) verwendet. Die Ergebnisse wurden aus dem Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten gemittelt. Signifikante Werte nach t-Test ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle bzw. PBS (phosphatgepufferte Salzlösung; Lösungsmittel für CPA) wurden mit einem (*) markiert.

Die Mikrokernanzahl spiegelte das Ergebnis der mikrokernhaltigen Zellen wider, da auch hier ein statistisch signifikanter Anstieg der Mikrokerne für Senecionin (30 µM, 100 µM und 300 µM) im Vergleich zur Kontrolle sichtbar wurde. Eine dezente Reduktion der Mikrokernanzahl für 100 µM und 300 µM Senecionin wurde in Abbildung 17 deutlicher sichtbar, als in der Auswertung der mikrokernhaltigen Zellen in Abbildung 16.

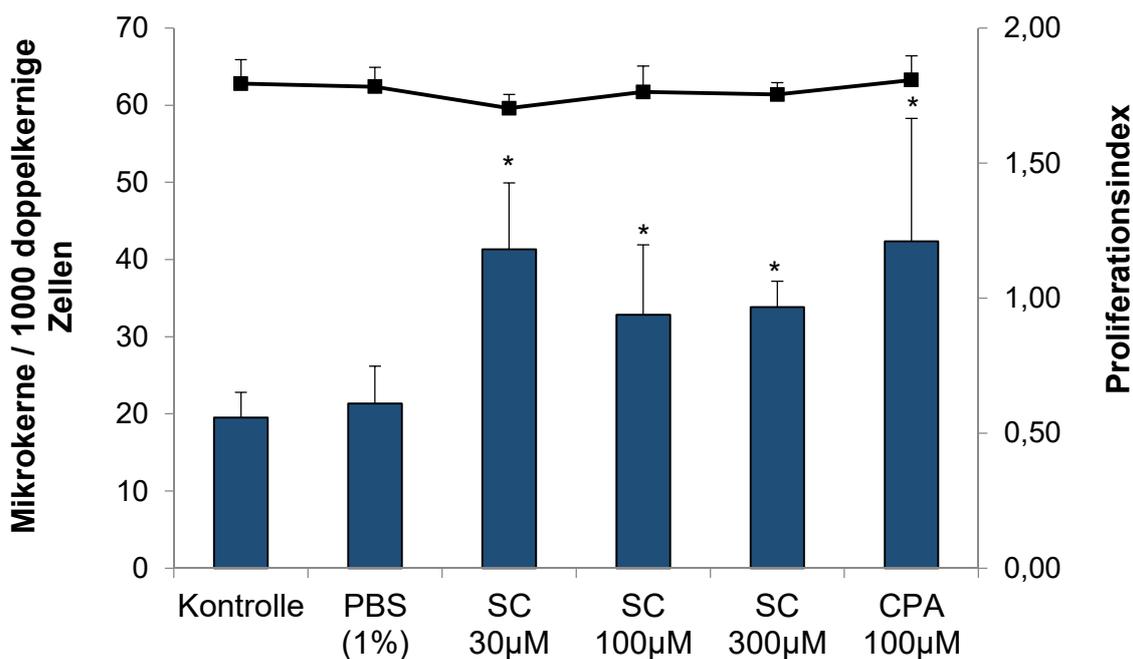


Abb. 17: Mikrokernfrequenz von Senecionin

Zu sehen ist die Anzahl der Mikrokerne in Huh6 Zellen nach 24 h Senecionin (SC) Behandlung. Als Positivkontrolle wurde Cyclophosphamid (CPA) verwendet. Die Ergebnisse wurden aus dem Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten gemittelt. Signifikante Werte nach t-Test ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle bzw. PBS (phosphatgepufferten Salzlösung; Lösungsmittel für CPA) wurden mit einem (*) markiert.

3.2.3 Seneciphyllin

Um das genotoxische Potential von Seneciphyllin zu erfassen, wurden drei verschiedenen Konzentrationen (32 µM, 100 µM und 320 µM) getestet. Für alle drei Konzentrationen von Seneciphyllin wurde ein statistisch signifikanter Anstieg der mikrokernhaltigen Zellen im Vergleich zur Kontrolle gefunden (Abb. 18). Auch die Positivkontrolle Cyclophosphamid zeigte sich statistisch signifikant gegenüber der Kontrollprobe mit PBS. Für 100 µM Seneciphyllin wurde im Vergleich zu 32 µM eine konzentrationsabhängige Zunahme der mikrokernhaltigen Zellen beobachtet, während die Anzahl der mikrokernhaltigen Zellen von 100 µM auf 320 µM nicht weiter zunahm. Der Proliferationsindex sank leicht für 32 µM Seneciphyllin.

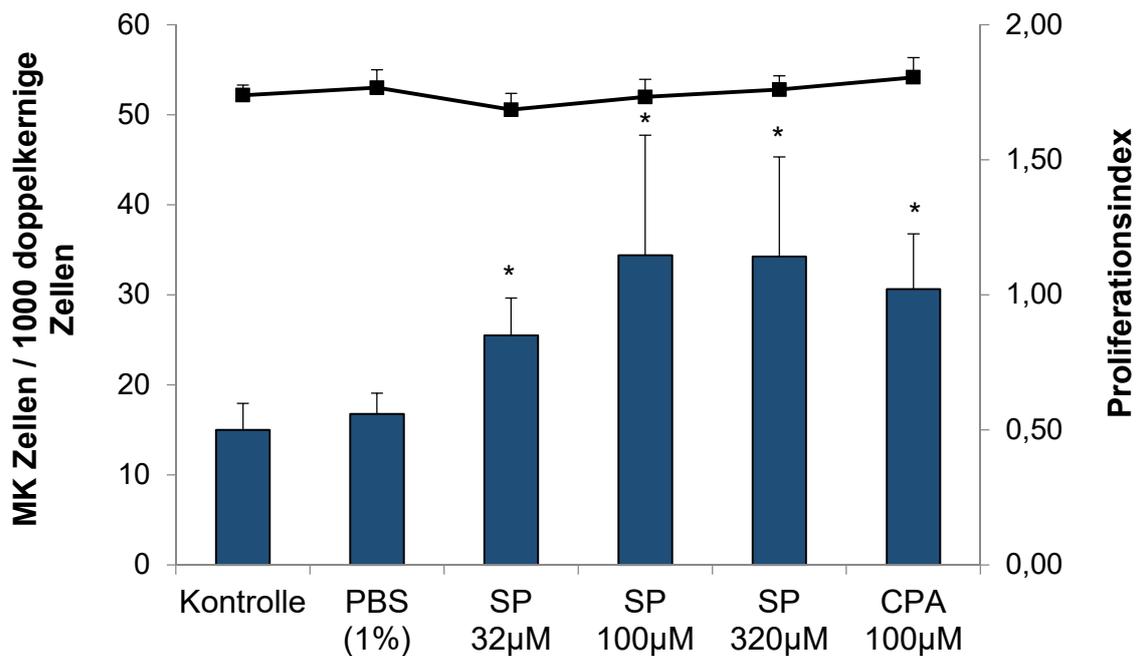


Abb. 18: Genotoxizität von Seneciphyllin

Zu sehen ist die Anzahl der mikrokernhaltigen Huh6 Zellen nach 24 h Seneciphyllin (SP) Behandlung. Als Positivkontrolle wurde Cyclophosphamid (CPA) verwendet. Die Ergebnisse wurden aus dem Durchschnitt von vier unabhängigen Experimenten gemittelt. Signifikante Werte nach t-Test ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle bzw. PBS (phosphatgepufferten Salzlösung; Lösungsmittel für CPA) wurden mit einem (*) markiert.

Die Anzahl der induzierten Mikrokerne spiegelte das Ergebnis der mikrokernhaltigen Zellen wider, da hier ebenso für alle drei Konzentrationen von Seneciphyllin ein statistisch signifikanter Anstieg der Mikrokernanzahl im Vergleich zur Kontrolle sichtbar wurde (Abb. 19). Die Mikrokernanzahl für 100 µM und 320 µM Seneciphyllin zeigte sich nahezu gleich und stieg nicht konzentrationsabhängig an. Dagegen fand eine konzentrationsabhängige Zunahme der Mikrokernanzahl für 32 µM Seneciphyllin im Vergleich zu 100 µM statt.

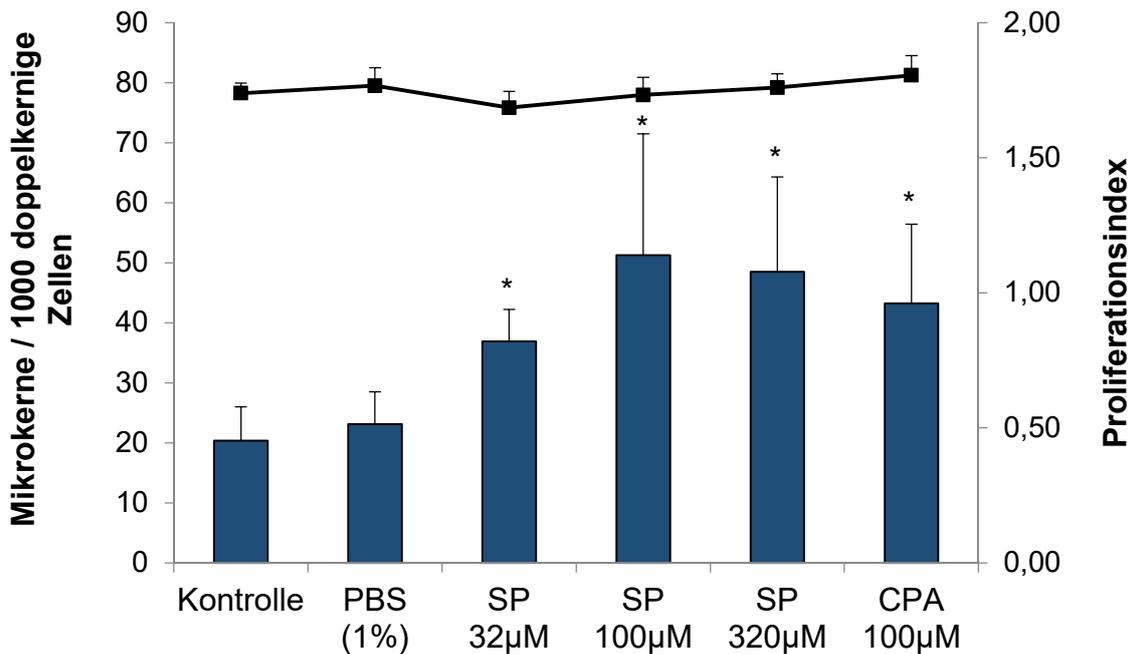


Abb. 19: Mikrokernfrequenz von Seneciphyllin

Zu sehen ist die Anzahl der Mikrokerne in Huh6 Zellen nach 24 h Seneciphyllin (SP) Behandlung. Als Positivkontrolle wurde Cyclophosphamid (CPA) verwendet. Die Ergebnisse wurden aus dem Durchschnitt von vier unabhängigen Experimenten gemittelt. Signifikante Werte nach t-Test ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle bzw. PBS (phosphatgepufferten Salzlösung; Lösungsmittel für CPA) wurden mit einem (*) markiert.

3.3 Bestimmung der CYP1A-Enzymaktivität

An der Metabolisierung der PA sind verschiedene CYP-Enzyme beteiligt. Jede Zelllinie besitzt spezifische Isoformen. Mit Hilfe des EROD-Assays wurde die Enzymaktivität der CYP1A in den Huh6 Zellen für Lasiocarpin und zwei weitere Testsubstanzen mit metabolischer Aktivierung, nämlich Cyclophosphamid und Benzo(a)pyren bestimmt.

Abbildung 20 zeigt beispielhaft die grafische Darstellung der Fluoreszenzintensität der Standardreihe mit definierten Protein- und Enzymmengen – jeweils in aufsteigender Konzentration. Zu sehen ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Fluoreszenzintensität für beide Farbstoffe, annähernd linear zu der zunehmenden Protein- und Enzymmenge. Dabei spiegelt die Fluoreszenzintensität von Resorufin die Enzymaktivität wider, die Fluoreszenzintensität von Fluorescamin entspricht der Proteinmenge.

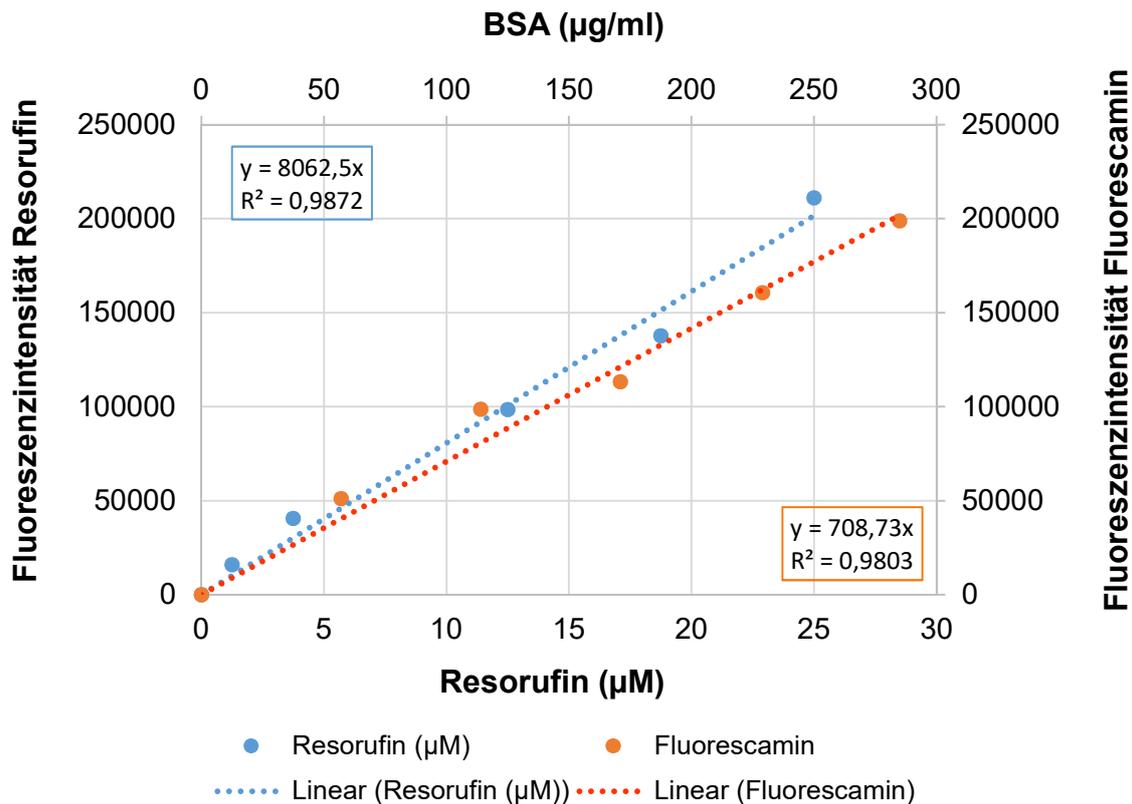


Abb. 20: Fluoreszenzintensität der Standardreihe zur Bestimmung der CYP1A-Aktivität

Zu sehen ist beispielhaft aus einem Experiment die Fluoreszenzintensität der definierten Proteinmenge des bovines Serumalbumins (BSA) und der Enzymmenge der Standardreihe in aufsteigender Konzentration. Dabei spiegelte die Fluoreszenzintensität von Resorufin die Enzymaktivität wider, die Fluoreszenzintensität von Fluorescamin entsprach der Proteinmenge. Die Fluoreszenzintensitäten beider Farbstoffe wurden zeitgleich über eine Messung mit dem Plattenlesegerät bestimmt.

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten von Resorufin und Fluorescamin der Standardreihe dienten als Referenzwerte zur Bestimmung der Enzymaktivität und Proteinmenge für die mit den Testsubstanzen behandelten Zellen. Die gemessene CYP1A-Aktivität ist in Abbildung 21 gezeigt. Für alle getesteten Substanzen wurde eine Enzymaktivität gemessen. Für Cyclophosphamid und Lasiocarpin wurde keine deutliche Änderung der Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle sichtbar. Benzo(a)pyren dagegen zeigte tendenziell eine Erhöhung der Enzymaktivität.

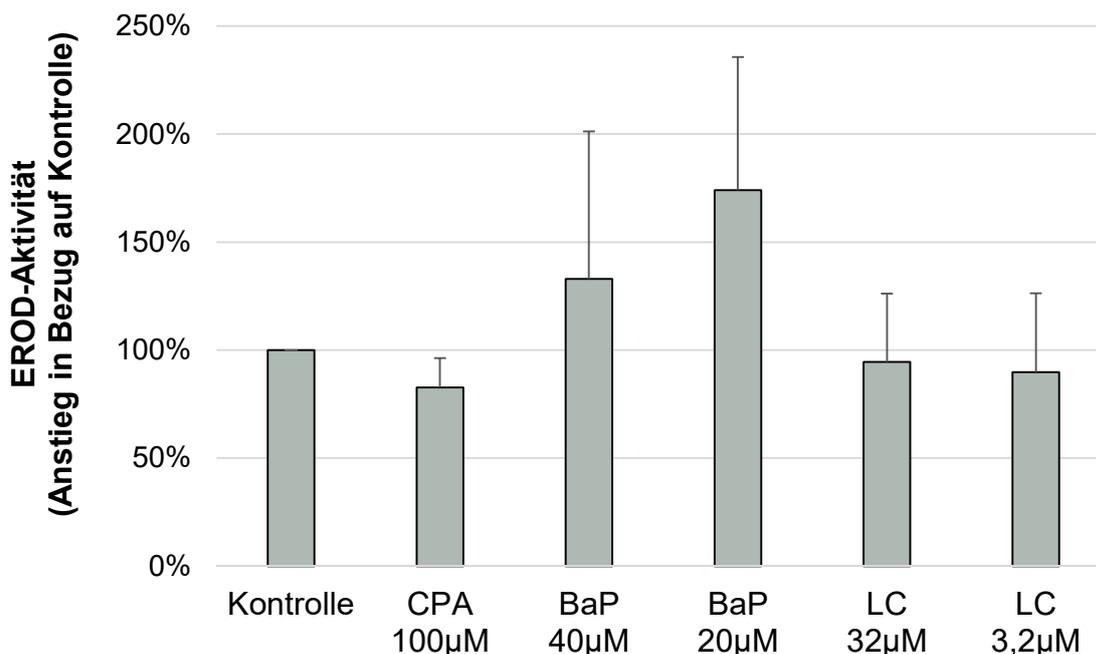


Abb. 21: Enzymaktivität der CYP1A (in %) der Huh6 Zellen

Zu sehen ist die durchschnittliche Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)-Aktivität der CYP1A (in %) bezogen auf die Kontrolle. Die EROD-Aktivität wurde dabei auf die jeweils gemessene Proteinmenge der Huh6 Zellen normiert. Die Huh6 Zellen wurden für eine Zeitdauer von 24 h mit Lasiocarpin (LC), mit Cyclophosphamid (CPA) oder Benzo(a)pyren (BaP) behandelt. Die Ergebnisse wurden aus dem Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten gemittelt. Signifikante Werte nach t-Test ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle wurden mit einem (*) markiert.

3.4 Oxidativer Stress in der Genotoxizität von Lasiocarpin

3.4.1 Einfluss von Lasiocarpin auf den Glutathion-Gehalt

Eine Adduktbildung der toxischen Pyrrolester mit Glutathion wurde in der Fachliteratur häufig beschrieben und für einzelne PA bereits nachgewiesen. Daher wurde der Einfluss von Lasiocarpin auf den Glutathion-Gehalt untersucht. Im Glutathion-Assay wurden die Zellen mit zwei verschiedenen Lasiocarpinkonzentrationen (3,2 µM und 32 µM) für eine Dauer von 24 h behandelt. Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, zeigte sich für die Lasiocarpinkonzentration von 3,2 µM keine Änderung des Glutathion-Gehalts. Eine leichte Reduktion des Glutathion-Gehalts im Vergleich zur Kontrolle wurde für Lasiocarpin (32 µM) sichtbar, diese war nicht signifikant.

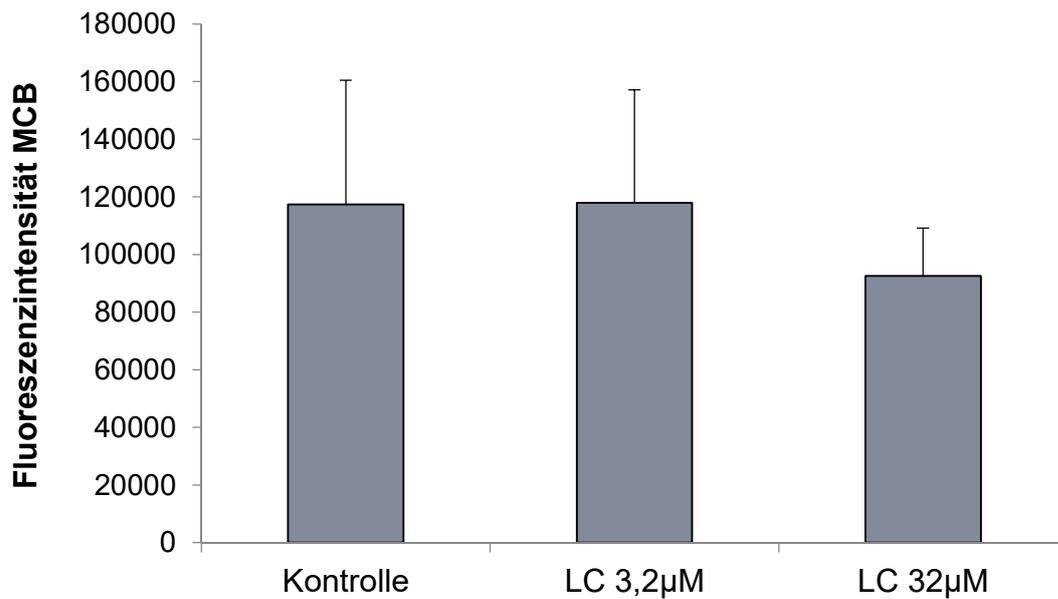


Abb. 22: Glutathion-Gehalt in Huh6 Zellen nach Lasiocarpin-Behandlung

Zu sehen ist die durchschnittliche Fluoreszenzintensität des Monochlorobiman (MCB)-Farbstoffs nach 24 h Lasiocarpin (LC) Behandlung. Die Ergebnisse wurden aus dem Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten gemittelt.

3.4.2 Induktion von oxidativem Stress im Mikrokerntest

Aufgrund der Wechselwirkung zwischen Glutathion und Lasiocarpin wurde die Auswirkung einer Glutathion-Depletion auf das Ausmaß der Genotoxizität untersucht.

Glutathion-Depletion in den Huh6 Zellen

Eine Reduktion des Glutathion-Gehalts in den Zellen kann durch die Hemmung der Glutamat-Cystein-Ligase mittels Zugabe von L-Buthionin-sulfoximin erreicht werden. Die Huh6 Zellen wurden im Glutathion-Assay mit L-Buthionin-sulfoximin in den Konzentrationen 250 µM, 500 µM und 1.000 µM für eine Dauer von 24 h behandelt. Für alle drei Konzentrationen wurde eine signifikante Reduktion des Glutathion-Gehalts gemessen (Abb. 23). Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen L-Buthionin-sulfoximin-Konzentrationen.

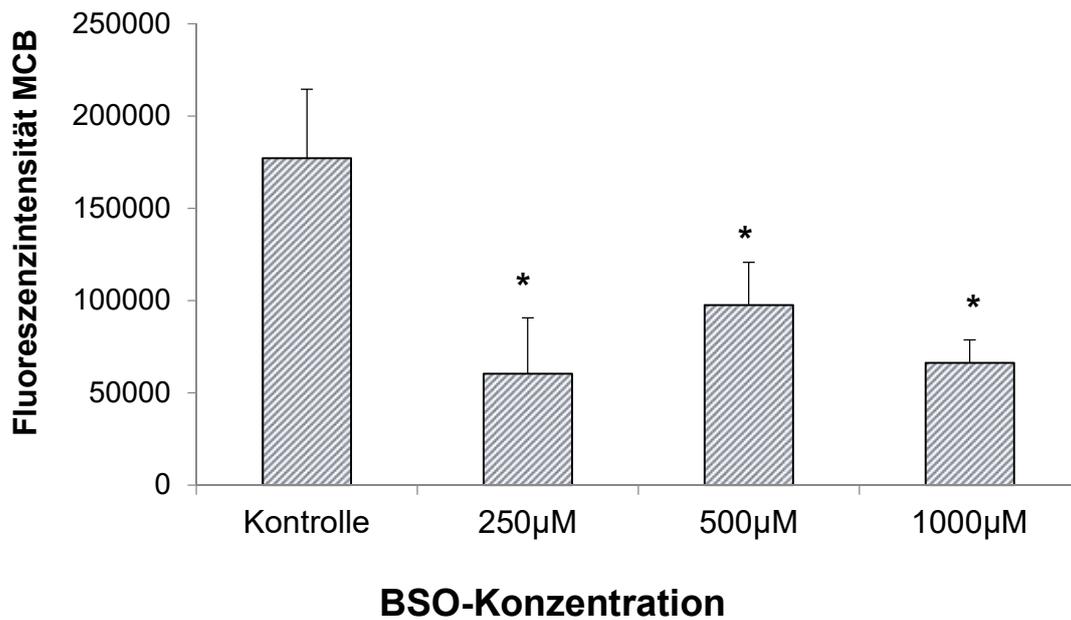


Abb. 23: Glutathion-Reduktion in Huh6 Zellen

Zu sehen ist die durchschnittliche Fluoreszenzintensität des Monochlorobiman (MCB)-Farbstoffs nach 24 h L-Buthionin-sulfoximin (BSO) Behandlung. Die Ergebnisse wurden aus dem Durchschnitt von vier unabhängigen Experimenten gemittelt. Signifikante Werte nach t-Test ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle wurden mit einem (*) markiert.

Um eine Glutathion-Depletion im Mikrokernstest zu erreichen, wurde die eine Hälfte der Zellen mit L-Buthionin-sulfoximin (250 µM) für eine Dauer von 24 h behandelt. Im Anschluss fand die Behandlung mit Lasiocarpin (3,2 µM und 32 µM) für 24 h statt. Die andere Hälfte der Zellen wurde ohne vorherige L-Buthionin-sulfoximin Behandlung mit Lasiocarpin (3,2 µM und 32 µM) behandelt. In beiden Behandlungsvarianten wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der mikrokernhaltigen Zellen durch Lasiocarpin deutlich sichtbar (Abb. 24). Insgesamt zeigte sich nach der Glutathion-Depletion mit L-Buthionin-sulfoximin sowohl für die Behandlung mit Lasiocarpin, als auch für Cyclophosphamid eine vergleichsweise höheren Anzahl an mikrokernhaltigen Zellen, als ohne Glutathion-Depletion. Auch die Kontrolle zeigte für die Vorbehandlung mit L-Buthionin-sulfoximin eine höhere Anzahl an mikrokernhaltigen Zellen, als die Kontrolle ohne L-Buthionin-sulfoximin Behandlung.

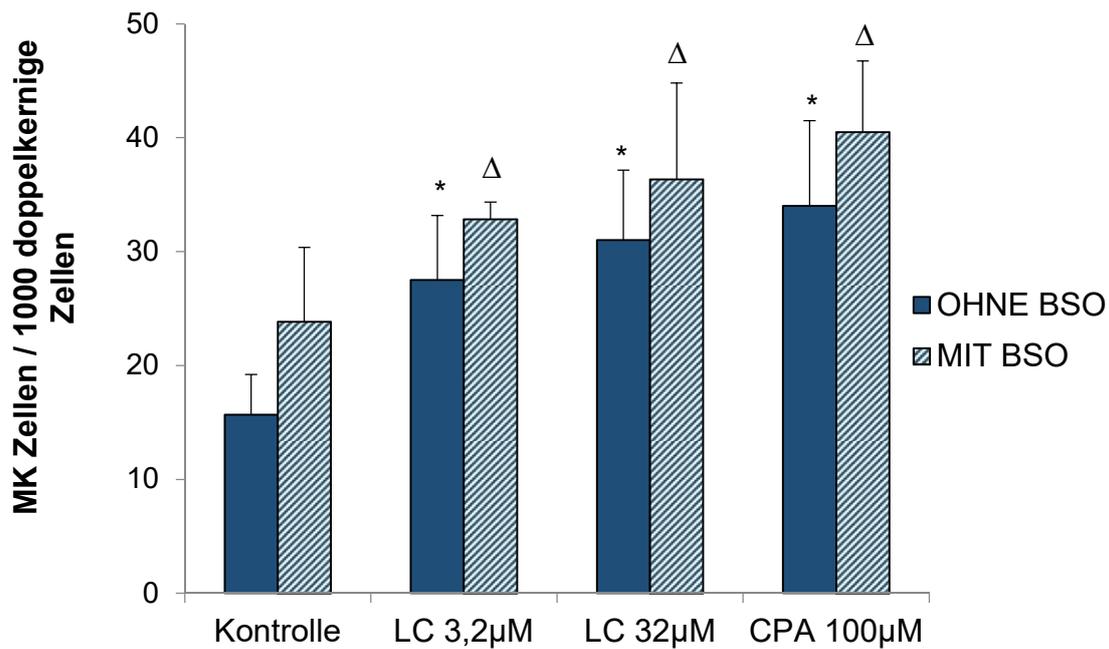


Abb. 24: Genotoxizität von Lasiocarpin unter Glutathion-Depletion

Zu sehen ist die Anzahl der mikrokernhaltigen Huh6 Zellen ohne und mit Glutathion-Depletion nach 24 h Lasiocarpin (LC) Behandlung. Als Positivkontrolle wurde Cyclophosphamid (CPA) verwendet. Die Ergebnisse wurden aus dem Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten gemittelt. Signifikante Werte nach t-Test ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle ohne L-Buthioninsulfoximin (BSO) wurden mit einem (*) markiert. Signifikante Werte nach t-Test ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle mit BSO wurden mit einem (Δ) markiert.

3.5 Protektive Effekte des Anthocyans Delphinidin gegen die Genotoxizität von Lasiocarpin im Mikrokerntest

Die Kombinationsbehandlung der Huh6 Zellen mit Lasiocarpin und dem pflanzlichen Antioxidans Delphinidin soll das natürliche Vorkommen der PA in Pflanzen nachahmen und mögliche Schutzeffekte durch Antioxidantien in Bezug auf die Genotoxizität von Lasiocarpin untersuchen. Delphinidin besitzt antioxidative und anti-genotoxische Eigenschaften. Delphinidin ist in wässriger Lösung nicht stabil, sondern wird rasch umgesetzt (Abb. 25).

Ergebnisse

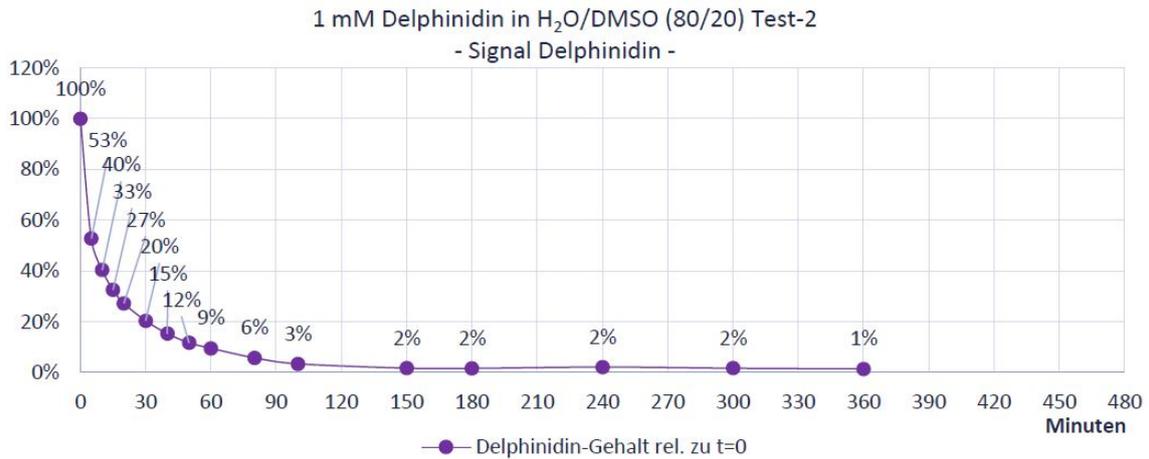


Abb. 25: Reduktion des Delphinidin-Signals

Rasche Reduktion des Delphinidin-Signals in Wasser/Dimethylsulfoxid (H₂O/DMSO) über einen Zeitraum von 360 Minuten. Die Graphik stammt aus einer Kooperation mit der SAPIOTEC GmbH (mit Genehmigung von Herrn Schmück, Herrn Broscheit).

Zeitgleich findet eine Zunahme des Umsetzungsprodukts von Delphinidin, der Carbinol-Pseudobase, statt (Abb. 26). Daher könnte man davon ausgehen, dass die Effekte des Delphinidin zumindest teilweise auch auf seine Umsetzungsprodukte zurückzuführen sind.

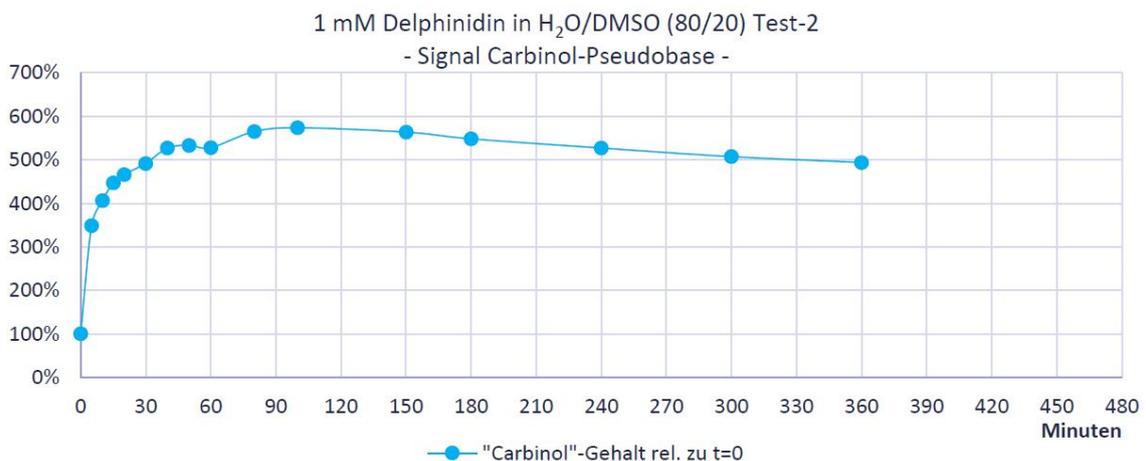


Abb. 26: Anstieg des Carbinol-Pseudobasen-Signals

Anstieg des Signals der Carbinol-Pseudobase in Wasser/Dimethylsulfoxid (H₂O/DMSO) über einen Zeitraum von 360 Minuten (Diese Messung wurde zeitgleich mit der Messung des Delphinidin-Signals durchgeführt). Die Graphik stammt aus einer Kooperation mit der SAPIOTEC GmbH (mit Genehmigung von Herrn Schmück, Herrn Broscheit).

Um realistische Szenarien humaner Expositionen besser nachzuahmen, wurden die Zellen im Mikrokerntest nicht nur mit frischem Delphinidin, sondern

auch mit gelagertem Delphinidin (2 h Inkubation bei 37 °C) behandelt, was dem Zustand in Nahrungsmitteln besser entsprechen könnte.

Wie Abbildung 25 zeigt, sank nach einer Zeitdauer von 2 h das gemessene Delphinidin-Signal auf 2 % des Ausgangswerts, während das Signal der Carbinol-Pseudobase, im Vergleich zum Anfangszeitpunkt der Lagerung, um ein Vielfaches anstieg (Abb. 26). Somit ist davon auszugehen, dass die Zellen bei einer Behandlung mit gelagertem Delphinidin hauptsächlich der Carbinol-Pseudobase bzw. möglichen anderen Umsetzungsprodukten – und nicht Delphinidin – ausgesetzt wurden.

Im Mikrokerntest wurde Lasiocarpin (32 µM) mit frischem Delphinidin (10 µM) bzw. gelagertem Delphinidin (10 µM) kombiniert. Hierfür wurden die Zellen zehn Minuten mit frischem Delphinidin bzw. gelagertem Delphinidin inkubiert, bevor Lasiocarpin für eine Dauer von 24 h zugegeben wurde.

Abbildung 27 zeigt den statistisch signifikanten Anstieg der mikrokernhaltigen Zellen für Lasiocarpin (32 µM), die beiden Kombinationsbehandlungen aus frischem Delphinidin und Lasiocarpin bzw. gelagertem Delphinidin und Lasiocarpin im Vergleich zur Kontrolle. Auch die Positivkontrolle Cyclophosphamid zeigte sich statistisch signifikant erhöht. Zudem zeigte Delphinidin (10µM) eine dezente, aber dennoch statistisch signifikante Steigerung in der Anzahl der mikrokernhaltigen Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Der Proliferationsindex zeigte eine statistisch signifikante Reduktion für die Kombinationsbehandlung aus gelagertem Delphinidin und Lasiocarpin sowie eine leichte Reduktion für die Kombinationsbehandlung aus frischem Delphinidin und Lasiocarpin im Vergleich zur Kontrolle. Zudem war der Proliferationsindex der Kombinationsbehandlung aus gelagertem Delphinidin und Lasiocarpin im Vergleich zu Lasiocarpin (32 µM) statistisch signifikant reduziert.

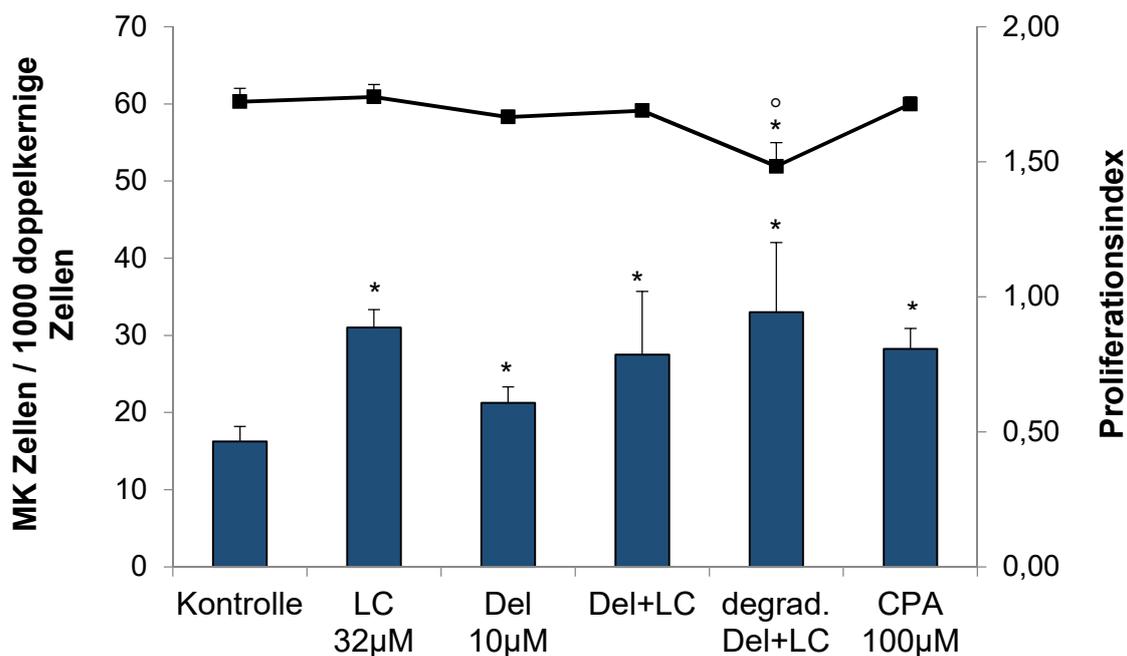


Abb. 27: Kombinationsbehandlung von Delphinidin (10 µM) und Lasiocarpin

Zu sehen ist die Anzahl der mikrokernhaltigen Zellen nach einer 24 h Behandlung mit Lasiocarpin (LC), frischem Delphinidin (Del) und einer Kombination aus frischem Delphinidin mit LC (Del+LC) bzw. gelagertem Delphinidin mit LC (degrad. Del+LC). Als Positivkontrolle wurde Cyclophosphamid (CPA) verwendet. Die Ergebnisse wurden aus dem Durchschnitt von vier unabhängigen Experimenten gemittelt. Signifikante Werte nach t-Test ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle wurden mit einem (*) markiert. Die signifikante Reduktion des Proliferationsindex für degrad. Del+LC im Vergleich zur Kontrolle wurde mit (*) und im Vergleich zu LC (32 µM) mit (°) markiert.

Da für frisches Delphinidin (10 µM) die Zahl der mikrokernhaltigen Zellen signifikant anstieg, wurde das Experiment mit einer reduzierten Delphinidinkonzentration von 3,2 µM wiederholt (Abb.28). Hier wurde ebenfalls ein statistisch signifikanter Anstieg der mikrokernhaltigen Zellen für Lasiocarpin (32 µM) und die Positivkontrolle Cyclophosphamid sichtbar. Auch frisches Delphinidin (3,2 µM) zeigte erneut einen dezenten, statistisch signifikanten Anstieg der mikrokernhaltigen Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Auffällig war die signifikante Reduktion der Anzahl der mikrokernhaltigen Zellen der beiden Kombinationsbehandlungen aus frischem Delphinidin und Lasiocarpin bzw. gelagertem Delphinidin und Lasiocarpin im Vergleich zu Lasiocarpin (32 µM). Der Proliferationsindex zeigte sich für alle getesteten Substanzen weitestgehend stabil.

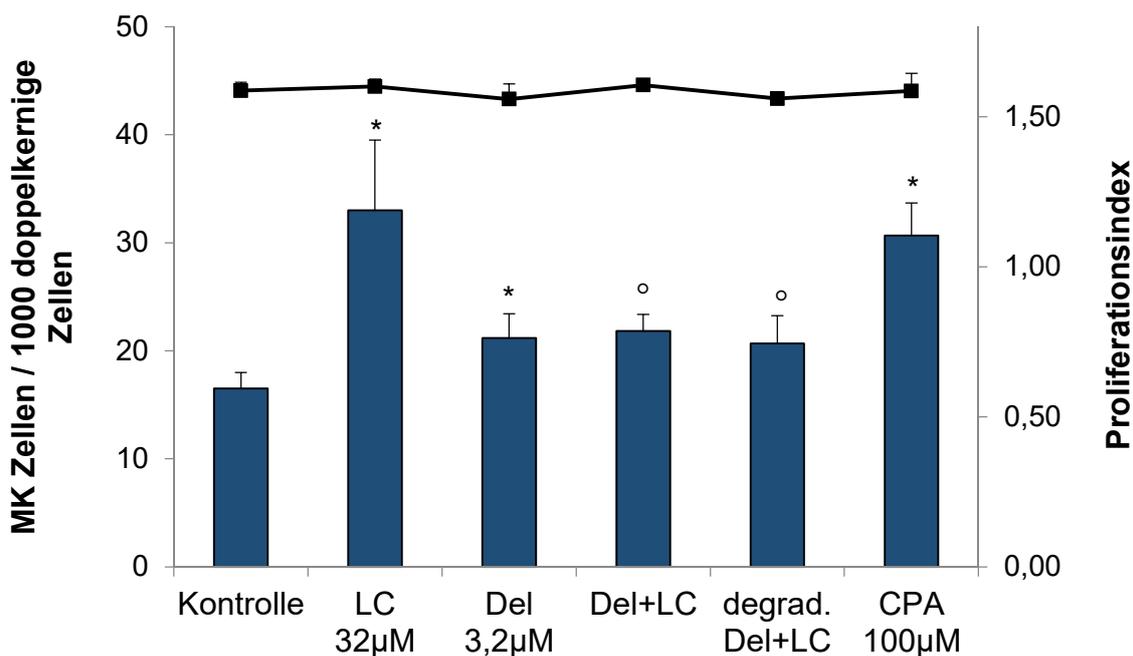


Abb. 28: Kombinationsbehandlung von Delphinidin (3,2 µM) und Lasiocarpin

Zu sehen ist die Anzahl der mikrokernhaltigen Zellen nach einer 24 h Behandlung mit Lasiocarpin (LC), frischem Delphinidin (Del) und einer Kombination aus frischem Delphinidin mit LC (Del+LC) bzw. gelagertem Delphinidin mit LC (degrad. Del+LC). Als Positivkontrolle wurde Cyclophosphamid (CPA) verwendet. Die Ergebnisse wurden aus dem Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten gemittelt. Signifikante Werte ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle wurden mit einem (*) markiert. Signifikante Werte nach t-Test ($p \leq 0,05$) im Vergleich zu Lasiocarpin (32 µM) wurden mit (°) markiert.

3.5.1 Untersuchung der Superoxid-Produktion

Die vermuteten gesundheitsfördernden Effekte des Delphinidin könnten unter anderem auf das Abfangen von freien Sauerstoffradikalen zurückgeführt werden. Daher wurde die Superoxid-Produktion für eine Behandlung mit Lasiocarpin mit Hilfe der Dihydroethidium-Färbung gemessen. Als Positivkontrolle wurde Antimycin A, eine Substanz, welche die Übertragung von Elektronen in der Atmungskette blockiert, verwendet. Ein Anstieg des Grauwerts im Vergleich zur Kontrolle entspricht einem Anstieg der Superoxid-Produktion. Wie in Abbildung 29 sichtbar ist, zeigte sich für Antimycin A (25 µM und 50 µM) ein konzentrationsabhängiger Anstieg des durchschnittlich ermittelten Grauwerts des Dihydroethidium-Signals, wobei Antimycin A (50 µM) als statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle getestet wurde. Zu keinem Zeitpunkt der Behandlung mit Lasiocarpin (32 µM) stieg das Dihydroethidium-Signal im Vergleich zur Kontrolle an.

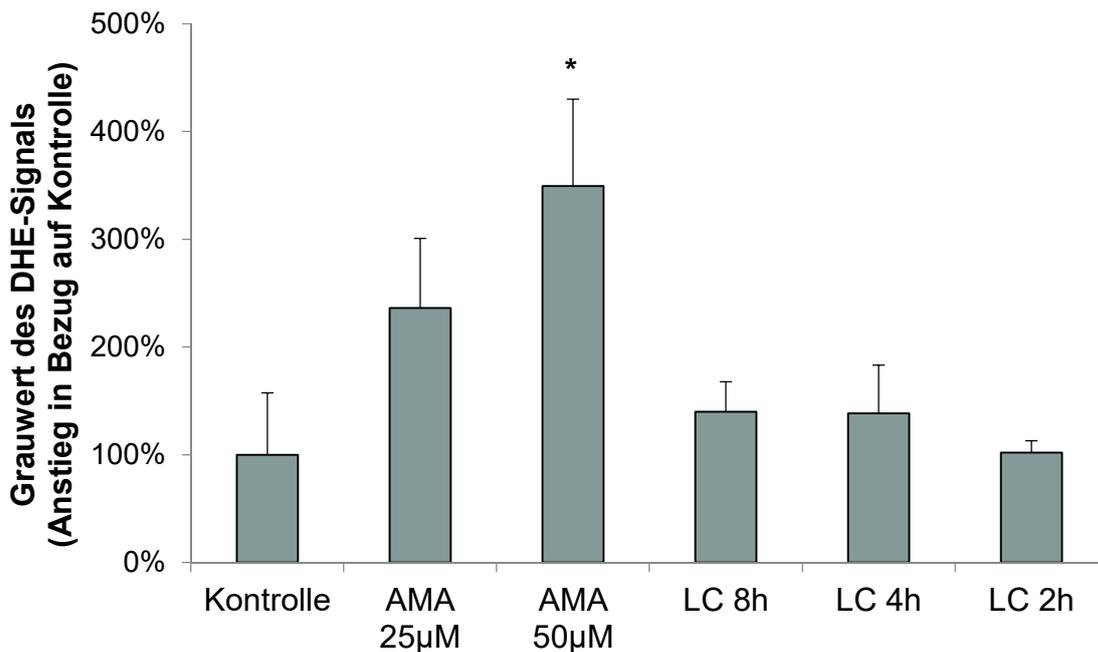


Abb. 29: Superoxidproduktion nach Lasiocarpin-Behandlung

Zu sehen ist der durchschnittliche Grauwert (in %) des zu Ethidium oxidierten Dihydroethidium (DHE)-Signals nach einer Behandlung mit Lasiocarpin (LC 32 µM) über 8 h, 4 h, 2 h bzw. mit Antimycin A (AMA) für 2 h. Ein Anstieg im Vergleich zur Kontrolle wurde als Anstieg der Superoxid-Bildung interpretiert. Die Ergebnisse wurden aus dem Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten gemittelt. Signifikante Werte nach t-Test ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle wurden mit einem (*) markiert.

3.5.2 Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials

Mitochondriale Funktionsstörungen können unter anderem durch eine Änderung des mitochondrialen Membranpotentials nachgewiesen werden. Das mitochondriale Membranpotential der Huh6 Zellen wurde in einem Zeitverlauf von 8 h, 4 h und 2 h für eine Behandlung mit Lasiocarpin (32 µM) und die Positivkontrolle mit Antimycin A untersucht. Eine Reduktion des Grauwerts des Tetramethylrhodamine-Ethyl-Ester-Signals im Vergleich zur Kontrolle entspricht einer Änderung des physiologischen mitochondrialen Membranpotentials. Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, wurde für Antimycin A (25 µM und 50 µM) eine konzentrationsabhängige Reduktion des Tetramethylrhodamine-Ethyl-Ester-Signals nachgewiesen. Für Lasiocarpin wurde nach einer Behandlungszeit von 4h keine Änderung des Tetramethylrhodamine-Ethyl-Ester-Signals im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Dagegen zeigte die Behandlung mit Lasiocarpin über 8 h bzw. 2 h eine statistisch signifikante Reduktion des Tetramethylrhodamine-Ethyl-Ester-Signals im Vergleich zur Kontrolle.

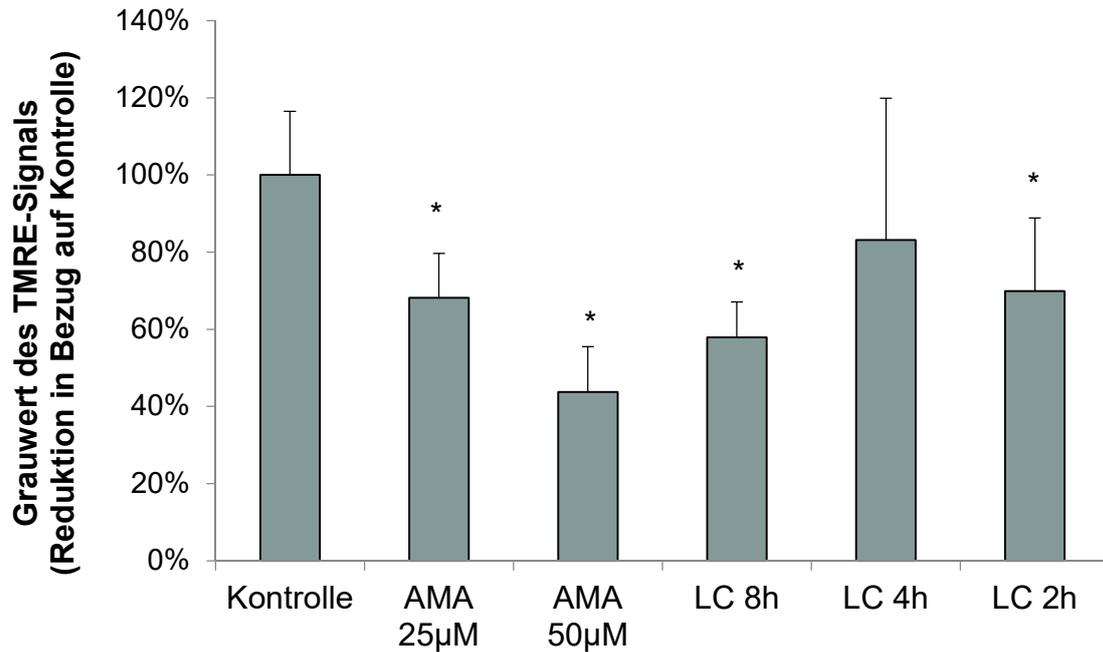


Abb. 30: Änderung des mitochondrialen Membranpotentials (% pro Zelle)

Zu sehen ist der durchschnittliche Grauwert pro Zelle (in %) des Tetramethylrhodamine-Ethyl-Ester (TMRE)-Signals nach einer Behandlung mit Lasiocarpin (LC 32 µM) für 8 h, 4 h und 2 h bzw. mit Antimycin A (AMA) für 2 h. Eine Reduktion im Vergleich zur Kontrolle wurde als Änderung des physiologischen mitochondrialen Membranpotentials interpretiert. Die Ergebnisse wurden aus dem Durchschnitt von vier unabhängigen Experimenten gemittelt. Signifikante Werte nach t-Test ($p \leq 0,05$) im Vergleich zur Kontrolle wurden mit einem (*) markiert.

4 Diskussion

4.1 Mikrokerntest – mit und ohne Cytochalasin-B

Das Standardprotokoll für den Mikrokerntest nach Fenech (2007) betont die Notwendigkeit, die Zellen mit Cytochalasin-B zu behandeln, um eine höhere Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit zu erhalten. Dies gilt jedoch vor allem für Lymphozyten, da für kultivierte Zellen mit exponentiellem Wachstum der Mikrokerntest auch ohne Cytochalasin-B zuverlässig ist (Lorge, Thybaud et al. 2006). Vor dem Hintergrund, dass in der Publikation von Allemang, Mahony et al. (2018) die Mikrokerninduktion der PA mit Hilfe der Durchflusszytometrie, einer Methode bei der ohne Cytochalasin-B gearbeitet wird, untersucht wurde, ist ein Vergleich bezüglich der Sensitivität des Mikrokerntests mit und ohne Cytochalasin-B Behandlung sinnvoll.

Am Beispiel von Lasiocarpin zeigte sich im Vergleich beider Protokolle eine etwas bessere Induktion von Mikrokernen ohne Cytochalasin-B Behandlung. Jedoch ist nur bei Zugabe von Cytochalasin-B eine Auswertung des Proliferationsindex möglich. Dieser liefert wichtige Informationen zu zytostatischen Effekten der Testsubstanzen. Beispielsweise kann eine niedrige Anzahl an doppelkernigen Zellen auf eine verringerte Mitoserate hinweisen (Fenech 2007). Für das Protokoll ohne Cytochalasin-B sollte daher zusätzlich immer eine Methode zur Ermittlung der Zellproliferation bzw. Mitoseaktivität eingesetzt werden.

Aufgrund der bisher bewährten Erhebung des Proliferationsindex, bei geringem Unterschied in der Sensitivität zur Genotoxizität, wurden alle weiteren Mikrokerntests mit Cytochalasin-B Behandlung durchgeführt.

4.2 Genotoxizität der Testsubstanzen

Mit Hilfe des Mikrokerntests wurde das genotoxische Potential von Lasiocarpin, Senecionin und Seneciphyllin in den Huh6 Zellen untersucht. Die Huh6 Zellen mit ihrer hohen metabolischen Aktivität eignen sich sehr gut für Genotoxizitätsexperimente mit Promutagenen (Waldherr, Misik et al. 2018). Lasiocarpin gilt als eines der potentesten PA, was bereits durch zahlreiche

Studien belegt werden konnte (Fu, Xia et al. 2004). Lasiocarpin zeigte auch in den Huh6 Zellen eine Induktion der Mikrokerne. Die niedrige getestete Dosis von 3,2 μM führte zu einer signifikanten Erhöhung der mikrokernhaltigen Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Allemang, Mahony et al. (2018) konnten bereits ab einer Lasiocarpinkonzentration von 0,59 μM eine signifikante Steigerung der Mikrokernfrequenz in den HepaRG Zellen zeigen. Diese deutlich geringere Konzentration ist vermutlich auf die hohe Sensitivität der verwendeten HepaRG Zellen zur Detektion genotoxischer Substanzen zurückzuführen (Hégarat, Mourot et al. 2014). Begründet wird dies unter anderem mit der starken Expression der CYP-Enzyme, welche durch eine Differenzierung der HepaRG Zellen im Vorfeld noch gesteigert wird. Vor allem die dadurch in hohem Maße enthaltenen CYP3A4 und CYP2B Subtypen (Anthérieu, Chesné et al. 2010) spielen für die PA-Metabolisierung eine wichtige Rolle (Moreira, Pereira et al. 2018).

Auch der Nachweis von DNA-Addukten in Lebertumoren anhand einer in vivo Studie zeigt das genotoxische und karzinogene Potential von Lasiocarpin. Hierfür wurden Ratten mit 4,5 μMol und 24 $\mu\text{Mol/kg}$ Körpergewicht pro Tag oral gefüttert und anschließend DNA aus der Leber isoliert und die DNA-Addukte durch Massenspektromie (LC/MS/MS) quantifiziert. Die Dosis von 24 $\mu\text{Mol/kg}$ Körpergewicht pro Tag führte zu einer Detektion von DNA-Addukten, während die Dosis von 4,5 $\mu\text{Mol/kg}$ Körpergewicht pro Tag keine messbare Adduktmenge verursacht (Xia, Zhao et al. 2013). Auch Laconi, Sarma et al. (1995) konnten in einer Rattenstudie zeigen, dass Lasiocarpin in einer einmaligen Dosis von 80 $\mu\text{Mol/kg}$ Körpergewicht Leberschäden wie Megalozytose, Fibrose, Zirrhose und maligne Neoplasien verursacht.

Insgesamt kommen alle Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass Lasiocarpin genotoxische, karzinogene sowie hepatotoxische Eigenschaften besitzt.

In Pflanzen kommt Lasiocarpin hauptsächlich in der *Heliotropium*-Spezies (Sonnenwenden) vor. Diese werden in Form von Kräutern in Griechenland, Indien, Afrika, Südamerika und im arabischen Raum eingesetzt (Huxtable 1989). Daher kam es in der Vergangenheit bereits mit Samen von *Heliotropium lasiocarpum* zu Vergiftungsfällen beim Menschen, beispielsweise

durch Verunreinigung von Gerste in Asien (Huxtable 1989) oder Tee in Hongkong (Culvenor, Edgar et al. 1986). Des Weiteren traten Vergiftungen nach dem Konsum von *Heliotropium eichwaldii* zu medizinischen Zwecken in Indien (Datta, Khuroo et al. 1978) sowie durch verunreinigtes Getreide in Afghanistan, Pakistan und Indien auf (Prakash, Pereira et al. 1999, Moreira, Pereira et al. 2018).

Im Gegensatz zu Lasiocarpin ist die Datenlage zur Genotoxizität von Senecionin und Seneciphyllin insgesamt etwas geringer, obwohl Senecionin bereits in den 60er Jahren als genotoxisch, hepatotoxisch und tumorigen eingestuft wurde (Mattocks 1968). Später konnte nachgewiesen werden, dass Senecionin in primären Rattenhepatozyten DNA-Reparatursysteme stimuliert (Green, Segall et al. 1981). Zudem wurden beide PA in einem Amestest als mutagen identifiziert (Rubiolo, Pieters et al. 1992). In vivo Untersuchungen mit Pflanzenextrakten, welche Senecionin enthielten, führten in Ratten zu hepatozellulären oder angiogenen Tumoren, wobei weibliche Tiere deutlich stärker betroffen waren als männliche (Habs, Habs et al. 1982). Zudem wird Senecionin in Studien als embryotoxisch, plazenta- und milchgängig beschrieben (BfR 2007).

Hinweise auf die Genotoxizität von Seneciphyllin lieferte die Zunahme des Schwesterchromatidaustauschs in einer Untersuchung von chinesischen V79 Hamsterzellen in Ko-Kultur mit primären Hepatozyten aus Hühnerembryonen (WHO 1988). Zudem wird durch das BfR (2007) auf die Gefahr durch den aus Seneciphyllin entstehenden sekundären Metaboliten – das Dehydroretronecin - aufmerksam gemacht. Dieser Metabolit wurde von der "International Agency for Research on Cancer" (IARC) als karzinogen bewertet (IARC 1976). Darüber hinaus konnte jüngst in einer Studie mit über 37 verschiedenen PA bzw. ihrer N-Oxide mittels γ H2AX-Färbung, einer Methode zum Nachweis von Doppelstrangbrüchen, gezeigt werden, dass sowohl Senecionin, als auch Seneciphyllin zur Gruppe der am stärksten DNA-schädigenden PA gehören (Louisse, Rijkers et al. 2019).

Die von uns durchgeführten Mikrokerntests zeigten ebenfalls eine deutliche Induktion von Mikrokernen durch Senecionin und Seneciphyllin. Dabei führte die Konzentration von 30 μM Senecionin zu einem Anstieg der mikrokernhaltigen Zellen. Seneciphyllin induzierte in der Konzentration von 32 μM Mikrokern. Eine DNA-Interaktion beider Substanzen ist bereits aus einer Untersuchung in bovinen Nierenepithelzellen bekannt; beide PA zeigten ab einer Konzentration von 50 μM signifikante Effekte. Dabei induzierte Seneciphyllin in größerem Umfang DNA-Quervernetzungen als Senecionin (Hincks, Kim et al. 1991). Aus dieser Studie konnte auch abgeleitet werden, dass makrozyklische Diester ein deutlich höheres Potential zur DNA-Quervernetzung besitzen, als offene Diester. Dies unterstützt die These von Mattocks, Driver et al. (1986), dass PA mit makrozyklischen Säuren toxischer sind als offene Di- oder Monoester.

Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mikrokerntests. Hier zeigte sich Lasiocarpin deutlich potenter als Senecionin und Seneciphyllin. Doch auch andere makrozyklische Diester zeigten sich in Mikrokerntests bereits weniger potent als Lasiocarpin. Beispielsweise fand sich bei Riddelliin 1/5 der genotoxischen Potenz von Lasiocarpin und Monocrotalin zeigte sogar um den Faktor 100-400fach schwächere Effekte (Allemang, Mahony et al. 2018). Das Potential der PA zur DNA-Quervernetzung korreliert demnach nicht mit dem Ausmaß der Mikrokernentstehung. Berücksichtigt man, dass die Induktion von DNA-Quervernetzungen durch PA mit einer Hemmung der Mitose einhergeht (Hincks, Kim et al. 1991), kann dies möglicherweise eine Erklärung dafür sein, dass sich die starken DNA-Vernetzer Senecionin und Seneciphyllin als weniger genotoxisch zeigten, als Lasiocarpin. Dies könnte sich jedoch nur auswirken, wenn in den Tests kein Cytochalasin-B verwendet wird.

In Mikrokerntests mit Cytochalasin-B dagegen kann die deutlich einfachere enzymatische Metabolisierung von Lasiocarpin eine Erklärung für die höhere genotoxische Potenz sein. Es ist bereits bekannt, dass offene Diester leichter der Hydrolyse durch Esterasen zugänglich sind, als makrozyklische PA

(Mattocks, Driver et al. 1986). Interessant dazu sind Untersuchungen zur Hydrolyse durch Carboxylesterasen mit makrozyklischen PA. Fu, Xia et al. (2004) fasst die Ergebnisse mehrere Studien zusammen und kommt zu dem Schluss, dass vor allem sterische Hindernisse am C9-Ester zu niedrigen Hydrolyseraten und damit einer gewissen Substratspezifität der Esterasen beitragen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die chemische Struktur der Säuren auch für die Zugänglichkeit der CYP-Enzyme eine entscheidende Rolle spielt, wodurch schlussendlich die Entstehung toxischer Metabolite beeinflusst wird.

Betrachtet man insgesamt die gesundheitliche Gefahr, die von Senecionin und Seneciphyllin ausgehen könnte, so ist zunächst eine Exposition mit beiden PA im Hinblick auf die weite Verbreitung von *Senecio*-Pflanzenarten in unseren Breitengraden sehr wahrscheinlich. Geringe Wachstumsansprüche, eine hohe Samenproduktion sowie die Resistenz gegenüber verschiedenen Herbizid-Gruppen führen dazu, dass sich vor allem *Senecio vulgaris* (gemeines Greiskraut) sowie *Senecio jacobaea* (Jakobs-Greiskraut) massenhaft vermehren (BfR 2007, Kempf 2009). Damit einher geht eine steigende Anzahl an Vergiftungsfällen von Pferden und Kühen (Cortinovic und Caloni 2015) sowie die zunehmende Gefahr der Kontamination von Obst-, Gemüse- und Blumenkulturen (BfR 2007). Daher stellt neben dem Nachweis beider PA in Honigen auch die Kontamination von Salatmischungen mit *Senecio vulgaris* eine potentielle Quelle der PA-Aufnahme dar. Der maximale Gesamtgehalt von 83 % Senecionin bzw. 59 % Seneciphyllin in Proben dieser Pflanze (Borstel, Witte et al. 1989) unterstreicht die Bedeutung der beiden PA hinsichtlich des gesundheitlichen Risikos durch verunreinigte Lebensmittel. Daher sollten in Zukunft noch weitere Untersuchungen beider PA bezüglich ihres kanzerogenen Potentials durchgeführt werden.

4.3 Enzymaktivität der CYP1A in den Huh6 Zellen

Für die Metabolisierung der PA zu toxischen Pyrrolestern scheinen hauptsächlich die Isoformen CYP3A4 und CYP2B verantwortlich zu sein (Fu, Xia et al. 2004). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch die Arbeitsgruppe um

Ruan, Yang et al. (2014), welche die Menge an Pyrrol-Protein-Addukten detektierte, welche durch Inkubation von Lasiocarpin mit jeweils zehn verschiedenen CYP-Enzymen entstand. Dabei zeigte sich für Lasiocarpin ein Anstieg der Pyrrol-Protein-Addukte bei Inkubation mit CYP3A4 und CYP3A5, interessanterweise aber auch für die Inkubation mit CYP1A1 (Ruan, Yang et al. 2014). Daher wird von den Autoren eine Beteiligung dieser drei CYP-Enzyme an der Aktivierung von Lasiocarpin zu toxischen Metaboliten als sehr wahrscheinlich angesehen.

Ebmeyer, Braeuning et al. (2019) verglich die Reduktion des Lasiocarpingehalts in Anwesenheit von verschiedenen humanen CYP-Enzymen in Lebermikrosomen. Dabei konnte für die CYP3A4 bzw. CYP3A5 eine deutliche Reduktion des nicht-metabolisierten Lasiocarpins gemessen werden. Wohingegen durch eine Inkubation mit CYP1A1 oder CYP1A2 keine Reduktion des Lasiocarpingehalts nachgewiesen werden konnte, sodass eine Beteiligung dieser beiden Enzyme am Metabolismus von Lasiocarpin anhand dieser Studie als unwahrscheinlich anzusehen ist. Insgesamt kann zum jetzigen Zeitpunkt aus den aktuellen Daten der Fachliteratur die Rolle der CYP1A im Metabolismus von Lasiocarpin noch nicht eindeutig bewertet werden.

In den Huh6 Zellen wurde bislang nur das Vorhandensein der CYP3A4, CYP3A7, CYP4F3, CYP2B6 und UGT1A1 beschrieben (Sugatani, Osabe et al. 2010, Hosomi, Fukami et al. 2011, Goldstein, Rivlin et al. 2012, Waldherr, Misik et al. 2018). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals untersucht, ob die CYP1A in den Huh6 Zellen exprimiert wird und inwiefern die Enzymaktivität durch Lasiocarpin, Cyclophosphamid und Benzo(a)pyren beeinflusst wird.

Der dafür durchgeführte EROD-Assay spiegelt die Enzymaktivität der CYP1A anhand der Fluoreszenzintensität von Resorufin wider, welches durch die CYP1A aus Ethoxyresorufin metabolisiert wird.

Vor allem Benzo(a)pyren verursachte eine besonders hohe CYP1A-Enzymaktivität, welche vermutlich auf eine Enzyminduktion zurückzuführen ist (Ma und Lu 2007). Cyclophosphamid und Lasiocarpin verursachten keine detektierbare Änderung der Enzymaktivität und konnten daher dieses Enzym weder induzieren noch inhibieren. Dennoch ist eine

Beteiligung der CYP1A an der Metabolisierung von Lasiocarpin durchaus in Erwägung zu ziehen. Lasiocarpin zeigte sich in den Mikrokernelperimenten als besonders genotoxisch im Vergleich zu Senecionin bzw. Seneciphyllin. Dafür ist, neben der chemischen Struktur der PA, vermutlich auch eine unterschiedliche Spezifität der verschiedenen CYP-Enzyme verantwortlich. Für Senecionin und Seneciphyllin wurde nämlich eine starke Beteiligung der CYP2A6 und nicht der CYP1A gezeigt (Ruan, Yang et al. 2014). Das Vorhandensein der CYP2A6 wurde jedoch bislang noch nicht für die Huh6 Zellen beschrieben, wohingegen unser EROD-Assay zeigen konnte, dass die CYP1A in den Huh6 Zellen exprimiert wird.

In Zukunft sollte die Charakterisierung der Huh6 Zellen bezüglich ihrer CYP-Enzyme fortgeführt und die Beteiligung der verschiedenen Isoformen an der Metabolisierung von PA untersucht werden.

4.4 Lasiocarpin - Die Rolle von Glutathion und der Einfluss auf die Genotoxizität

Lasiocarpin wurde ausgewählt um zelluläre Mechanismen und Einflussfaktoren, welche für die Toxizität der PA verantwortlich sind, besser zu verstehen. Dabei steht unter anderem oxidativer Stress und die Rolle des Glutathions im Fokus. Dass Glutathion die toxischen Pyrrolester bindet, konnte bereits am Beispiel von Clivorin gezeigt werden (Lin, Cui et al. 2000). Außerdem konnte ein Vergleich mit zwölf unterschiedlichen PA in Leber-Mikrosomen verdeutlichen, dass die größte Menge an 7-GSH-DHPA-Addukten durch Lasiocarpin entsteht (Ruan, Yang et al. 2014).

Die von uns durchgeführte Messung des intrazellulären Glutathion-Gehalts mittels Monochlorobiman-Farbstoff zeigte für Lasiocarpin (32 μ M) eine dezente Reduktion des Glutathion-Gehalts. Dieses Ergebnis steht mit den in der Fachliteratur vorhandenen Hinweisen in Einklang, dass PA bzw. ihre Metabolite mit Glutathion interagieren und dadurch die Menge an freiem Glutathion senken. In Zukunft sollten noch weitere Glutathion-Bestimmungsmethoden durchgeführt werden, da der hier verwendete Monochlorobiman-Farbstoff nicht

nur an freies Glutathion, sondern auch an eine zweite freie SH-Gruppe der 7-GSH-DHPA-Addukte binden kann.

In der Fachliteratur wird kontrovers diskutiert, ob die Glutathion-Konjugation der toxischen Pyrrolester eine wirkungsvolle Schutzfunktion darstellt, da die Glutathion-Addukte unter bestimmten Bedingungen auch als genotoxisch beschrieben wurden (Schramm, Kohler et al. 2019). Mögliche negative Effekte eines dauerhaft erniedrigten intrazellulären Glutathion-Gehalts, zum Beispiel aufgrund einer chronischen PA-Zufuhr durch belastete Lebensmittel, sollten in diesem Kontext berücksichtigt werden. Schließlich führt eine Senkung des zellulären Glutathions um mehr als 30 % in der Leber zu Veränderungen in der Metabolisierung von Xenobiotika und einer steigenden Toxizität elektrophiler Metabolite (Plummer, Smith et al. 1981).

Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluss von Glutathion auf die Genotoxizität von Lasiocarpin im Mikrokerntest weiter untersucht. Durch eine Vorbehandlung der Zellen mit L-Buthionin-sulfoximin zur Glutathion-Depletion kann der Zusammenhang zwischen Änderungen des Glutathion-Gehalts und der Toxizität von Substanzen sehr gut untersucht werden (Griffith und Meister 1979, Kretzschmar 1996). Dies konnte beispielsweise bereits für genotoxische Substanzen wie Cisplatin, einem alkylierenden Zytostatikum, oder Patulin, einem Mykotoxin, gezeigt werden. Hier bewirkte die Glutathion-Depletion mittels L-Buthionin-sulfoximin einen zusätzlichen Anstieg der Mikrokernanzahl, sodass der deutliche Einfluss des Glutathion-Gehalts auf die Entstehung von DNA-Schäden von den Autoren hervorgehoben wurde (Khyriam und Prasad 2003, Glaser und Stopper 2012).

Daher wurde als Hypothese angenommen, dass eine Reduktion des intrazellulären Glutathion-Gehalts mit einer stärkeren Mikrokerninduktion durch Lasiocarpin einhergehen könnte, sofern Glutathion eine Rolle in der Entgiftung spielt. In dem von uns durchgeführten Mikrokerntest wurde sowohl in den mit Lasiocarpin behandelten Zellen, als auch in der Kontrolle nach vorheriger Glutathion-Depletion tendenziell eine höhere Anzahl an mikrokernhaltigen Zellen detektiert. Es zeigte sich jedoch in keiner Probe ein statistisch

signifikanter Unterschied in der Anzahl an mikrokernhaltigen Zellen mit bzw. ohne Glutathion-Depletion.

Die erfolgreiche Glutathion-Depletion in den Huh6 Zellen durch eine L-Buthionin-sulfoximin-Behandlung (250 μ M) konnte für einen Zeitraum von 24 h im GSH-Assay klar gezeigt werden. Es ist jedoch bekannt, dass Zellen durch oxidativen Stress mit einer gesteigerten Expression des Enzyms Glutamat-Cystein-Ligase reagieren (Lu 2013). Da durch die L-Buthionin-sulfoximin-Vorbehandlung künstlich oxidativer Stress induziert wurde, liegt eine solche Reaktion der Huh6 Zellen sehr nahe. Der Glutathion-Gehalt könnte sich im Verlauf des Mikrokernexperiments (Zeitraum: 6 Tage) wieder normalisiert haben, sodass lediglich eine anfängliche Reduktion des Glutathion-Gehalts vorhanden war.

Zudem scheinen PA auch direkt die Glutathion-Synthese zu beeinflussen. Interessant hierzu ist eine *in vivo* Untersuchung von Yan und Huxtable (1996). Die mit Monocrotalin gefütterten Ratten zeigten nach 24 h eine signifikante Steigerung der Enzymaktivität sowohl für die Glutamat-Cystein-Ligase, als auch die Glutathion-Synthetase in Leber und Lunge. Daher wird von den Autoren ein Anstieg des Glutathion-Gehalts in Korrelation mit dem Vorhandensein der PA-Metabolite als sehr wahrscheinlich angesehen. Andererseits fanden wir keinen signifikanten Anstieg des intrazellulären Glutathion-Gehalts nach einer Behandlung mit Lasiocarpin, sondern wie bereits erwähnt eine dezente Reduktion.

Insgesamt ist die Rolle von Glutathion in der Lasiocarpin-induzierten Genotoxizität schwer zu beurteilen. Es besteht die Möglichkeit, dass sowohl die toxischen Pyrrolester selbst, als auch die GSH-DHPA-Konjugate mit der DNA interagieren und zur Mikrokernentstehung durch PA beitragen. Dies zeigt beispielsweise auch eine *in vitro* Studie mit Kälberthymus-DNA, bei der GSH-DHPA-Konjugate die gleichen DNA-Addukte verursachen, wie die toxischen Pyrrolester alleine (Xia, Ma et al. 2015, Schramm, Kohler et al. 2019). Außerdem wurde von Ruan, Yang et al. (2014) beschrieben, dass die Adduktbildung der toxischen Pyrrolester mit Glutathion zeitlich parallel zur Adduktbildung mit Proteinen abläuft. Die Autoren vermuten, dass eine

Interaktion der toxischen Pyrrolester mit anderen Biomolekülen nicht verhindert werden kann, auch wenn genügend freies Glutathion für eine Adduktbildung zur Verfügung stehen würde. Im Umkehrschluss würde daher ein reduzierter intrazellulärer Glutathion-Gehalt nicht zwangsläufig zu einer stärkeren Mikrokerninduktion durch Lasiocarpin führen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zahlreiche Studien und auch der hier durchgeführte Glutathion-Assay zwar eine Wechselwirkung zwischen Glutathion und Lasiocarpin zeigen, jedoch der Einfluss des Glutathion-Gehalts in der Entstehung von genotoxischen Schäden durch Lasiocarpin eine untergeordnete Rolle spielt.

4.5 Protektive Effekte des Anthocyans Delphinidin im Mikrokerntest

Das natürliche Antioxidans Delphinidin gehört zu den Anthocyaninen, die der Gruppe der Flavenoide zugeordnet werden. Diese sekundären Pflanzenstoffe sind für die rote bzw. blaue Farbe von Blüten, Früchten und Blättern verantwortlich. Sie werden über Nahrungsmittel wie Wein, Beeren, Obst oder Gemüse in den menschlichen Organismus aufgenommen. Dabei schwankt die tägliche individuelle Aufnahmemenge und ist abhängig von den jeweiligen Ess- bzw. Trinkgewohnheiten (Pojer, Mattivi et al. 2013). Die Angaben für einen US-Bürger werden auf 12,5–200 mg pro Tag geschätzt (Pojer, Mattivi et al. 2013), während die Auswertung der nationalen Verzehrstudie durch Linseisen, Radtke et al. (1997) für die bayrische Bevölkerung eine Aufnahmemenge von 2,7 mg pro Tag (Schwankungsbreite von 0–76 mg) ergab. Bereits 6–20 Minuten nach dem Verzehr werden Anthocyanine absorbiert und aufgrund einer in vivo Studie an Mäusen wird beschrieben, dass circa 51,5 % der aufgenommenen Menge in der Leber akkumulieren. Zudem wird darauf hingewiesen, dass sich die Anthocyanine während der Absorption in Methoxy-Anthocyanine umwandeln und dadurch vermutlich besser im Körper anreichern können (Sakakibara, Ogawa et al. 2009, Pojer, Mattivi et al. 2013).

Die zahlreichen gesundheitsfördernden Effekte wie Schutz vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs wurden bereits in einigen in vitro und in vivo Studien

belegt. Dabei spielt die Stimulation von Phase II Entgiftungsenzymen, vor allem der Glutathion-Reduktase, Glutathion-Peroxidase sowie Glutathion-S-Transferase, aber auch die Reduktion von oxidativen DNA-Addukten und die Inhibition von Umweltgiften oder Toxinen eine wichtige Rolle (Pojer, Mattivi et al. 2013).

Es konnte beispielsweise in vivo die Reduktion von DNA-Schäden für eine Kombination aus genotoxischen Substanzen, wie Cyclophosphamid oder Cisplatin, mit Delphinidin durch Auswertung von Mäusezellen in einem Mikrokerntest gezeigt werden (Khandelwal und Abraham 2014). Als wichtigster Schutzmechanismus der Anthocyanine gilt dabei ihre Fähigkeit reaktive Sauerstoffspezies abzufangen. Dies ist unter anderem durch das Vorhandensein von Hydroxylgruppen möglich (Wang und Stoner 2008). Delphinidin kann aber auch zusätzlich über eine Induktion der Hämooxygenase (HO-1), ein Enzym welches intrazellulär an der Homöostase des Redoxsystems beteiligt ist, seine antioxidative/anti-inflammatorische und antikanzerogene Wirkung entfalten (Bankoglu, Broscheit et al. 2018).

Durch eine Kombination von Delphinidin und Lasiocarpin in einem Mikrokerntest wurde das natürliche Vorkommen der PA in Pflanzen nachgeahmt und diente dabei beispielhaft als Verzehr-Szenario von PA-haltigen Produkten. Dafür wurde eine Kombinationsbehandlung der Huh6 Zellen aus Lasiocarpin mit frischem Delphinidin und gelagertem Delphinidin durchgeführt. Letzteres besteht hauptsächlich aus den Umsetzungsprodukten des Delphinidin und soll an eine realistischere Exposition im Menschen angelehnt sein, da in der Fachliteratur häufig auf die geringe Bioverfügbarkeit der Anthocyanine selbst und stattdessen auf den Nachweis von Umsetzungsprodukten in Serum und Urin hingewiesen wird (Pojer, Mattivi et al. 2013).

Dass Delphinidin sehr instabil ist, konnte in vitro mittels einer LC-MS-Analyse gezeigt werden (D. Schmück, J. Broscheit, persönliche Mitteilung 2019). Bereits 2 h nach Beginn der Aufzeichnungen sinkt das Delphinidin-Signal auf unter 3 % des Ausgangswertes, während das Signal des Umsetzungsprodukts zeitgleich auf mehr als 500 % des Ausgangswertes ansteigt. Dieses Umsetzungsprodukt

wurde anschließend analytisch als Carbinol-Pseudobase charakterisiert (Schmück, Broscheit, persönliche Mitteilung 2019). Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass in vivo möglicherweise auch die Umsetzungsprodukte des Delphinidins für die gesundheitsförderlichen Effekte verantwortlich sind.

Für die Kombinationsbehandlung im Mikrokerntest aus Delphinidin (10 μM) bzw. gelagertem Delphinidin mit Lasiocarpin (32 μM) konnte keine Reduktion der Genotoxizität von Lasiocarpin gezeigt werden. Allerdings muss bei der Interpretation dieses Ergebnisses berücksichtigt werden, dass auch reines Delphinidin (10 μM) eine signifikante Induktion der mikrokernhaltigen Zellen verursachte. Dies steht im Widerspruch zu den in der Literatur beschriebenen Schutzeffekten von Delphinidin vor DNA-Schäden und den Ergebnissen anderer Studien. Beispielsweise fand in NRK-Zellen (einer Nierenzelllinie) keine signifikante Induktion der Mikrokerne durch Delphinidin (10 μM) statt (Bankoglu, Broscheit et al. 2018). Auch eine in vivo Untersuchung an Mäusen zeigte keine Steigerung der Mikrokernrate für die Behandlung mit Delphinidin im Vergleich zur Kontrollgruppe (Azevedo, Alves de Lima et al. 2007).

Entgegen dieser Belege für die gesundheitsfördernden bzw. nicht-genotoxischen Effekte, wird für Anthocyanine aber auch eine prooxidative Wirkung beschrieben. Auf molekularer Ebene wird dies auf ihre Fähigkeit zurückgeführt, Metallionen, beispielsweise Kupfer oder Eisen, zu reduzieren, welche anschließend wieder unter Entstehung von reaktiven Sauerstoffradikalen oxidiert werden (Eghbaliferiz und Iranshahi 2016). Abhängig von der Konzentration, dem pH-Wert und dem Vorhandensein von Cu-Ionen zeigte auch Delphinidin eine solche prooxidative Wirkung (Fukumoto und Mazza 2000). Da prooxidative Substanzen die reaktiven Sauerstoffradikale vor allem in Krebszellen und in der Anwesenheit von Kupfer generieren (Eghbaliferiz und Iranshahi 2016), besteht durchaus die Möglichkeit, dass dies in den Huh6 Zellen zur Mikrokerninduktion durch Delphinidin geführt hat. Der Kupfergehalt der Huh6 Zellen wurde nicht bestimmt, doch auch ohne Zugabe von Kupfer konnte beispielsweise in Zellkernen von Lymphozyten ein signifikanter Anstieg von DNA-Brüchen durch Delphinidin (10 μM) beobachtet werden (Hanif, Shamim et al. 2008).

Für die starke Reduktion des Proliferationsindexes in der Kombination aus gelagertem Delphinidin und Lasiocarpin sind möglicherweise zytostatische Effekte verantwortlich. Beispielhaft wurde für drei Metabolite der Anthocyanine von Forester, Choy et al. (2014) gezeigt, dass ein Zellzyklus-Arrest der CaCo-2 Kolonkrebiszellen in der G0/G1 Phase verursacht wird und Transkriptionsfaktoren der Zellproliferation gehemmt werden.

Die Reduktion des Proliferationsindexes konnte lediglich in der Kombination aus Lasiocarpin mit gelagertem Delphinidin, jedoch nicht mit frischem Delphinidin beobachtet werden. Ursache könnte die längere zeitliche Verfügbarkeit der Umsetzungsprodukte des Delphinidin für die Zellen in der Kombination aus Lasiocarpin und gelagertem Delphinidin sein. Außerdem könnte man vermuten, dass Lasiocarpin die Umsetzung von frischem Delphinidin und die damit verbundenen Mechanismen beeinflusst.

Aufgrund der Mikrokerninduktion durch Delphinidin (10 μM), wurde das Experiment mit einer reduzierten Delphinidinkonzentration (3,2 μM) wiederholt, um den genotoxischen Effekt durch möglicherweise zu hohe Dosen von Delphinidin auszuschließen. Auch hier induzierte Delphinidin eine geringe, aber dennoch signifikante Anzahl an mikrokernhaltigen Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Der Faktor, um den sich die Anzahl an mikrokernhaltigen Zellen im Vergleich zur Kontrolle erhöhte, beträgt für Delphinidin (3,2 μM) 1,32 und für Delphinidin (10 μM) 1,31.

Interessanterweise zeigte sich in diesem Mikrokerntest in den Kombinationsbehandlungen aus Lasiocarpin mit frischem Delphinidin bzw. gelagertem Delphinidin (3,2 μM) eine signifikante Reduktion der mikrokernhaltigen Zellen im Vergleich zu Lasiocarpin. Delphinidin und gelagertes Delphinidin verursachen also in höherer Konzentration keinen Schutzeffekt, besitzen aber in niedrigerer Konzentration die Fähigkeit die Genotoxizität von Lasiocarpin in einer Kombinationsbehandlung deutlich zu reduzieren.

Die Frage, ob Delphinidin bzw. seine Umsetzungsprodukte in diesem Fall reaktive Sauerstoffspezies abfangen und dadurch die Genotoxizität von Lasiocarpin minimieren, kann nicht eindeutig beantwortet werden.

Voraussetzung hierfür wäre ein eindeutiger Nachweis zur Induktion von oxidativem Stress bzw. reaktiver Sauerstoffspezies durch Lasiocarpin.

In den dazu durchgeführten Experimenten zeigte sich Lasiocarpin sehr heterogen. Auf der einen Seite war im Tetramethylrhodamine-Ethyl-Ester – Assay eine deutliche Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials im Vergleich zur Kontrolle für die Behandlung mit Lasiocarpin sichtbar. Auf der anderen Seite zeigte der Dihydroethidium–Assay keine Induktion der Superoxidproduktion, sodass die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies innerhalb der ersten 8 h der Metabolisierung von Lasiocarpin sehr unwahrscheinlich ist.

Die Reduktion der Genotoxizität von Lasiocarpin in der Kombination mit Delphinidin beruht daher vermutlich nicht auf antioxidativen Mechanismen, vielmehr könnte möglicherweise eine Inhibition von CYP-Enzymen eine Rolle spielen. Wie bereits erwähnt sind für die Metabolisierung der PA hauptsächlich Unterfamilien der CYP3A und CYP2B verantwortlich (Ruan, Yang et al. 2014). Eine Inhibition der CYP3A4 durch Anthocyanine und deren Umsetzungsprodukte wurde bereits nachgewiesen. Delphinidin zeigte in einer Konzentration von 46,5 μM eine Inhibition der CYP3A4 um 50 %. Phenolsäuren, Umsetzungsprodukte von Delphinidin, führten im Vergleich zwar zu einer deutlich schwächeren Inhibition, jedoch reichen hier die Konzentrationen von 7,842–472,3 μM (Dreiseitel, Schreier et al. 2008) und sind daher mit der hier verwendeten Delphinidinkonzentration (3,2 μM) vergleichbar. In einer weiteren Studie wurde die Enzymaktivität der CYP2A6, CYP3A4, CYP2B6 sowie CYP2C9 in primären humanen Hepatozyten und humanen Leber-Mikrosomen gemessen. Delphinidin reduzierte die Aktivität für drei der vier CYP-Enzyme (alle außer CYP2C9), wobei für CYP3A4 durch Delphinidin (100 μM) mit einer Verringerung auf 9 % der Ausgangsaktivität, der stärkste Effekt beobachtet wurde. Passend dazu sind weder die Expression noch die Proteinmenge der CYP3A4 bzw. der CYP2B6 durch Inkubation mit Delphinidin gestiegen (Srovnalova, Svecarova et al. 2014).

Die starke Hemmung der CYP3A4 durch Delphinidin ist ein wichtiger Aspekt, da die Metabolisierung von Lasiocarpin vor allem durch CYP3A4 und CYP3A5

katalysiert wird. Dies zeigt eine Auswertung von insgesamt zehn verschiedenen CYP-Enzymaktivitäten (Ruan, Yang et al. 2014). Daher kann eine Hemmung der CYP3A4 Aktivität, aber auch anderer CYP-Enzyme durch Delphinidin bzw. seine Umsetzungsprodukte zu einer verringerten Metabolisierung von Lasiocarpin führen. Infolgedessen entsteht vermutlich eine geringere Menge an toxischen Pyrrolestern, wodurch DNA-Schäden und somit die Anzahl an mikrokernhaltigen Zellen reduziert wird.

Das Ergebnis dieses Mikrokerntests macht deutlich, dass in Zukunft vermehrt die Wechselwirkung der PA mit anderen Substanzen untersucht werden müssen. Dabei sollten sowohl möglicherweise schützende Pflanzenstoffe, wie Antioxidantien, aber auch Kombinationen mehrerer PA in den Fokus gerückt werden. Nur dadurch kann es gelingen, das gesundheitsgefährdende Potential der PA im Kontext ihres natürlichen Vorkommens in Pflanzen bzw. Nahrungsmitteln umfassend zu beurteilen.

5 Zusammenfassung

Pyrrrolizidinalkaloide (PA) sind sekundäre Pflanzenstoffe, welche über Nahrungsmittel in den menschlichen Organismus gelangen können. Zahlreiche Studien belegen, dass PA in der Leber verstoffwechselt und dabei in aktive genotoxische Metabolite umgewandelt werden. Diese verursachen vor allem in der Leber zelluläre Schäden, was sich klinisch in Form einer hepatischen venösen okklusiven Leberkrankheit, aber auch in der Entstehung von Tumoren zeigt.

Die vorliegende Arbeit testet das genotoxische Potential der drei PA Lasiocarpin, Senecionin und Seneciphyllin anhand der Leberzelllinie Huh6 mit Hilfe des Mikrokerntests. Außerdem wird erstmalig eine Messung der Enzymaktivität der CYP1A in den Huh6 Zellen durchgeführt. Darüber hinaus wird die Wirkung von Lasiocarpin auf den intrazellulären Glutathion-Gehalt, die Superoxidproduktion und das mitochondriale Membranpotential analysiert. Zudem werden sowohl der eventuell negative Einfluss einer Glutathion-Depletion, als auch die möglicherweise schützenden Effekte des pflanzlichen Antioxidans Delphinidin in Bezug auf die Genotoxizität von Lasiocarpin untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass alle drei ausgewählten PA einen signifikanten Anstieg der Mikrokernelnfrequenz bewirken. In den Mikrokerntests zeigte sich Lasiocarpin deutlich potenter als Senecionin bzw. Seneciphyllin. Eine Enzymaktivität der CYP1A konnte in den Huh6 Zellen nachgewiesen werden.

Kontrovers wird eine möglicherweise schützende Adduktbildung der PA mit Glutathion sowie der Einfluss von oxidativem Stress in der Entstehung der genotoxischen Schäden in der Fachliteratur diskutiert. Unsere Messungen zeigten für Lasiocarpin eine dezente Reduktion des Glutathion-Gehalts. Dagegen führte eine Glutathion-Depletion in den Huh6 Zellen zu keiner Steigerung der Genotoxizität von Lasiocarpin. Obwohl kein Anstieg der Superoxidproduktion durch Lasiocarpin nachgewiesen werden konnte, zeigte sich durch Lasiocarpin eine deutliche Änderung des mitochondrialen Membranpotentials, welche als Störung der Mitochondrienfunktion interpretiert

wird. Insgesamt spielt oxidativer Stress im Mechanismus der Genotoxizität der PA vermutlich eine untergeordnete Rolle.

In Kombination mit dem Antioxidans Delphinidin zeigte sich für Lasiocarpin eine signifikante Reduktion der Mikrokernfrequenz. Aufgrund der fehlenden Superoxidbildung durch Lasiocarpin, lässt sich dieser Effekt jedoch nicht mit den antioxidativen Eigenschaften des Delphinidin erklären. Vielmehr liefert eine Hemmung der CYP-Enzyme durch Delphinidin eine wahrscheinlichere Erklärung für diesen Effekt.

Abschließend ist anzumerken, dass in Zukunft vor allem die Wechselwirkung der PA untereinander und mit anderen (Pflanzen-)bestandteilen für eine verbesserte Risikoabschätzung der PA-Exposition untersucht werden sollte.

6 Summary

Pyrrrolizidine alkaloids (PA) are secondary plant metabolites that can enter the human organism via food. Numerous studies showed that PA are metabolized in the liver and converted into active genotoxic metabolites. This causes cellular damage, particularly in the liver, which is clinically manifested in the "veno-occlusive-disease". It can also induce the development of tumors.

This dissertation investigates the genotoxic potential of the three PA lasiocarpine, senecionine and seneciphylline in the liver cell line Huh6 using the micronucleus test. For the first time, a measurement of the enzyme activity of CYP1A in the Huh6 cells is performed. Furthermore, the effect of lasiocarpine on intracellular glutathione content, superoxide production and mitochondrial membrane potential are analyzed. In addition, the possible negative influence of glutathione depletion as well as the possible protective effects of the plant antioxidant delphinidin on the genotoxicity of lasiocarpine are investigated.

It could be shown that all three selected PA cause a significant increase of the micronucleus frequency, with lasiocarpine being more potent than senecionine or seneciphylline. An enzyme activity of CYP1A could be shown in the Huh6 cells.

A possible protective adduct formation of the PA with glutathione as well as the influence of oxidative stress in the development of genotoxic damage is controversially discussed in the literature. Our measurements showed a small reduction of the glutathione content by treatment with lasiocarpine. In contrast, glutathione depletion in Huh6 cells did not lead to an increase in genotoxicity of lasiocarpine. Although no increase in superoxide production by lasiocarpine treatment could be detected, lasiocarpine induced a significant change in mitochondrial membrane potential, which is interpreted as a disturbance of mitochondrial function. Overall, oxidative stress seems to play a minor role in the mechanism of genotoxicity of PA.

In combination with the antioxidant delphinidin, micronucleus induction by lasiocarpine was reduced. However, due to the lack of superoxide formation by lasiocarpine treatment, this effect cannot be explained by the antioxidant

properties of delphinidin. Rather, an inhibition of the CYP-enzymes by delphinidin provides a likely explanation for this effect.

In conclusion, it should be noted, that in the future, the interaction of different PA with each other, but also with other (plant-)components, should be investigated for an improved risk assessment of PA exposure.

Literaturverzeichnis

Allemang, A., C. Mahony, C. Lester und S. Pfuhler (2018). "Relative potency of fifteen pyrrolizidine alkaloids to induce DNA damage as measured by micronucleus induction in HepaRG human liver cells." Food and Chemical Toxicology 121: S. 72-81.

Anke, S., D. Niemüller, S. Moll, R. Hänsch und D. Ober (2004). "Polyphyletic origin of pyrrolizidine alkaloids within the Asteraceae. Evidence from differential tissue expression of homospermidine synthase." Plant physiology 136(4): S. 4037-4047.

Anthérieu, S., C. Chesné, R. Li, S. Camus, A. Lahoz, L. Picazo, M. Turpeinen, A. Tolonen, J. Uusitalo, C. Guguen-Guillouzo und A. Guillouzo (2010). "Stable Expression, Activity, and Inducibility of Cytochromes P450 in Differentiated HepaRG Cells." Drug Metabolism and Disposition 38(3): S. 516-525.

Azevedo, L., P. L. Alves de Lima, J. C. Gomes, P. C. Stringheta, D. A. Ribeiro und D. M. F. Salvadori (2007). "Differential response related to genotoxicity between eggplant (*Solanum melanogena*) skin aqueous extract and its main purified anthocyanin (delphinidin) in vivo." Food and Chemical Toxicology 45(5): S. 852-858.

Bankoglu, E. E., J. Broscheit, T. Arnaudov, N. Roewer und H. Stopper (2018). "Protective effects of tricetinidin against oxidative stress inducers in rat kidney cells: A comparison with delphinidin and standard antioxidants." Food and Chemical Toxicology 121: S. 549-557.

BfR. (2007). "Salatmischung mit pyrrolizidinhaltigem Geiskraut verunreinigt." Bundesamt für Risikobewertung
https://www.bfr.bund.de/cm/343/salatmischung_mit_pyrrolizidinalkaloid_haltige_m_geiskraut_verunreinigt.pdf (Zugriff am 30.07.2019).

BfR. (2013). "Analytik und Toxizität von Pyrrolizidinalkaloiden sowie eine Einschätzung des gesundheitlichen Risikos durch deren Vorkommen in Honig" <https://www.bfr.bund.de/cm/343/analytik-und-toxizitaet-von-pyrrolizidinalkaloiden.pdf> (Zugriff am 07.08.2019).

BfR. (2013). "Pyrrolizidinalkaloide in Kräutertees und Tees." <https://www.bfr.bund.de/cm/343/pyrrolizidinalkaloide-in-kraeutertees-und-tees.pdf> (Zugriff am 07.08.2019).

BfR. (2016). "Pyrrolizidinalkaloide: Gehalte in Lebensmitteln sollen nach wie vor so weit wie möglich gesenkt werden." <https://mobil.bfr.bund.de/cm/343/pyrrolizidinalkaloide-gehalte-in-lebensmitteln-sollen-nach-wie-vor-so-weit-wie-moeglich-gesenkt-werden.pdf> (Zugriff am 07.08.2019).

- BfR. (2019). "Pyrrolizidinalkaloidgehalt in getrockneten und tiefgefrorenen Gewürzen und Kräutern zu hoch."
<https://www.bfr.bund.de/cm/343/pyrrolizidinalkaloidgehalt-in-getrockneten-und-tiefgefrorenen-gewuerzen-und-kraeutern-zu-hoch.pdf> (Zugriff am 07.08.2019).
- Birecka, H., M. Birecki und M. W. Frohlich (1987). "Evidence for arginine as the endogenous precursor of necines in heliotropium." Plant Physiology 84(1): S. 42-46.
- Borstel, K. V., L. Witte und T. Hartmann (1989). "Pyrrolizidine alkaloid patterns in populations of *Senecio vulgaris*, *S. vernalis* and their hybrids." Phytochemistry 28(6): S. 1635-1638.
- Chen, L., P. P. J. Mulder, J. Louisse, A. Peijnenburg, S. Wesseling und I. Rietjens (2017). "Risk assessment for pyrrolizidine alkaloids detected in (herbal) teas and plant food supplements." Regulatory Toxicology Pharmacology 86: S. 292-302.
- Chen, T., N. Mei und P. P. Fu (2010). "Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids." Journal of Applied Toxicology 30(3): S. 183-196.
- Chen, Y., H. Dong, D. C. Thompson, H. G. Shertzer, D. W. Nebert und V. Vasiliou (2013). "Glutathione defense mechanism in liver injury: Insights from animal models." Food and Chemical Toxicology 60: S. 38-44.
- Cortinovis, C. und F. Caloni (2015). "Alkaloid-Containing Plants Poisonous to Cattle and Horses in Europe." Toxins 7(12): S. 5301-5307.
- Crowley, L. C., M. E. Christensen und N. J. Waterhouse (2016). "Measuring Mitochondrial Transmembrane Potential by TMRE Staining." Cold Spring Harbor Protocols 2016(12): S. 1092-1096.
- Culvenor, C. C., J. A. Edgar, L. W. Smith, C. R. Kumana und H. J. Lin (1986). "Heliotropium lasiocarpum Fisch and Mey identified as cause of veno-occlusive disease due to a herbal tea." Lancet 1(8487): S. 978.
- Culvenor, C. C. J., J. A. Edgar, M. V. Jago, A. Outteridge, J. E. Peterson und L. W. Smith (1976). "Hepato- and pneumotoxicity of pyrrolizidine alkaloids and derivatives in relation to molecular structure." Chemico-Biological Interactions 12(3): S. 299-324.
- Datta, D. V., M. S. Khuroo, A. R. Mattocks, B. K. Aikat und P. N. Chhuttani (1978). "Herbal medicines and veno-occlusive disease in India." Postgraduate medical journal 54(634): S. 511-515.
- Doi, I. (1976). "Establishment of a cell line and its clonal sublines from a patient with hepatoblastoma." Gann 67(1): S. 1-10.

Dreiseitel, A., P. Schreier, A. Oehme, S. Locher, G. Hajak und P. G. Sand (2008). "Anthocyanins and their metabolites are weak inhibitors of cytochrome P450 3A4." Molecular Nutrition & Food Research 52(12): S. 1428-1433.

Ebmeyer, J., A. Braeuning, H. Glatt, A. These, S. Hessel-Pras und A. Lampen (2019). "Human CYP3A4-mediated toxification of the pyrrolizidine alkaloid lasiocarpine." Food and Chemical Toxicology 130: S. 79-88.

Edgar, J. A., S. M. Colegate, M. Boppré und R. J. Molyneux (2011). "Pyrrolizidine alkaloids in food: a spectrum of potential health consequences." Food Additives & Contaminants: Part A 28(3): S. 308-324.

EFSA (2011). "Scientific Opinion on Pyrrolizidine alkaloids in food and feed." EFSA Journal 9(11): S. 1-134.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), H. K. Knutsen, J. Alexander, L. Barregård, M. Bignami, B. Brüschweiler, S. Ceccatelli, B. Cottrill, M. Dinovi, L. Edler, B. Grasl-Kraupp, C. Hogstrand, L. Hoogenboom, C. S. Nebbia, I. P. Oswald, A. Petersen, M. Rose, A.-C. Roudot, T. Schwerdtle, C. Vleminckx, G. Vollmer, H. Wallace, J. A. Ruiz Gomes und M. Binaglia (2017). "Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements." EFSA Journal 15(7): S. 1-34.

Eghbaliferiz, S. und M. Iranshahi (2016). "Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals." Phytotherapy Research 30(9): S. 1379-1391.

essen&trinken. (2015). "Frankfurter grüne Soße." <https://www.essen-und-trinken.de/rezepte/60780-rzpt-frankfurter-gruene-sauce> (Zugriff am 19.06.2020).

Fenech, M. (2007). "Cytokinesis-block micronucleus cytome assay." Nature Protocols 2(5): S. 1084-1104.

Forester, S. C., Y. Y. Choy, A. L. Waterhouse und P. I. Oteiza (2014). "The anthocyanin metabolites gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals." Molecular Carcinogenesis 53(6): S. 432-439.

Fu, P. P., Q. Xia, G. Lin und M. W. Chou (2004). "Pyrrolizidine alkaloids - genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms." Drug Metabolism Reviews 36(1): S. 1-55.

Fukumoto, L. R. und G. Mazza (2000). "Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds." Journal of Agricultural and Food Chemistry 48(8): S. 3597-3604.

Garbett, N. C., N. B. Hammond und D. E. Graves (2004). "Influence of the amino substituents in the interaction of ethidium bromide with DNA." Biophysical Journal 87(6): S. 3974-3981.

Glaser, N. und H. Stopper (2012). "Patulin: Mechanism of genotoxicity." Food and Chemical Toxicology 50(5): S. 1796-1801.

Goldstein, I., N. Rivlin, O.-y. Shoshana, O. Ezra, S. Madar, N. Goldfinger und V. Rotter (2012). "Chemotherapeutic agents induce the expression and activity of their clearing enzyme CYP3A4 by activating p53." Carcinogenesis 34(1): S. 190-198.

Green, C. E., J. H. Segall und J. L. Byard (1981). "Metabolism, cytotoxicity, and genotoxicity of the pyrrolizidine alkaloid senecionine in primary cultures of rat hepatocytes." Toxicology and Applied Pharmacology 60(2): S. 176-185.

Griffith, O. W. und A. Meister (1979). "Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine)." Journal of Biological Chemistry 254(16): S. 7558-7560.

Habs, H., M. Habs, H. Marquardt, E. Roder, D. Schmahl und H. Wiedenfeld (1982). "Carcinogenic and mutagenic activity of an alkaloidal extract of *Senecio nemorensis* ssp. *fuchsii*." Arzneimittelforschung 32(2): S. 144-148.

Hanif, S., U. Shamim, M. F. Ullah, A. S. Azmi, S. H. Bhat und S. M. Hadi (2008). "The anthocyanidin delphinidin mobilizes endogenous copper ions from human lymphocytes leading to oxidative degradation of cellular DNA." Toxicology 249(1): S. 19-25.

Hartmann, T., A. Ehmke, U. Eilert, K. von Borstel und C. Theuring (1989). "Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid N-oxides in *Senecio vulgaris* L." Planta 177(1): S. 98-107.

Hartmann, T. und L. Witte (1995). Chapter four - Chemistry, Biology and Chemoecology of the Pyrrolizidine Alkaloids. Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. S. W. Pelletier, Pergamon. 9: S. 155-233.

Hégarat, L. L., A. Mourot, S. Huet, L. Vasseur, S. Camus, C. Chesné und V. Fessard (2014). "Performance of Comet and Micronucleus Assays in Metabolic Competent HepaRG Cells to Predict In Vivo Genotoxicity." Toxicological Sciences 138(2): S. 300-309.

Hincks, J. R., H. Y. Kim, H. J. Segall, R. J. Molyneux, F. R. Stermitz und R. A. Coulombe, Jr. (1991). "DNA cross-linking in mammalian cells by pyrrolizidine alkaloids: structure-activity relationships." Toxicology and Applied Pharmacology 111(1): S. 90-98.

- Hosomi, H., T. Fukami, A. Iwamura, M. Nakajima und T. Yokoi (2011). "Development of a highly sensitive cytotoxicity assay system for CYP3A4-mediated metabolic activation." Drug Metabolism and Disposition 39(8): S. 1388-1395.
- Huxtable, R. J. (1989). Human health implications of pyrrolizidine alkaloids and herbs containing them. Toxicants of Plant Origin, Alkaloids. Peter R. Cheeke. 1: S. 41-64.
- IARC (1976). Some Naturally Occurring Substances. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of chemicals to man. WHO. Lyon. 10.
- Kempf, M. (2009). Entwicklung und Anwendung von Methoden zur Erfassung von Pyrrolizidinalkaloiden in Honig und Pollen (Dissertation).
- Kempf, M., S. Heil, I. Hasslauer, L. Schmidt, K. von der Ohe, C. Theuring, A. Reinhard, P. Schreier und T. Beuerle (2010). "Pyrrolizidine alkaloids in pollen and pollen products." Molecular Nutrition and Food Research 54(2): S. 292-300.
- Kennedy, S. W., S. P. Jones und L. J. Bastien (1995). "Efficient Analysis of Cytochrome P4501A Catalytic Activity, Porphyrins, and Total Proteins in Chicken Embryo Hepatocyte Cultures with a Fluorescence Plate Reader." Analytical Biochemistry 226(2): S. 362-370.
- Khandelwal, N. und S. K. Abraham (2014). "Protective effects of common anthocyanidins against genotoxic damage induced by chemotherapeutic drugs in mice." Planta Medica 80(15): S. 1278-1283.
- Khynriam, D. und S. B. Prasad (2003). "Cisplatin-induced genotoxic effects and endogenous glutathione levels in mice bearing ascites Dalton's lymphoma." Mutation Research 526(1-2): S. 9-18.
- Kretzschmar, M. (1996). "Regulation of hepatic glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity." Experimental and Toxicologic Pathology 48(5): S. 439-446.
- Laconi, E., D. S. R. Sarma und P. Pani (1995). "Transplantation of normal hepatocytes modulates the development of chronic liver lesions induced by a pyrrolizidine alkaloid, lasiocarpinett." Carcinogenesis 16(1): S. 139-142.
- Laurindo, F. R., D. C. Fernandes und C. X. Santos (2008). "Assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity by HPLC analysis of dihydroethidium oxidation products." Methods in Enzymology 441: S. 237-260.
- Lin, G., Y. Y. Cui und E. M. Hawes (2000). "Characterization of rat liver microsomal metabolites of clivorine, an hepatotoxic otonecine-type pyrrolizidine alkaloid." Drug Metabolism and Disposition 28(12): S. 1475-1483.

Linseisen, J., J. Radtke und G. Wolfram (1997). "Flavonoid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey." Zeitschrift für Ernährungswissenschaft 36(4): S. 403-412.

Löffler, G. und P. Petrides (2014). Mitochondrien - Organellen der ATP-Gewinnung. Biochemie und Pathobiochemie. P. C. Heinrich, M. Müller and L. Graeve. Heidelberg, Springer. 19: S. 235-251.

Lorge, E., V. Thybaud, M. J. Aardema, J. Oliver, A. Wakata, G. Lorenzon und D. Marzin (2006). "SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test I. General conditions and overall conclusions of the study." Mutation Research 607(1): S. 13-36.

Louisse, J., D. Rijkers, G. Stoopen, W. J. Holleboom, M. Delagrangé, E. Molthof, P. P. J. Mulder, R. L. A. P. Hoogenboom, M. Audebert und A. A. C. M. Peijnenburg (2019). "Determination of genotoxic potencies of pyrrolizidine alkaloids in HepaRG cells using the γ H2AX assay." Food and Chemical Toxicology 131: S. 110532.

Lu, S. C. (2013). "Glutathione synthesis." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) 1830(5): S. 3143-3153.

Ma, C., Y. Liu, L. Zhu, H. Ji, X. Song, H. Guo und T. Yi (2018). "Determination and regulation of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in food: A critical review of recent research." Food and Chemical Toxicology 119: S. 50-60.

Ma, Q. und A. Y. H. Lu (2007). "CYP1A Induction and Human Risk Assessment: An Evolving Tale of in Vitro and in Vivo Studies." Drug Metabolism and Disposition 35(7): S. 1009-1016.

Mattocks, A. R. (1968). "Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids." Nature 217(5130): S. 723-728.

Mattocks, A. R., H. E. Driver, R. H. Barbour und D. J. Robins (1986). "Metabolism and toxicity of synthetic analogues of macrocyclic diester pyrrolizidine alkaloids." Chemico-Biological Interactions 58(1): S. 95-108.

Misik, M., A. Nersesyan, C. Bolognesi, M. Kundi, F. Ferk und S. Knasmueller (2019). "Cytome micronucleus assays with a metabolically competent human derived liver cell line (Huh6): A promising approach for routine testing of chemicals?" Environmental and Molecular Mutagenesis 60(2): S. 134-144.

Molyneux, R. J., D. L. Gardner, S. M. Colegate und J. A. Edgar (2011). "Pyrrolizidine alkaloid toxicity in livestock: a paradigm for human poisoning?" Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 28(3): S. 293-307.

Molyneux, R. J., A. E. Johnson, J. D. Olsen und D. C. Baker (1991). "Toxicity of pyrrolizidine alkaloids from Riddell groundsel (*Senecio riddellii*) to cattle." American Journal of Veterinary Research 52(1): S. 146-151.

Moreira, R., D. M. Pereira, P. Valentão und P. B. Andrade (2018). "Pyrrolizidine Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Toxicology and Food Safety." International journal of molecular sciences 19(6): S. 1668.

Nowacki, E. und R. U. Byerrum (1962). "A study on the biosynthesis of the Crotalaria alkaloids." Life Sciences 1(5): S. 157-161.

Ober, D. und T. Hartmann (1999). "Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(26): S. 14777-14782.

Ober, D. und E. Kaltenecker (2009). "Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolution of a pathway in plant secondary metabolism." Phytochemistry 70(15): S. 1687-1695.

Plummer, J. L., B. R. Smith, H. Sies und J. R. Bend (1981). "Chemical depletion of glutathione in vivo." Methods in Enzymology 77: S. 50-59.

Pojer, E., F. Mattivi, D. Johnson und C. S. Stockley (2013). "The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 12(5): S. 483-508.

Pospisil, P., A. Prasad und M. Rac (2019). "Mechanism of the Formation of Electronically Excited Species by Oxidative Metabolic Processes: Role of Reactive Oxygen Species." Biomolecules 9(7): S. 1-20.

Prakash, A. S., T. N. Pereira, P. E. B. Reilly und A. A. Seawright (1999). "Pyrrolizidine alkaloids in human diet." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 443(1): S. 53-67.

Roeder, E. (1995). "Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids." Pharmazie 50(2): S. 83-98.

Ruan, J., M. Yang, P. Fu, Y. Ye und G. Lin (2014). "Metabolic activation of pyrrolizidine alkaloids: insights into the structural and enzymatic basis." Chemical Research in Toxicology 27(6): S. 1030-1039.

Rubiolo, P., L. Pieters, M. Calomme, C. Bicchi, A. Vlietinck und D. Vanden Berghe (1992). "Mutagenicity of pyrrolizidine alkaloids in the Salmonella typhimurium/mammalian microsome system." Mutation Research 281(2): S. 143-147.

Sakakibara, H., T. Ogawa, A. Koyanagi, S. Kobayashi, T. Goda, S. Kumazawa, H. Kobayashi und K. Shimoi (2009). "Distribution and excretion of bilberry anthocyanins [corrected] in mice." Journal of Agricultural and Food Chemistry 57(17): S. 7681-7686.

Schramm, S., N. Kohler und W. Rozhon (2019). "Pyrrolizidine Alkaloids: Biosynthesis, Biological Activities and Occurrence in Crop Plants." Molecules 24(3): S. 1-44.

Srovnalova, A., M. Svecarova, M. K. Zapletalova, P. Anzenbacher, P. Bachleda, E. Anzenbacherova und Z. Dvorak (2014). "Effects of anthocyanidins and anthocyanins on the expression and catalytic activities of CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, and CYP3A4 in primary human hepatocytes and human liver microsomes." Journal of Agricultural and Food Chemistry 62(3): S. 789-797.

Stopper, H. und S. O. Muller (1997). "Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview." Toxicology in Vitro 11(5): S. 661-667.

Sugatani, J., M. Osabe, M. Kurosawa, N. Kitamura, A. Ikari und M. Miwa (2010). "Induction of UGT1A1 and CYP2B6 by an antimutagenic factor in HepG2 cells is mediated through suppression of cyclin-dependent kinase 2 activity: cell cycle-dependent expression." Drug Metabolism and Disposition 38(1): S. 177-186.

Tamariz, J., E. Burgueno-Tapia, M. A. Vazquez und F. Delgado (2018). Pyrrolizidine Alkaloids. The Alkaloids: Chemistry and Biology. H.-J. Knölker, Elsevier. 80: S. 1-314.

Waldherr, M., M. Misik, F. Ferk, J. Tomc, B. Zegura, M. Filipic, W. Mikulits, S. Mai, O. Haas, W. W. Huber, E. Haslinger und S. Knasmüller (2018). "Use of HuH6 and other human-derived hepatoma lines for the detection of genotoxins: a new hope for laboratory animals?" Archives of Toxicology 92(2): S. 921-934.

Wang, L.-S. und G. D. Stoner (2008). "Anthocyanins and their role in cancer prevention." Cancer Letters 269(2): S. 281-290.

WHO. (1988). "Environmental Health Criteria 80, Pyrrolizidin Alkaloids." International Programm of Chemical Safety. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc080.htm#SubSectionNumber:6.4.8> (Zugriff am 04.05.2019).

Xia, Q., L. Ma, X. He, L. Cai und P. P. Fu (2015). "7-glutathione pyrrole adduct: a potential DNA reactive metabolite of pyrrolizidine alkaloids." Chemical Research in Toxicology 28(4): S. 615-620.

Xia, Q., Y. Zhao, L. S. Von Tungeln, D. R. Doerge, G. Lin, L. Cai und P. P. Fu (2013). "Pyrrolizidine Alkaloid-Derived DNA Adducts as a Common Biological

Biomarker of Pyrrolizidine Alkaloid-Induced Tumorigenicity." Chemical Research in Toxicology 26(9): S. 1384-1396.

Yan, C. C. und R. J. Huxtable (1996). "Effects of monocrotaline, a pyrrolizidine alkaloid, on glutathione metabolism in the rat." Biochemical Pharmacology 51(3): S. 375-379.



Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation *In vitro Untersuchung zur Genotoxizität ausgewählter Pyrrolizidinalkaloide* eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper für die Möglichkeit bedanken, eine Dissertation am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie anzufertigen. Mit herausragender fachlicher Beratung und den zahlreichen wertvollen wissenschaftlichen Ratschläge hat sie maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auch bedanke ich mich für ihre Unterstützung, mir mit einem Besuch der GUM 2019 (Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung) die Beteiligung an einem internationalen Kongress ermöglicht zu haben und dadurch den aktuellsten Stand der Forschung mitverfolgen zu können.

Für die Übernahme und Erstellung des Zweitgutachtens und ihren fachlichen Rat bedanke ich mich ebenso herzlich bei Frau Professor Dr. Leane Lehmann. Ebenso herzlicher Dank gebührt Herrn Professor Dr. rer. nat. Samuel Samnick für sein Engagement in meinem Prüfungskomitee.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Eylül Bankoglu für die hervorragende Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit. Auch bedanke ich mich für ihre Zuverlässigkeit, für ihre Zeit und Geduld, sich selbst an Wochenend- und Feiertagen für ihre Doktoranden einzusetzen.

Der gesamten Arbeitsgruppe des Instituts für Toxikologie gilt mein Dank für die Unterstützung während der praktischen Arbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern, meinen beiden Schwestern und nicht zuletzt bei meinem Freund Daniel bedanken: Für eure unermüdliche Geduld, den Optimismus und die liebevolle Unterstützung - nicht nur während der Promotionszeit. Vielen Dank, dass ihr mich auf meinem Weg bis hierher auf vielfältige Weise mit wissenschaftlichen und menschlichen Ratschlägen unterstützt habt.