





Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Martin J. Lohse

# **Arsen-induzierte Zyto- und Genotoxizität sowie deren Modulation**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
medizinischen Fakultät der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Dr. med. René Jonas  
aus Dittelbrunn

Würzburg, Mai 2008

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper  
Koreferent: Prof. Dr. med. Martin Eigenthaler  
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.08.2008

Der Promovend ist Zahnarzt

<b>1. Gentoxikologie</b>	<b>1</b>
1.1. Allgemeines	1
1.2. Mutagenität als Teil toxischer Wirkungen	1
1.3. Funktionsverlust von Enzymen zum Nachweis mutagener Testsubstanzen	2
1.4. Mikroskopische Analyse von chromosomalen Aberrationen	3
1.5. Krebsentstehung	4
<b>2. Kenntnisstand</b>	<b>6</b>
2.1. Arsen	6
2.1.1. Allgemeines	6
2.1.2. Toxikologie von Arsen	8
2.1.3. Zytotoxizität von Arsen	8
2.1.4. Gentoxizität von Arsen	9
2.1.4.1. Mutagenität	9
2.1.4.2. Direkte und indirekte Gentoxizität	10
2.1.4.3. Störung der Zytogenetik	11
2.1.5. Metabolismus von Arsen	12
2.2. Testsubstanzen zur Modulation der Arseneffekte	14
2.2.1. Oxidativer Stress	14
2.2.1.1. 4-Nitrochinolin-1-Oxid (NQO)	16
2.2.1.2. Benfotiamin	17
2.2.1.3. N-Acetyl-L-Cystein (NAC)	18
2.2.1.4. $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E)	19
2.2.2. DNA-Methylierung	20
2.2.2.1. 5-Azacytidin	21
2.2.2.2. S-Adenosyl-L-Methionin (SAM)	22
2.2.2.3. Folsäure (Folat)	23
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>24</b>
3.1. Laborchemikalien und Arbeitsgeräte	24
3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	24
3.1.2. Arbeitsgeräte	24
3.2. Puffer und Lösungen	25
3.3. Zellkultur	32
3.3.1. Verwendete Zelllinie	32
3.3.2. Kulturmedium	32
3.3.3. Kultivierung der Zellen	33
3.3.3.1. Auftauen	33
3.3.3.2. Passagieren der Stammkultur	33
3.4. Testsubstanzen	34
3.5. Verfahren und Methoden	35
3.5.1. Allgemeines	35
3.5.2. Proliferationsexperiment	35
3.5.3. Durchflusszytometrie	36
3.5.3.1. Prinzip	36
3.5.3.2. Apoptosemessung	39
3.5.3.3. Semiquantitative Bestimmung von oxidativem Stress	41
3.5.3.4. Bestimmung des DNA-Methylierungsstatus	42
3.5.4. Mikroskopie	44
3.5.4.1. Allgemeines	44

## Inhaltsverzeichnis

---

3.5.4.2. Mitosen und C-Mitosen	45
3.5.4.3. Apoptosen	47
3.5.5. In-vitro-Mikrokernstest	48
3.5.6. Einzelzell-Gelelektrophorese	49
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>52</b>
4.1. Allgemeines	52
<b>4.2. Gentoxizität von Natrium-Arsenit (NaAsO<sub>2</sub>)</b>	<b>52</b>
4.2.1. Modellsubstanz Methylmethansulfonat	52
4.2.2. NaAsO <sub>2</sub>	56
<b>4.3. Modulatoren</b>	<b>70</b>
4.3.1. Allgemeines	70
4.3.2. Oxidativer Stress	71
4.3.2.1. 4-Nitrochinolin-1-Oxid (NQO)	71
4.3.2.2. Benfotiamin	74
4.3.2.3. N-Acetylcystein (NAC)	80
4.3.2.4. α-Tocopherol (Vitamin E)	84
4.3.3. DNA-Methylierung	87
4.3.3.1. 5-Azacytidin	87
4.3.3.2. S-Adenosylmethionin (SAM)	91
4.3.3.3. Folat	94
<b>5. Diskussion</b>	<b>98</b>
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>109</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>111</b>

# 1. Gentoxikologie

## 1.1. Allgemeines

Stoffe, die durch ihre toxische Wirkung auf das genetische Material von Zellen zu Veränderungen in der Erbinformation führen, werden als gentoxische Substanzen bezeichnet. Sie erhöhen die Fehlerrate bei der Reduplikation des Genoms und bewirken Mutationen durch Schäden an der DNA. Erfolgen diese in den Keimzellen, werden sie an die Nachkommen weitergegeben und führen zu Geburts- oder Erbschäden. Sind Körperzellen betroffen, können Zelltod, erhöhtes Krankheitsrisiko oder sogar Krebs die Folge sein. Von den Behörden werden prinzipiell mehrere unterschiedliche Tests zur Prüfung auf die Gentoxizität bzw. Mutagenität einer neuen Substanz gefordert. Damit Genmutationen und Chromosomenaberrationen rechtzeitig erkannt werden können, kommen sowohl Bakterien als auch Säugetierzellen zum Einsatz.

## 1.2. Mutagenität als Teil toxischer Wirkungen

Zu den wichtigen Mutations-auslösenden Mechanismen gehören der Austausch von Basen in der DNA (**Punktmutation**), der Verlust von einem oder mehreren Basenpaaren (**Deletion**), die Verlagerung eines Gens an eine andere Stelle des Genoms (**Translokation**) sowie die identische Vervielfachung von DNA-Abschnitten (**Amplifikation**). Typische Mutagene enthalten meist elektrophile Substrukturen, wirken auf die Enzyme des DNA-Metabolismus, hemmen den Spindelapparat oder erzeugen reaktive Komponenten, wie z.B. oxidative Radikale. Zu den Mutagenen gehören auch UV-Licht und ionisierende Strahlung. Die von Mutagenen verursachten Schäden in der DNA können mit Hilfe verschiedener DNA-Reparaturmechanismen wieder beseitigt werden. Reicht deren Kapazität jedoch nicht aus, führen beispielsweise die durch die UV-Strahlung im Sonnenlicht verursachten DNA-Schäden zu einem erhöhten Risiko, an Hautkrebs zu erkranken. Da gentoxische Wirkungen auch Zellreaktionen umfassen, die als Folge der DNA-Veränderung auftreten können, werden mutagene Effekte als deren Untergruppe betrachtet. Bei der Kernteilung von Körperzellen erfolgt in der Mitose die Verteilung der verdoppelten Chromatiden, wobei jede Tochterzelle einen vollständigen

Chromosomensatz erhält. Alle strukturellen Veränderungen, die mit Gewinn, Verlust oder Umlagerung von Chromosomenabschnitten einhergehen, werden zu den Chromosomenmutationen gerechnet. **Chromosomenaberrationen** umfassen sowohl die mikroskopisch erkennbaren Veränderungen der Chromosomenstruktur in mitotischen Zellen (strukturelle Aberrationen) als auch Veränderungen der Chromosomenzahl einer Zelle (numerische Aberrationen).

### ***1.3. Funktionsverlust von Enzymen zum Nachweis mutagener Testsubstanzen***

Die Mutagenität einer Testsubstanz lässt sich in Genmutationstests durch den Erwerb veränderter Zelleigenschaften nachweisen. Meist geschieht dies durch den Nachweis des Verlusts einer Enzymfunktion, der nach der Behandlung der Zellen auftritt und an die Nachfolgezellen weitergegeben wird. Die Identifizierung und Quantifizierung der meist wenigen Mutanten innerhalb einer größeren Anzahl von nichtmutierten Zellen erfolgt durch **Selektion** der funktionell veränderten Zellen. Diese beruht üblicherweise auf einer durch die Mutation hervorgerufenen **Resistenz** gegenüber toxischen Substanzen, die zum Absterben der nicht mutierten Zellen führt, während die widerstandsfähigen Mutanten überleben, sich vermehren und Kolonien bilden. Als Genmutationstest in Säugetierzellen kommt häufig der sogenannte **ML/TK-Test** zur Anwendung. Zur Selektion wird in diesem Test die Resistenz von **Mauslymphomzellen (ML)** gegenüber dem toxischen Thymidinanalogon Trifluorthymidin (ein Substrat für die **Thymidinkinase (TK)**) benutzt. Nach Behandlung der Zellen mit der Testsubstanz werden diese zunächst für eine bestimmte Zeit in normalem Wachstumsmedium weiter kultiviert. Anschließend werden sie für mehrere Tage in ein Medium mit dem Selektionsmittel überführt, bevor dann schließlich die Auszählung der gewachsenen Mutantenkolonien erfolgt. Zur Ermittlung der **zytotoxischen Wirkung** der Testsubstanz wird parallel auch die Überlebensrate der Zellen im Medium ohne Selektionsmittel bestimmt. Alternativ kann auch das **HRPT-Gen** zum Nachweis von Genmutationen herangezogen werden. Mutanten werden hierbei am Verlust der Aktivität des Enzyms **Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT)** erkannt. Dieses wandelt freie Purinbasen in die entsprechenden Nukleosidphosphate um und macht sie dadurch für die Synthese von Nukleinsäuren verfügbar. Die Selektion der



Mutanten beruht auf der in den mutierten und den unveränderten Zellen unterschiedlich ausgeprägten Toxizität der synthetischen Purinbase 6-Thioguanin (TG). TG wird in Zellen mit funktionsfähigem HPRT in derart toxische Nukleotide umgewandelt, dass sie absterben. Der Verlust der HPRT-Aktivität hingegen führt zur Resistenz gegenüber TG. Für den HPRT-Genmutationstest werden meist Hamster-Zelllinien (V79, CHO) verwendet. Zum Nachweis von **Genmutationen** in **Bakterien** stehen Testsysteme zur Verfügung, mit denen sowohl Vorwärts- als auch Rückmutationen erkannt werden können. Erstere führen zum Verlust bestimmter Gene, letztere gewinnen als Folge einer vorangegangenen Mutation verlorene Genfunktionen zurück (Reversion). Das wichtigste dieser Prüfsysteme ist der nach seinem Entdecker Bruce N. Ames als **Ames-Test** bezeichnete **Salmonella (S.)-Mutagenitätstest**. Bei diesem wird die Reversion zur Histidin-Unabhängigkeit in bestimmten Stämmen von *S. typhimurium* abgelesen. Die Bakterien haben aufgrund von Mutationen in Genen, die für die Bildung von Enzymen der Biosynthese die Aminosäure Histidin (his) kodieren, die Fähigkeit zum Wachstum auf Histidin-freiem Agar verloren. Die verschiedenen Veränderungen der DNA-Basensequenzen sind in den einzelnen Teststämmen genau definiert. Durch mutagene Reagenzien werden im Genom der his<sup>-</sup>-Zellen Rückmutationen induziert, wodurch sie ihre Fähigkeit zur Histidinsynthese zurückerlangen. Die nun nicht mehr auf den Zusatz dieser Aminosäure angewiesenen Bakterienzellen können im Gegensatz zu den unveränderten Zellen im Histidin-freien Nährmedium wachsen und Kolonien bilden. Die Höhe der Kolonienzahl in Abhängigkeit von der zugesetzten Stoffmenge bildet ein Maß für die Mutagenität einer Substanz.

#### ***1.4. Mikroskopische Analyse von chromosomalen Aberrationen***

Substanzen, die entweder direkt oder über die Störung bestimmter Zellzyklusprozesse Doppelstrangbrüche in der DNA hervorrufen, können Chromosomenaberrationen verursachen. Diese lassen sich in Zellen nachweisen, die sich in der Metaphase der Mitose befinden, da die Chromosomen in diesem Stadium in kompakter Form vorliegen und daher gut in ihrer Struktur untersucht werden können. Häufig werden für solche Tests CHO-Zellen verwendet, da die Hamsterzellen nur 22 Chromosomen mit zudem charakteristischer Struktur aufweisen. **Chromosomale Aberrationstests** werden routinemäßig auch mit humanen Lymphozyten durchgeführt (**HCA-Test**). Dazu werden die Lymphozyten-

Zellkulturen mit der Testsubstanz behandelt, anschließend fixiert und für die mikroskopische Auswertung angefärbt. Mit Hilfe des *In-vitro*-**Mikrokerntests** (Micronucleus-Test, **MNT *in vitro***) lassen sich sowohl Substanzen erkennen, die Chromosomenbrüche verursachen, als auch Spindelgifte, die den Spindelapparat stören und dadurch zu einer Fehlverteilung der Chromosomen in der Mitose führen. Mikrokerne sind chromatinhaltige, von einer Membran umgebene Körperchen, die zusätzlich zum normalen Kern in einer Zelle vorkommen können. Sie bestehen aus Chromosomenfragmenten oder ganzen Chromosomen, die bei der Zellteilung nicht in einen der Kerne der Tochterzellen integriert wurden, und sind im Vergleich zum Hauptkern wesentlich kleiner. Sie können sehr einfach unter dem Mikroskop ausgezählt werden. Zur Untersuchung der Mutagenität *in vivo* wird derzeit der Mikrokerntest am Knochenmark von Labornagern am häufigsten verwendet. Polychromatische (junge) **Erythrozyten** eignen sich deshalb besonders gut zur Auswertung von Mikrokernen, weil bei ihrer Entstehung aus den Erythroblasten der Hauptkern ausgestoßen wird. Mikrokerne sind daher auffällig und eindeutig erkennbar. Den meisten in Routine-Tests verwendeten Zelllinien oder Bakterien fehlen bestimmte Fremdstoff-metabolisierende Enzyme. Daher wird den Testsystemen ein **Extrakt aus Rattenlebern** hinzugefügt. In dieser Fraktion, aus der größere Zellfragmente, Kerne und Mitochondrien entfernt wurden, befinden sich Stoffwechsellzyme wie Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen, welche die *in-vivo*-Stoffwechselprozesse simulieren sollen. Mutagenitätstests können an somatischen (Körper-) oder an Keimzellen durchgeführt werden. Mutierte somatische Zellen zeigen eine kanzerogene Wirkung der Testsubstanz schneller an, da ihre Zellstrukturen weniger gut geschützt sind als die von Keimzellen. Für den Nachweis von Genmutationen *in vivo* werden zunehmend transgene Tiermodelle eingesetzt.

## **1.5. Krebsentstehung**

Die Entstehung von Krebs kann durch Faktoren wie die genetische Veranlagung, Umwelteinflüsse, Lebensgewohnheiten, energiereiche Strahlung oder chemische Substanzen ausgelöst werden. Während die Zellzahl im Entwicklungsstadium des Körpers ständig zunimmt, bleibt sie beim Erwachsenen weitgehend konstant. Eine Neubildung von Gewebe erfolgt nur unter zeitlich und räumlich begrenzten Bedingungen, beispielsweise bei der Wundheilung oder bei der physiologischen Anpassung an bestimmte Umweltbedingungen. Im Gegensatz zu normalen Zellen

erreichen **Krebszellen** nicht den Endzustand der **Differenzierung**. Sie vermehren sich unkontrolliert und unabhängig von körpereigenen Regelmechanismen. Entscheidend für die Ausbildung eines Tumors ist das gestörte Verhältnis von Neubildung durch Zellteilung zu Verlust durch kontrollierten Zelltod (Apoptose). Die **chemische Kanzerogenese** wird als Prozess verstanden, bei dem es durch Einwirkung von chemischen Krebsrisikofaktoren zur unkontrollierten und ungeordneten Neubildung von Geweben (**Neoplasie**) kommt. Krebs entsteht in einem meist lang andauernden Prozess infolge von Störungen der Wachstumsregulation in Körperzellen. Krebserzeugende Chemikalien können durch Mutationen über mehrere Stufen in bestimmten Genen eine Umwandlung normaler Zellen zu Krebszellen auslösen oder beschleunigen. Die **Initiation** umfasst die Wechselwirkung des Kanzerogens, das nicht zwingend mutagen sein muss, mit der DNA sowie die Entstehung mutierter Zellen. Vermehren sich diese, entstehen zunächst gutartige **Tumore**, die meist maligne werden und später Metastasen bilden. Zwischen der Einwirkung der Kanzerogene und dem Auftreten von Tumoren liegt eine **Latenzzeit**, die im Tierexperiment Monate, beim Menschen Jahre bis Jahrzehnte dauern kann. Als ein Faktor für die Krebsentstehung kommen zum Beispiel Jahre früher entstandene chromosomale Aberrationen oder DNA-Strangbrüche in Frage. Diese wiederum können durch oxidativen Stress oder epigenetische Veränderungen der DNA verursacht worden sein. In der vorliegenden Arbeit wird Natrium-Arsenit ( $\text{NaAsO}_2$ ) im Hinblick auf sein genotoxisches Potential genauer untersucht, und verschiedene Modulatoren der Wege, auf denen  $\text{NaAsO}_2$  möglicherweise seine adversen Effekte ausübt, vorgestellt.

## 2. Kenntnisstand

### 2.1. Arsen

#### 2.1.1. Allgemeines

Arsen wurde als eine der ersten Substanzen als Karzinogen eingestuft. Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts wurde die Inhalation von Arsen als Ursache für Lungentumoren bei Bergarbeitern (Neubauer 1947) sowie die orale Aufnahme, wie sie früher in Form pharmazeutischer Präparate häufig war, als Ursache für Hauttumoren vermutet (Hutchinson 1887; Hutchinson 1888). Obwohl diese frühen Erkenntnisse heute vielfach in Form epidemiologischer Studien bestätigt sind (Cancer 1980), bleiben auch heute noch viele Fragen bezüglich Wirkmechanismus und ätiologischer Beteiligung von Arsen bei einer Vielzahl weiterer Erkrankungen zu klären (Tomatis, Aitio et al. 1989; Rossman 2003). Hier ist das klinische Spektrum weit und reicht von Tumorerkrankungen weiterer innerer Organe, wie Harnblase, Niere, Leber und Gastrointestinaltrakt (GIT), bis hin zur toxischen Schädigung der Nieren (primär renale Elimination mit Schädigung des proximalen Tubulusepithels) und des hämatopoietischen- (Anämie), Immun- (Leukopenie), Nerven- und Kardiovaskulären-Systems (Abernathy, Liu et al. 1999; Cheng, Li et al. 2004; Reichard, Schnekenburger et al. 2007). Diskutiert wird auch ein Zusammenhang mit Diabetes mellitus, Hörverlust, Verhaltensstörungen sowie Leber- und Lungenfibrose (Tchounwou, Wilson et al. 1999; Sordo, Herrera et al. 2001). Deshalb gilt heute die chronische Exposition gegenüber anorganischen Arsen-Verbindungen (möglich sowohl gegenüber der reduzierten Form Arsenit als auch der oxidierten Form Arsenat) und ihrer methylierten Derivate als eines der großen weltweiten Probleme, das Millionen von Menschen betrifft (Council 1999; Council 2001).

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die Anwendung Arsen-haltiger Pharmazeutika, die in der Humanmedizin eine über 2500-jährige Geschichte hat und zeitweise geradezu zügellos gegen eine Vielzahl von Erkrankungen eingesetzt wurde, drastisch eingeschränkt (Jackson and Grainge 1975). Das am weitesten verbreitete Präparat war die „Fowler’sche Lösung“ (enthält 1 % Kalium-Arsenit), die insbesondere bei Haut- (z.B. Psoriasis) und allergischen Erkrankungen angewandt wurde. Bis zur Entwicklung der Antibiotika wurde Arsen auch zur Bekämpfung von Infektionserkrankungen, insbesondere bei der Syphilis, eingesetzt. Heute ist es

lediglich bei der Therapie einiger seltener Tropenkrankheiten indiziert (Lüllmann 1999). Seine medizinische Renaissance erlebt Arsen ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) derzeit als Chemotherapeutikum in der Tumorbehandlung, insbesondere der Promyelozytenleukämie (Anderson, Boise et al. 2002; Bachleitner-Hofmann, Kees et al. 2002; Miller, Schipper et al. 2002).

In der Landwirtschaft und speziell beim Weinbau kam es in der Vergangenheit zu hohen Belastungen durch Arsen-haltige Insektizide, Pestizide und Herbizide. Gefahr drohte hierbei auch beim Genuss des damals verbreiteten „Haustrunks“, eines wässrigen Weinersatzprodukts, das aus der Weintraubenhaut gewonnen wurde und bis zu 90 mg/l Arsen trioxid enthielt (Roth 1956; Luchtrath 1983). Der Einsatz von Arsen in der Landwirtschaft wurde in Deutschland bereits 1942 verboten. Unter den Nahrungsmitteln weisen Meeresfrüchte die höchste Arsen-Belastung auf.

Arsen-Salze werden auch heute in vielen Industriezweigen, wie zum Beispiel der Textil- (Färbereien), Glas-, Papier- und Metallindustrie, verwendet und finden sich geradezu ubiquitär in einer Vielzahl von Produkten (z.B. Holzschutz-Lasuren, Elektronik-Teilen und als Pigmente in Farben).

Im Bergbau kommt es nach wie vor zu hoher inhalativer Belastung und zu regional besonders starker Belastung des Trinkwassers (Hinwood, Sim et al. 2004). Arsen liegt bei Förderung aus großen Tiefen und anaeroben Bedingungen im Trinkwasser als Arsenit ( $\text{As(III)}$ ) und bei aeroben Bedingungen als Arsenat ( $\text{As(V)}$ ) vor (Cancer 1980; Tinwell, Stephens et al. 1991). In den USA liegt der bereits 1942 festgelegte Grenzwert für die Arsenbelastung im Trinkwassers auch heute noch unverändert bei 50  $\mu\text{g/l}$  (Larson 1989). Die tatsächliche Belastung liegt in manchen Regionen oft deutlich höher (Corporation 1987; Marcus 1988) und erreicht Werte bis 298  $\mu\text{g/l}$ . Zumindest bedenklich ist, dass in zahlreichen Studien bereits ab einer Trinkwasser-Konzentration von 8  $\mu\text{g/l}$  eine Arsen-bedingte Mortalitätserhöhung der Bevölkerung durch Krebserkrankungen detektiert werden konnte (Tseng, Chu et al. 1968; Borgono, Vicent et al. 1977; Cebrian, Albores et al. 1983; Chen, Chen et al. 1992; Morales, Ryan et al. 2000; Haque, Mazumder et al. 2003; Peplow and Edmonds 2004).

Aufgrund seiner Geschmacks- und Geruchslosigkeit sowie undeutlicher klinischer Symptomatik war Arsen bis zur Entwicklung des „Marsh“-Tests (1838) ein beliebtes Mordgift. Intoxikationserscheinungen treten bei Dosen größer 65 mg auf (Lüllmann 1999), möglich entweder als Einzeldosis (kapillarlähmende Wirkung mit starker

Symptomatik durch Multi-Organversagen bis hin zum Tod durch Kreislaufschock oder Atemlähmung) oder in Form wiederholter kleiner Dosen (z.B. chronische Schleimhautentzündung von Mund, Nase, Auge und GIT; Melanose; Hyperkeratose). Die chronische Exposition gegenüber geringen Dosen äußert sich klinisch oft unspezifisch, beispielsweise durch Müdigkeit, Konzentrationsschwäche, Unruhe, Übelkeit oder Diarrhoe. Die LD<sub>50</sub> variiert beim Menschen zwischen 0,6 und 3 mg/kg Körpergewicht. Die akute Wirkung soll auf der allosterischen Inhibition der Lipothiamid-Pyrophosphatase beruhen.

### **2.1.2. Toxikologie von Arsen**

Die World Health Organisation (WHO) klassifiziert anorganisches Arsen als Karzinogen der Klasse A. Es gilt als Paradoxon, dass es trotz intensiver Studien auch heute nur sehr schwer gelingt, die Befunde aus der Humanmedizin für die isolierte Wirkung von anorganischem Arsen am Tiermodell zu reproduzieren (Milner 1969; Luster, Wilmer et al. 1995; Germolec, Spalding et al. 1997). Derzeit ist die Suche nach geeigneten Testsystemen und die Aufklärung der exakten Wirkmechanismen der Arsentoxikologie Gegenstand intensiver Forschung und vieler Debatten (Huang, Ke et al. 2004). Obwohl bereits Arseneffekte auf über 200 Enzyme bekannt sind, besteht bis zum Verständnis der einer Zellschädigung jeweils zugrunde liegenden zytotoxischen und genotoxischen Mechanismen noch viel Forschungsbedarf (Abernathy, Liu et al. 1999).

### **2.1.3. Zytotoxizität von Arsen**

Zytotoxische Effekte durch Arsen basieren auf einer direkten Bindung der Metallverbindung an zelluläre Moleküle, der Induktion von Konformationsänderungen und der Verdrängung physiologischer Metalle aus ihrer Bindungsstelle (Qian, Castranova et al. 2003). Weiterhin scheinen Redoxreaktionen katalysiert zu werden, welche zur Formation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen. ROS sind in der Lage, eine Vielzahl zellulärer Makromoleküle wie Enzyme oder DNA zu schädigen. Bei entsprechender und irreversibler Schädigung folgt Apoptose-Induktion oder Zellnekrose. Geringere Schädigung zeigt sich gewöhnlich in verändertem Zellwachstum und reduzierter Proliferation (Qian, Castranova et al. 2003; Jing, Yi et al. 2004).

Es besteht auch die Möglichkeit zur Aktivierung von Proteinen, welche die Apoptose regulieren und somit zur direkten Einleitung des Vorganges (Namgung and Xia

2001). Cai et al. (Cai, Yu et al. 2003) beschreiben eine enge Verknüpfung zwischen Arsen-induzierter Apoptose und mitotischem Arrest.

Im Rahmen der zellulären Reaktion auf die zytotoxische Schädigung durch Arsen kommt es auf molekularer Ebene zu typischen Veränderungen in der Genexpression bestimmter Proteine. Meist kommt es in der betroffenen Zelle zu einer Erhöhung von Heat-Shock-Proteinen (HSP) und anti-oxidativer-Stress-Proteinen und zu einer Erniedrigung von Stoffwechsellenzymen (Lau, He et al. 2004). Auch extrazelluläre Proteine werden verändert (Iwama, Nakajo et al. 2001).

Das zytotoxische Potential von Arsen führt über eine intrazelluläre Störung der Kalzium- und Stickoxid- (NO)-Homöostase zur Produktion von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und anderen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie zu einer Aktivierung mitochondrialer apoptotischer Signalproteine (Shen, Shen et al. 2002; Paschen 2003). Diese Signalproteine werden in das Zytosol freigegeben, wo sie mit Hilfe des zellulären ATP die apoptotische Kaskade vollenden (Babcock, Herrington et al. 1997). Des Weiteren kommt es zu einer Senkung des intrazellulären pH-Wertes (Übersäuerung) und zu einer Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials. In der frühen Phase der Apoptose führen diese Veränderungen zu einer Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und zu einer Aktivierung von Caspasen.

## **2.1.4. Gentoxizität von Arsen**

### **2.1.4.1. Mutagenität**

Bei Tests an Bakterien wie auch an verschiedenen Säuger-Zelllinien (keine Humanzellen) zur Detektion von Einzelgenmutationen konnte bisher – von wenigen Ausnahmen abgesehen – für Arsen keine mutagene Potenz festgestellt werden (Ficsor; Piccolo 1972; Rossman, Stone et al. 1980; Jongen, Cardinaals et al. 1985; Kharab and Singh 1985; Hei, Liu et al. 1998). Des Weiteren scheint es nicht ursächlich an der Entstehung von Punktmutationen beteiligt zu sein (Lee, Oshimura et al. 1985; Mitchell and Stohrer 1986; Li and Rossman 1991; Moore, Harrington-Brock et al. 1997) und ist negativ im Ames-Test (Anderson, Leighty et al. 1972; Shelby 1988). Bei *Drosophila melanogaster* wurde sogar eine Arsen-abhängige Reduktion der MMS-induzierten Mutationsfrequenz beobachtet (somatic eye-colour test system) (Rasmuson 1985).

Arsenit ( $As^{5+}$ ) kann jedoch bei nicht toxischer Konzentration als Co-Mutagen die Gentoxizität (V79 Zellen; Mutation am HPRT-Gen) von UVA, UVB und UVC-

Strahlung verstärken (Li and Rossman 1991). Dieser Zusammenhang gilt am Menschen bei der Genese von Hauttumoren als gesichert (Rossman, Uddin et al. 2004). Für Arsenat ( $\text{As}^{3+}$ ) zeigte sich diesbezüglich kein co-mutagener Effekt (Rossman 1981).

Bei Verwendung humaner Zelllinien (Fibroblasten, GM637) zeigt Arsenit ein dosisabhängiges mutagenes Potential (supF und HPRT). Der Mechanismus konnte auf Induktion von Basendeletion, Large Scale Rearrangement, Frameshift und Basenpaarsubstitution zurückgeführt werden. Dieser Effekt wies auch den bereits beschriebenen Synergismus mit UV-Bestrahlung auf (Wiencke, Yager et al. 1997).

#### **2.1.4.2. Direkte und indirekte Gentoxizität**

Arsen und seine Metaboliten führen in einer Vielzahl von Testsystemen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu einer Schädigung der DNA. Die indirekte Gentoxizität als Hemmung von DNA-Reparaturprozessen nimmt eine zentrale Rolle in der metallinduzierten Kanzerogenese ein und liefert gleichzeitig eine Erklärung für die hohe Diskrepanz zwischen schwacher Mutagenität (bei isolierter Arsenexposition) und hoher Kanzerogenität. Eine Störung im Reparaturmechanismus permanent und physiologisch auftretender endogener (z.B. durch Sauerstoffmetabolismus) als auch Umweltmutagen-bedingter DNA-Schädigung führt über verstärktes Auftreten von Mutationen zu einem erhöhten Krebsrisiko. Indirekt gentoxische Effekte werden dabei bereits bei sehr niedrigen und deshalb biologisch relevanten Konzentrationen gefunden, während direkt gentoxische Effekte nur in sehr geringem Umfang (Abernathy, Liu et al. 1999) und in der Regel erst bei weitaus höheren Konzentrationen detektiert werden, die meist bereits zytotoxisch sind (Schwerdtle 2004).

Der genaue Mechanismus der Inhibition von Reparaturvorgängen ist noch unbekannt (Basu, Mahata et al. 2001), aber es konnte gezeigt werden, dass vor allem so genannte Zinkfingerstrukturen in DNA-Reparaturproteinen, wie zum Beispiel die für die an der Basenexzisionsreparatur von oxidativen DNA-Schäden durch ROS beteiligte Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), mögliche Angriffspunkte für Arsenverbindungen sind (Hartwig and Schwerdtle 2002; Schwerdtle, Walter et al. 2003; Schwerdtle 2004; Schwerdtle 2004; Walter, Schwerdtle et al. 2007). Daneben konnte eine Hemmung der Nukleotidexzisionsreparatur gefunden werden, welche für



die Reparatur helixverzerrender BPDE-DNA-Addukte verantwortlich ist (Schwerdtle, Walter et al. 2003).

Die physiologische DNA-Methylierung der Base Cytosin zu 5-Methylcytosin dient der Genregulation sowie der Steuerung der Transkription im menschlichen Genom und ist von entscheidender Bedeutung bei der Embryogenese und bei Entwicklungsvorgängen (Reik and Walter 2001; Attwood, Yung et al. 2002; Morgan, Santos et al. 2005). Eine Arsen-bedingte Störung dieses Methylierungsvorganges könnte die Ursache für eine Serie genetischer und epigenetischer Veränderungen sein, welche beispielsweise über Protoonkogen-Aktivierung (z.B. c-myc) die Grundlage zur Kanzerogenese bilden (Laird 2005). Für die direkte Genotoxizität von Arsen spielt nach gegenwärtigem Kenntnisstand vor allem die Induktion oxidativer DNA-Schäden durch Bildung von ROS eine entscheidende Rolle (Qian, Castranova et al. 2003). Diese führen entweder über Aktivierung der Transkription (z.B. Aktivator-Protein 1 (AP-1)) und Veränderung der Genexpression zur Tumorentwicklung oder über klastogene Effekte zu Apoptose und Zelltod (Jing, Yi et al. 2004). Klastogene Schädigung der DNA, also die Frakturierung des DNA-Stranges, wird besonders bei Behandlung der Kulturzellen mit hohen Dosen an Arsen beobachtet. Typischerweise entstehen hier Mikrokerne, welche Kinetochor-negativ, also Chromosomenfragmente ohne Zentromer, sind. In der Folge kann es zur Deletion wichtiger Erbinformation kommen. Zentrische Fragmente kommen ebenfalls vor, sind aber deutlich seltener (Kochhar, Howard et al. 1996; Moore, Harrington-Brock et al. 1997; Yih and Lee 1999). Im Gegensatz dazu treten bei Behandlung der Zellkulturen mit niedrigen Dosen an Arsen vorwiegend Kinetochor-positive Mikrokerne (ganze, verlagerte Chromosomen mit Zentromer; siehe Punkt 2.1.2.2.3) auf, was hiermit auf einen aneugenen Mechanismus der Schädigung hinweist (Vega, Gonsebatt et al. 1995; Ramirez, Eastmond et al. 1997; Huang and Lee 1998; Sciandrello, Barbaro et al. 2002). Die chromosomale Struktur wird durch Arsen geschädigt; in der Folge kann ein breites Spektrum an Chromosomenaberrationen in humanen Fibroblasten beobachtet werden (Gurr, Lin et al. 1993; Huang, Ho et al. 1995; Kochhar, Howard et al. 1996).

#### **2.1.4.3. Störung der Zytogenetik**

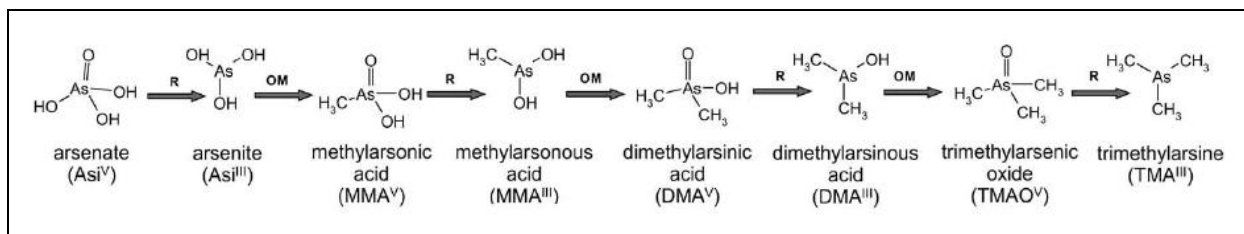
Wie bereits oben angesprochen induziert Arsen Aneuploidie, und es kommt zur Bildung Kinetochor-positiver Mikrokerne.

Arsen induziert eine Aktivierung oder Inaktivierung von Proteinen der zellulären Signaltransduktion zwischen Zelläußerem und Zellkern, was Einfluss auf die Genexpression nehmen kann (Qian, Castranova et al. 2003; Jing, Yi et al. 2004).

In Krebszellen soll der mitotische Arrest ein gängiger Mechanismus zur Einleitung der gezielten Apoptose sein (Huang, Huang et al. 2000; Cai, Yu et al. 2003; Liu, Hilsenbeck et al. 2003; Yih, Hsueh et al. 2005). Dieser komplexe und zelltypspezifische Mechanismus involviert Caspasen und benötigt eine gezielte Steuerung (siehe Abb.2.1. und 2.2.) der Genexpression (Miller, Schipper et al. 2002; Cai, Yu et al. 2003).

### 2.1.5. Metabolismus von Arsen

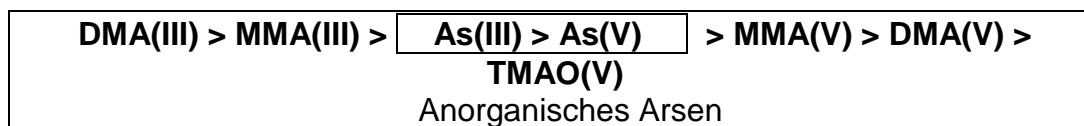
Die Mechanismen der Metabolisierung von anorganischen Arsenverbindungen weisen bei verschiedenen Säuger-Spezies oft erhebliche Unterschiede auf; Erkenntnisse aus Tiermodellen sind deshalb nur bedingt auf humane Fragestellungen übertragbar (Vahter 1994; Aposhian 1997; Healy, Casarez et al. 1998). Beim Menschen kommt es zunächst zu einer 2-Elektron-Reduktion von Arsenat ( $\text{As}^{5+}$ ) zu Arsenit ( $\text{As}^{3+}$ ). Der weitere Abbau hängt entscheidend von der interindividuell stark variierenden Aktivität der Methyltransferase ab, welche die Glutathion-abhängige Konjugation steuert (Vahter 1994; Morales, Ryan et al. 2000; Kitchin 2001; Sordo, Herrera et al. 2001). Dieser oxidoreduktive Abbau ist S-Adenosyl-L-Methionin- und Folat-abhängig und führt entsprechend der Abbildung 1 sequenziell zu den Metaboliten Monomethylarsonsäure (MMA(V)), monomethylarsoniger Säure (MMA(III)), Dimethylarsinsäure (DMA(V)), dimethylarsiniger Säure (DMA(III)), Trimethylarsinisches Oxid (TMAO(V)) und Trimethylarsin (TMA(III)) (Thompson 1993; Aposhian 1997; Chuang, Ian et al. 1997).



**Abb. 1:** Biomethylierung von anorganischem Arsen ( **R**=Reduktion, **OM**=oxidative Methylierung )  
© bei Dopp et al. (2004) mit Erlaubnis von Taylor & Francis Group, LLC.

Die langjährige Annahme, dass dieser Metabolismus (Biomethylierung) einer Detoxifikation des anorganischen Arsens gleichzusetzen ist (Vahter 1981; Vahter and Concha 2001), kann heute nicht mehr gehalten werden (Yamanaka, Hayashi et al. 1997). Die entstehenden drei- und fünfwertigen Arsenmetabolite zeigen in

verschiedenen Testsystemen teils erhebliches gentoxisches Potential und tragen deshalb im Organismus mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Kanzerogenität von Arsen bei (Basu, Mahata et al. 2001; Schwerdtle, Walter et al. 2003). Dabei weisen die dreiwertigen methylierten Arsenmetabolite eine deutlich höhere Membrangängigkeit auf als die fünfwertigen (Dopp, Hartmann et al. 2004). Dies könnte eine Erklärung dafür bieten, dass diese Substanzen (DMA(III) und MMA(III)) in vielen Testsystemen sogar ein höheres zyto- und gentoxisches Potential aufweisen als die anorganischen Arsenverbindungen (As(III) und As(V)) (Petrick, Ayala-Fierro et al. 2000; Styblo, Del Razo et al. 2000). Nach Dopp et al. lässt sich für Arsen und seine methylierten Metabolite folgende hierarchische Einteilung, entsprechend dem beobachteten zyto- und gentoxischem Potential, vornehmen (Abb. 2):



**Abb. 2:** Hierarchie der methylierten Arsen-Metaboliten

© bei Dopp et al. (2004) mit Erlaubnis von Taylor & Francis Group, LLC.

DMA(III) / MMA(III) zeigen beispielsweise bei Versuchen an menschlichen Zellen (HeLa S3 und A549) stärkere und MMA(V)/DMA(V) um ein Vielfaches weniger Zytotoxizität als Arsenit (Petrick, Ayala-Fierro et al. 2000; Styblo, Del Razo et al. 2000; Schwerdtle, Walter et al. 2003). Bei den dreiwertigen Metaboliten findet sich eine stärkere Inhibition von zellulären Enzymen (Thomas, Styblo et al. 2001) und eine höhere Induktion von DNA-Strangbrüchen in humanen Lymphozyten als bei Arsenit (Mass, Tennant et al. 2001). Dreiwertige Metabolite zeigen DNA-Strangbrüche (klastogener Effekt) sowohl in Zellkulturen als auch bei Versuchen an isolierter DNA, fünfwertige nur in Zellkulturen. Dies unterstützt die Thesen, dass man auch bei den verschiedenen Arsen-Metaboliten nicht von einem gemeinsamen Schädigungsmechanismus ausgehen und man des Weiteren auch für die Metabolite die Möglichkeit der indirekten Gentoxizität durch Reparaturhemmung oxidativer DNA-Schäden annehmen kann (Schwerdtle, Walter et al. 2003). Weiterhin wurde bisher als Effekt der dreiwertigen Metabolite unter anderem die Formation von apurinischen/apyrimidinischen Stellen, oxidative Schädigung des DNA-Strangs oder von Einzelbasen, DNA-Protein-Crosslinks, Chromosomenaberrationen und Aneuploidie beobachtet (Sordo, Herrera et al. 2001; Schwerdtle, Walter et al. 2003; Dopp, Hartmann et al. 2004).

## **2.2. Testsubstanzen zur Modulation der Arseneffekte**

### **2.2.1. Oxidativer Stress**

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie zum Beispiel  $H_2O_2$ , HOCl, Hydroxyl- und Superoxid-Radikale entstehen im Zuge der Atmungskette. Sie können an normalen zellulären Prozessen wie der Abwehr von Viren und Bakterien oder dem Ablauf von Signalwegen beteiligt sein, aber auch DNA, Proteine, Kohlehydrate und Lipide schädigen. Auslenkungen aus dem Gleichgewicht zugunsten der oxidativen Prozesse werden als oxidativer Stress bezeichnet. Zur Begrenzung dieser Schäden stehen dem Körper verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische Mechanismen zur Verfügung. Zu den enzymatischen Mechanismen zählen z.B. die Superoxiddismutase, die Catalase und das Glutathion-System. Als nicht-enzymatische Mechanismen sind das Abfangen der ROS durch endogene und exogene Substanzen wie die Vitamine A, C und E, Flavonoide oder Carotinoide zu nennen (Sies 1989).

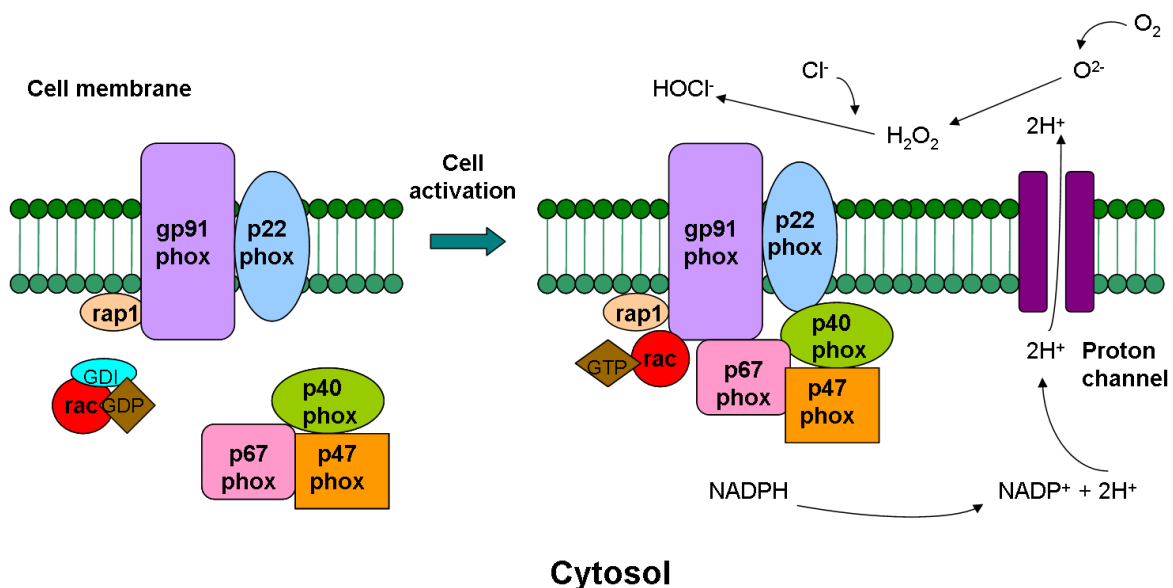
Der oxidative Stress ist für eine Reihe von Erkrankungen von Bedeutung wie zum Beispiel für neurodegenerative Prozesse, Atherosklerose, Diabetes mellitus und Krebs. ROS werden direkt mit der Bildung von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen und der Entstehung von DNA-Crosslinks in Zusammenhang gebracht. Als Folge kommt es zum Stopp oder zur Induktion der Transkription, zur Aktivierung von Signaltransduktionswegen und zur Verursachung von Replikationsfehlern und Genominstabilität (Valko, Rhodes et al. 2006).

Dies alles sind Vorgänge, die in der Karzinogenese beobachtet werden. Bis zu zehn verschiedene Mutationen müssen erfolgt sein, bevor es nach einer teils Jahrzehnte dauernden Latenzzeit zu einem nachweisbaren Tumor kommt. Dies deutet darauf hin, dass die Mutationen kontinuierlich während der Tumorentwicklung entstehen. Ein Mechanismus, der diese Mutationen hervorrufen könnte, ist die Schädigung der DNA durch ROS. Neuere Studien waren in der Lage, Zusammenhänge zwischen der Tumorgröße und der Menge des hauptsächlich durch oxidativen Stress entstehenden DNA-Addukts 8-oxo-dG (Li, Firozi et al. 2002) oder dem altersabhängigen Anstieg durch Hydroxylradikale hervorgerufener mutagener Läsionen und einer Prostatakrebs-Erkrankung herzustellen (Malins, Johnson et al. 2001). Dies legt nahe, dass oxidierte Nukleinsäuren an der Mutagenese und der Karzinogenese beteiligt sind.

Gebildet werden ROS hauptsächlich durch die NAD(P)H-Oxidase, einen Enzymkomplex, der die NAD(P)H-abhängige Reduktion von Sauerstoff in Superoxid katalysiert. Aufgrund des schnellen Ablaufs wird dieser Prozess als respiratory burst bezeichnet. Das entstandene Superoxid disproportioniert zu Wasserstoffperoxid, in Gegenwart von Eisen entsteht analog der Haber-Weiss-Reaktion das Hydroxylradikal.

Die NAD(P)H-Oxidase (Abb. 3) besteht aus vier zytosolischen (p20phox, p67phox, p40phox, Rac) und zwei membranständigen Untereinheiten (p47phox und gp91phox, die zusammen das Heterodimer Flavocytochrom  $b_{558}$  bilden). Die klassische NAD(P)H-Oxidase kommt in phagozytischen Zellen vor; mittlerweile weiß man aber, dass auch nicht-phagozytische Zellen dieses Enzym besitzen. Statt gp91phox selbst wurden dort Homologe identifiziert (nox1-nox5). Die NAD(P)H-Oxidase wird zwar konstitutiv exprimiert, in nicht aktivierten Zellen ruht sie jedoch.

Im Zuge der Phagozytose wird eine Reihe von Enzymen aktiviert, z. B. Tyrosinproteinkinase, Serinthreoninproteinkinase und Phospholipase C (PLC). Gleichzeitig wird die NAD(P)H-Oxidase aktiviert, indem p40phox, p47phox und p67phox - nach der Phosphorylierung von p47phox und der Bindung von Arachidonsäure, die von Phospholipiden freigesetzt wird, an p47phox - gemeinsam zur Membran wandern und sich dort mit p20phox und gp91phox zusammenschließen. Die Phosphorylierung von p47phox kann zum Beispiel durch die Proteinkinase C (PKC), mitogen-aktivierte Kinasen und p21Rac-aktivierte Kinasen stattfinden (Vignais 2002).



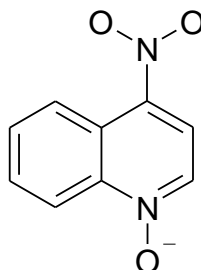
**Abb. 3:** Schematische Darstellung der NAD(P)H-Oxidase

© Modifiziert nach [www.medimmunol.com/content/5/1/4/figure/F1](http://www.medimmunol.com/content/5/1/4/figure/F1)

Im Folgenden sollen nun kurz die Substanzen vorgestellt werden, die als Modulatoren für NaAsO<sub>2</sub>-induzierten oxidativen Stress ausgewählt wurden.

### 2.2.1.1. 4-Nitrochinolin-1-Oxid (NQO)

Abb. 4

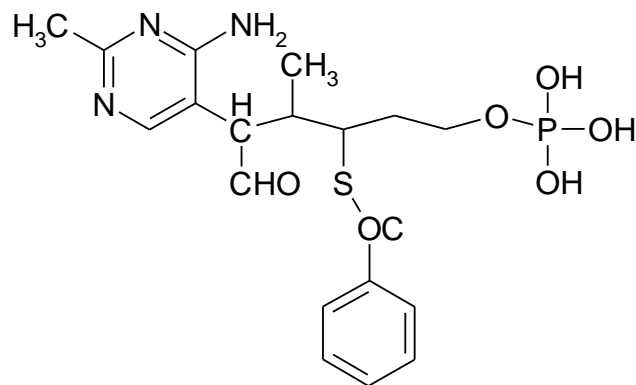


4-Nitrochinolin-1-Oxid (NQO) (Abb. 4) ist ein potentes synthetisches, wasserlösliches Mutagen und Karzinogen, das nach metabolischer Aktivierung, der enzymatischen Reduktion der Nitrogruppe (Benson 1993), an die DNA, besonders an Guaninbasen, bindet und dort Addukte bildet (Bailleul, Galiegue et al. 1981). Die Substanz, die einst als Chemotherapeutikum entwickelt wurde, wurde zuerst im Jahre 1957 als Induktor für Hautkrebs benutzt (Nakahara, Fukuoka et al. 1957).

NQO ist bekannt dafür, intrazellulären oxidativen Stress zu induzieren, indem es Superoxidradikale oder Wasserstoffperoxid freisetzt (Hozumi 1969). Außerdem kann NQO ein sogenanntes Redoxcycling durchlaufen, eine enzymatische 1-Elektronenreduktion gefolgt von einer Autoxidation in Anwesenheit molekularen Sauerstoffs (Kanojia and Vaidya 2006), und so reaktive Sauerstoffspezies freisetzen. NQO kommt nicht natürlicherweise vor. In verschiedenen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass NQO ein guter Induktor für orale Karzinome ist, die den humanen Karzinomen histologisch ähnlich sind, eingeschlossen die der dorsalen und ventralen Zunge, des Gaumens und des Ösophagus in Ratten (Wallenius and Lekholm 1973; Tang, Knudsen et al. 2004; Vered, Yarom et al. 2005). Deshalb wird NQO heute in der Krebsforschung sehr oft als Modellsubstanz benutzt. In dieser Studie wird NQO als Modell für die unspezifische Freisetzung von ROS herangezogen.

### 2.2.1.2. Benfotiamin

Abb. 5



Schon seit Jahrzehnten wurden neurologische Funktionsstörungen, insbesondere die diabetische Neuropathie, mit Thiamin (Vitamin B1) behandelt. Die orale Bioverfügbarkeit des wasserlöslichen Vitamins war allerdings im Vergleich zu fettlöslichen Analoga gering. Benfotiamin (Abb. 5), eins der 1954 von Fujiwara in der Familie der Alliaceae entdeckten fettlöslichen Thiamin-Derivate, wird durch passive Diffusion durch die intestinale Mucosa aufgenommen und schnell zum biologisch aktiven Thiamin umgewandelt. Die mit Benfotiamin erreichbaren Plasmaspiegel sind bis zu 5-mal höher als die nach oraler Applikation wasserlöslicher Thiamin-Salze gemessenen (Loew 1996).

Verschiedene Mechanismen werden als Ursache für die förderlichen Effekte von Benfotiamin diskutiert. Zum Beispiel ist es in der Lage, die Aktivität der Transketolase, eines wichtigen Enzyms des Glucose-Metabolismus, zu erhöhen. In der Folge werden drei der Hauptsignalwege, die zu hyperglycämischen Schäden führen, inhibiert: erstens wird die Aktivität des Hexosamin-Wegs angeregt, was wiederum die Anhäufung von Advanced Glycation Endproducts (AGEs) verringert; zweitens wird die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) normalisiert (Hammes, Du et al. 2003), und drittens werden Ungleichgewichte des Polyol-Signalwegs durch Verringerung der Aldose-Reduktase-Aktivität, der Sorbitol-Konzentrationen und der intrazellulären Glucose-Konzentrationen ausgeglichen (Berrone, Beltramo et al. 2006).

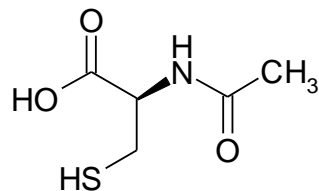
Des Weiteren wurde beobachtet, dass Benfotiamin Replikationsraten normalisiert (Pomero, Molinar Min et al. 2001) und Apoptose vermindert (Beltramo, Berrone et al. 2004) und dadurch Glucose-induzierten Endothelschaden verhindern kann. In Tierversuchen konnte bewiesen werden, dass diese Mechanismen für eine bessere

Heilung nach ischämischen Ereignissen verantwortlich sind (Gadau, Emanuelli et al. 2006). Bei Alkoholikern und Dialysepatienten kann Benfotiamin die Thiamin-Defizienz ausgleichen und die Inzidenz von Neuropathien vermindern (Mestyan, Jobst et al. 1986; Woelk, Lehl et al. 1998).

Klinische Indikationen für die Applikation von Benfotiamin sind heute hauptsächlich die diabetische Neuropathie, die alkoholische Neuropathie, die diabetische Retinopathie, die diabetische Nephropathie und das Nierenversagen im Endstadium (2006).

### 2.2.1.3. N-Acetyl-L-Cystein (NAC)

Abb. 6



N-Acetylcystein (NAC) (Abb. 6) ist ein Prodrug der Aminosäure Cystein, das eine hohe Bioverfügbarkeit und indirekte sowie direkte antioxidative Eigenschaften besitzt. Seine indirekten antioxidativen Eigenschaften werden hauptsächlich der Tatsache zugeschrieben, dass es die Speicher des endogenen Antioxidans Glutathion dadurch auffüllt, dass es dessen Bildung aus Cystein stimuliert (Atkuri, Mantovani et al. 2007). Das Tripeptid Glutathion seinerseits ist ein zentraler Faktor der Abwehr von endogenen und exogenen toxischen Substanzen wie zum Beispiel Nebenprodukten der Atmungskette oder Zigarettenrauch. Da die Produktion von Glutathion essentiell ist für die Aufrechterhaltung eines funktionierenden körpereigenen Abwehrsystems und diese wiederum vom ausreichenden Vorhandensein der Aminosäure Cystein abhängt, könnte die Gabe von NAC einen eventuell auftretenden Cystein-Mangel ausgleichen. Als direktes Antioxidans reagiert NAC mit reaktiven Sauerstoffspezies über die Zwischenstufe des NAC-Thiols zum NAC-Disulfid (Dekhuijzen 2004). Außerdem ist es in der Lage, Disulfid-Brücken zu reduzieren (Ziment 1988), freie Radikale zu reduzieren (Aruoma, Halliwell et al. 1989) und Metalle in Form von Komplexen zu binden (Koh, Simmons-Willis et al. 2002).

Bei oraler Einnahme wird NAC sehr schnell im Magen und im Darm aufgenommen und über die Pfortader zur Leber geschickt, wo es fast komplett zu Cystein umgewandelt wird (Cotgreave 1997). Die Leber wiederum baut das Cystein





Ein Vitamin E-Mangel entsteht als Folge von Malabsorption von Fetten, genetischen Defekten des Lipoprotein-Transports oder genetischen Defekten des hepatischen  $\alpha$ -Tocopherol-Transport-Proteins (Traber, Frei et al. 2008). Symptome für einen Mangel des essentiellen Vitamins sind neurologische Anomalien, die sich allerdings oft erst manifestieren, wenn sie bereits chronisch sind, und Infertilität.

Die Gabe von Vitamin E bei verschiedenen Krankheitsbildern wird kontrovers diskutiert. Die Wirksamkeit bei Indikationen wie Arteriosklerose, Krebs, Altern, Herzmuskelschäden, koronarer Herzkrankheit, klimakterischen Beschwerden, Sterilität, Potenzstörungen und Leistungsschwäche ist nicht oder nicht ausreichend belegt. Der Nutzen einer Zufuhr von Vitamin E als Antioxidans ist lediglich für die häufig auf die Sauerstoffbeatmung zurückzuführende Retinopathie (retrorenale Fibroplasie) bei Neugeborenen erwiesen (Aktorios 2006).

### **2.2.2. DNA-Methylierung**

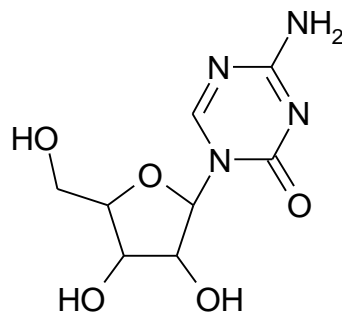
Bis heute ist der Goldstandard der Identifizierung von entarteten Zellen die mikroskopische Beurteilung des Pathologen. Hier werden zum Beispiel Veränderungen der Kernstruktur und -größe und veränderte Färbung des Chromatins festgestellt. Diese Veränderungen im Kern resultieren in einer veränderten Genexpression. Viele Gene kodieren für Proteine, die an zentralen Signalwegen beteiligt sind, die das homöostatische Zellwachstum kontrollieren. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Veränderungen die normalen Zellfunktionen stören (Gronbaek, Hother et al. 2007). Genetische sowie auch epigenetische Veränderungen der DNA liegen also der Unterbrechung von Signalwegen in der Zelle zugrunde. Hieraus resultieren Hochregulation von Onkogenen durch Chromosomen-Zugewinn, Gen-Amplifikation, Translokation und Punktmutation. Tumor-Suppressor-Gene hingegen können inaktiviert werden durch den Verlust ganzer Chromosomen, Deletionen und Punktmutationen. Klar ist, dass in entarteten Zellen das epigenetische sogenannte Silencing von Tumor-Suppressor-Genen, das durchaus als funktional äquivalent zu Mutationen und Deletionen angesehen werden kann, eine tragende Rolle bei der Entstehung maligner Tumoren spielt (Jones and Baylin 2002; Herman and Baylin 2003). In normalen Zellen hingegen werden die methylierten Stellen, die sogenannten CpG-Inseln, durch bisher noch unbekannte Mechanismen geschützt (Li, Bestor et al. 1992). Einerseits ist die DNA-Methylierung essentiell für die normale Zellentwicklung, den Hinzugewinn oder Verlust der

Funktion von Genen und die Unterdrückung parasitischer DNA-Sequenzen, andererseits bringt sie auch eine Zunahme des Mutationsrisikos mit sich (Rideout, Coetzee et al. 1990).

Im Zuge der derzeit hochaktuellen Studien, die auf dem Gebiet der Epigenetik und ihres Einflusses auf die DNA-Reparatur-Mechanismen (Chuang, Ian et al. 1997) und die genomische Instabilität (Chen, Pettersson et al. 1998) durchgeführt werden, soll auch in dieser Arbeit der Mechanismus mit Hilfe von NaAsO<sub>2</sub> als hypomethylierendem Agens und verschiedenen potenziellen Modulatoren genauer beleuchtet werden.

### 2.2.2.1. 5-Azacytidin

Abb. 8

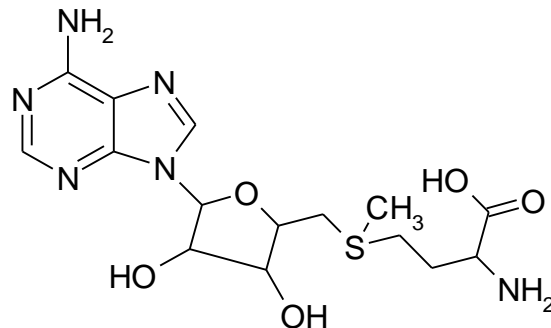


5-Azacytidin (Abb. 8), ein hypomethylierendes Pyrimidin-Nucleosid-Analogon, wurde um 1960 als Antitumor-Medikament entwickelt (Li, Olin et al. 1970). Es inhibiert die DNA-Methyltransferase, ein Enzym, das in Säugerzellen für die Methylierung neu synthetisierter DNA-Stränge zuständig ist, und führt dadurch zu hypomethylierten Strängen und Veränderungen der Gen-Transkription und -Expression (Christman, Mendelsohn et al. 1983). Außerdem wird 5-Azacytidin in die RNA inkorporiert und inhibiert so das Fortschreiten der Proteinbiosynthese (Glover and Leyland-Jones 1987). Der Arzneistoff besitzt dadurch zytotoxische, antimikrobielle, antineoplastische, abortive und mutagene Eigenschaften in verschiedenen biologischen Systemen (Von Hoff, Slavik et al. 1976). Heute wird er vor allem zur Therapie myelodysplastischer Syndrome (MDS) eingesetzt (Issa, Kantarjian et al. 2005), die eine heterogene Gruppe klonaler hämatopoietischer Funktionsstörungen sind. Sie sind charakterisiert durch eine ineffektive Hämatopoiese, die zu peripherer Cytopenie und schließlich zu akuter myeloider Leukämie führt (Jabbour and Giles 2005), sowie durch DNA-Hypermethylierung an sogenannten CpG-Inseln (Christiansen, Andersen et al. 2003). Der Methylierungsgrad an diesen CpG-Inseln

spielt eine große Rolle bei der Kontrolle der Gen-Transkription, da komplett methylierte Stellen mit der Suppression der Gen-Expression in Verbindung gebracht werden, während hypo- oder unmethylierte CpG-Inseln mit aktiver Transkription zusammenhängen. DNA-Stücke, die im Vergleich zum physiologischen Status hypermethyliert vorliegen, führen zum sogenannten Silencing potenziell wichtiger Gene, was zum Beispiel die Inhibierung von Tumor-Suppressor-Genen zur Folge haben kann oder im Fall von MDS zu einer Unterbrechung der normalen Hämatopoiese führt (Silverman 2004).

### 2.2.2.2. S-Adenosyl-L-Methionin (SAM)

Abb. 9

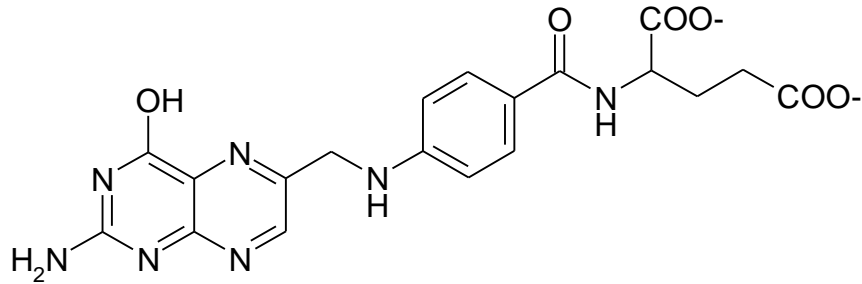


S-Adenosyl-L-Methionin (Abb. 9) ist der Hauptmethylgruppendonor unter physiologischen Verhältnissen in Prokaryonten und Eukaryonten und wird aus Methionin und ATP synthetisiert. Es ist in der Lage, Methylgruppen an eine Vielzahl von Substraten abzugeben wie zum Beispiel Proteine, Phospholipide, RNA und auch DNA (Cantoni 1985). Die Entstehung kardialer und neurologischer Krankheiten, aber auch Krebs, Diabetes mellitus sowie Aneuploidie, werden mit Veränderungen im Metabolismus von Methylgruppen und daraus resultierendem Mangel an SAM in Verbindung gebracht (Ramirez, Stopper et al. 2007). Gründe für einen SAM-Mangelzustand könnten einerseits Polymorphismen von Enzymen sein, die am Metabolismus von Methylgruppen beteiligt sind (Bosco, Gueant-Rodriguez et al. 2003). Zum Anderen kommen Mangelernährung (z.B. Methionin- oder Folat-arm) und Chemikalien-Exposition (z.B. Arsen) in Frage (Niculescu and Zeisel 2002; Poirier 2002). Betrachtet man die Rolle, die die Methylierung in verschiedenen zellulären Prozessen spielt, ist es nachvollziehbar, dass die Verfügbarkeit von SAM tiefgreifende Effekte sowohl auf das Zellwachstum und die Differenzierung als auch auf die Funktion von Genen haben könnte (Chiang, Gordon et al. 1996). Es konnte nachgewiesen werden, dass die bereits erwähnte Methionin- oder Folat-arme

Ernährung zu SAM-Mangelscheinungen und in der Folge zu DNA-Schäden und weitreichender Hypomethylierung führt, was wiederum die Ursache für die Krebsentstehung sein könnte (Poirier 2002).

### 2.2.2.3. Folsäure (Folat)

Abb. 10



Folat (Abb. 10), ein wasserlösliches Vitamin und Teil des Vitamin B Komplexes, spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei Methylierungsreaktionen sowie der DNA- und RNA-Synthese (Glynn and Albanes 1994). Die biologisch aktive Form der Folsäure ist die 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure, die NADPH-abhängig entsteht. Die biochemische Rolle von Folat besteht im Transfer von C1-Einheiten, einem Vorgang, bei dem eine Methylgruppe *de novo* synthetisiert wird. Diese Methylgruppe wird in der Folge zu S-Adenosylmethionin transferiert, das ein wichtiger Methylgruppendonor für die DNA ist.

Ein negativer Zusammenhang existiert zwischen der Folat-Einnahme während der Schwangerschaft und dem Auftreten bösartiger Gehirntumoren und Neuralrohrdefekten bei den Kindern.

Aber auch für Erwachsene konnte mittlerweile ein Zusammenhang zwischen dem Folatstatus und dem Auftreten von Krebs und prämaligen Veränderungen festgestellt werden. Dies könnte daher rühren, dass ein Folat-Mangel chromosomale Schäden verursacht, die auf eingeschränkte DNA-Synthese oder -Reparatur zurückzuführen sind. Darüber hinaus könnte die verminderte Produktion von S-Adenosylmethionin die Expression von Onkogenen und/oder Tumorsuppressorgen durch die gestörte DNA-Methylierung beeinflussen (Christensen 1996).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Laborchemikalien und Arbeitsgeräte

##### 3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien wurden in höchster Qualität kommerziell erworben. Sie stammten von Sigma Chemie (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Aldrich Chemie (Steinheim).

Hochreines Lösungsmittel wurde aus der hauseigenen Reinstwasseranlage entnommen (Millipore-System). Puffer und Lösungen wurden autoklaviert oder über Millipore-Filter sterilfiltriert.

Allgemeine Verbrauchsmaterialien wurden von der Firma Hartenstein (Würzburg), Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur von der Firma Greiner (Nürtingen) geliefert.

##### 3.1.2. Arbeitsgeräte

Autoklav	Melag Typ 28, Melag, Deutschland
Brutschrank	Typ B 5060 EK-CO <sub>2</sub> , Heraeus, Deutschland
Coulter Counter	Z1, Coulter Electronics, UK
Durchflusszytometer (FACS)	LSR, Becton Dickinson GmbH (BD Biosciences), Heidelberg
Eismaschine	FH-100, Scotsman, Deutschland
Feinwaage	KA BC 100, Sartorius AG, Göttingen
Lichtmikroskope	1. Zeiss, Deutschland 2. Labovert, Leitz, Bensheim
pH-Meter	Wissenschaftlich Technische Werkstätten GmbH (WTW), Weilheim
Pipetten	1. Gilson, Frankreich 2. Eppendorf, Hamburg 3. Labsystem, Finnland 4. Brand, Wertheim

Software (Auswertungsprogramme)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Komet 5.0, Kinetic Imaging</li> <li>2. CellQuest Pro</li> <li>3. QCapture Pro</li> <li>4. WinMDI 2.8</li> </ol>
Sterile Werkbank	Gelaire BH 26, Flow Laboratories, Deutschland
Sterilisator	Heraeus, Deutschland
Stromquelle (Elektrophorese)	Power Pac 300, Bio Rad Laboratories, CA, USA
Ultraschallbad	Sonorex RK 103 H, Bandelin, Deutschland
Vortexer	Vortex Genie 2, Bender und Hohein AG, Zürich
Waage	PB 602, Mettler Toledo, Schweiz
Wasserbad	Köttermann, Deutschland
Zentrifugen	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cytospin 3, Shandon, UK (Zellfixation für Mikroskopie)</li> <li>2. Labofuge 400 E, Function Line, Heraeus Instruments, Osterode</li> <li>3. Hettich Universal / K2S, Tuttlingen (gekühltes Zentrifugieren)</li> </ol>

### 3.2. Puffer und Lösungen

Acridin-Orange-Lösung: > 1 %-ige Acridin-Orange-Stammlösung (Sigma ): 450 µl  
> Sörensen-Puffer: 71,5 ml

→ Mit diesem Fluoreszenzfarbstoff werden die Zellen für die Mikrokernauszählung gefärbt. Die Färbedauer beträgt 3 Minuten.

Agarose: > HMP (High Melting Point Agarose; 1,5 %): 1500 mg  
> PBS-Puffer: 100 ml

→ Die HMP-Agarose wird aufgeköcht. Die Objektträger für den Comet-Assay werden damit einseitig beschichtet und getrocknet.

- > LMP (Low Melting Point Agarose; 0,5 %): 100 mg
- > PBS-Puffer: 20 ml

→ Die LMP-Agarose dient als Gel, in dem die elektrophoretische Wanderung beim Comet-Assay erfolgt (180 µl Agarose, 20 µl Zellsuspension werden auf die HMP-beschichteten Objektträger aufgetragen).

- Annexin-V-/PI-Lösung:
- > Annexin V (Sigma): 2,5 µl
  - > Propidium-Iodid (PI, Sigma),  
verdünnt auf 20 µg/ml mit H<sub>2</sub>O (bidest): 2,5 µl
  - > Binding-Puffer: 95 µl

→ Die benötigten Einzelvolumina müssen mit der jeweils angesetzten Probenzahl multipliziert werden, d.h. es werden pro zu messender Probe 100 µl benötigt. Die Färbelösung wird für 20 Minuten inkubiert, die Ansätze werden dabei dunkel gelagert. Die Färbung wird durch Zugabe von 400 µl Binding-Puffer beendet.

- Färbe-Lösungen (rein):
- > DCFH<sub>2</sub>-DA (20 mM, Verdünnung mit DMSO);  
Farbstoff für die durchflusszytometrische Messung von oxidativem Stress.

→ Jeder Ansatz (1 ml, ca.  $1 \times 10^6$  Zellen) wird mit 0,5 µl Antikörper-Lösung für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert.

- > Anti-5-methyl-cytosine (Stock-Lösung 1 mg/ml;  
Verdünnen auf 2 µg/ml mit Stop-Lösung); Primärer  
Antikörper bei der Methylierungsmessung; Calbiochem,  
NA81, 1mg/ml

→ Jeder Ansatz ist mit 300 µl Antikörper-Lösung für 40 Minuten bei 37 °C zu inkubieren.



→ FITC-konjugierter Anti-Maus-Antikörper (die Stock-Lösung ist 1:50 mit Wasch-Puffer zu verdünnen); Sigma, F0132

→ Jeder Ansatz ist mit 300 µl Antikörper-Lösung für 40 Minuten bei 37 °C zu inkubieren und die Ansätze vor Lichteinstrahlung zu schützen.

Binding-Puffer:

> HEPES:	3,58 g	= 0,1 M
> NaCl:	1,23 g	= 1,4 M
> CaCl:	0,42 g	= 25 mM
> H <sub>2</sub> O (bidest):	ad 150 ml	
> pH-Wert:	7,4	
> Autoklavieren		

→ Dieser Puffer ist 10-fach konzentriert und muss vor Gebrauch mit PBS-Puffer verdünnt werden. Er dient zur Herstellung der Annexin-V/PI-Färbelösung und zur Abpufferung der Färbereaktion.

Borat-Puffer:

> Boric Acid (Sigma, B-6768):	0,62 g
> H <sub>2</sub> O (bidest):	ad 100 ml
> pH-Wert:	8,5

→ Dieser 0,1 M Borat-Puffer wird zur Neutralisation im Rahmen der Methylierungsmessung verwendet.

Elektrophorese-Puffer:

> 5 M Natronlauge (NaOH):	120 ml
> 0,2 M EDTA:	10 ml
> H <sub>2</sub> O (bidest):	ad 2000 ml
> Kühlung:	4 °C

→ Der Puffer ermöglicht nach Lyse der Zellmembranen ein Entwinden der DNA-Doppelstränge, Strangbrüche an

den alkalilabilen Stellen und damit die elektrophoretische Wanderung im Gel. Die Präparate müssen deshalb vor Anlegen der Spannung (25 V, 3 A) für 20 Minuten im Puffer einliegen. Während der gesamten Elektrophorese sind die Präparate vor Lichteinstrahlung zu schützen.

EDTA-Lösung: > EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III): 14,89 g  
> H<sub>2</sub>O (bidest): ad 200 ml  
> pH-Wert: 10

→ Diese 200 mM Lösung dient zur Herstellung des Elektrophorese-Puffers.

Lyse-Lösung: > Lyse-Puffer: 66,75 ml  
> DMSO (Sigma): 7,5 ml  
> Triton X 100 (t-Octylphenoxyethanol, Sigma): 0,75 ml  
> Kühlung: 4 °C  
> Lichtschutz

→ Durch mindestens 1-stündiges Einstellen der Präparate in diese Lösung werden die Zellmembranen der im Gel eingebetteten Zellen lysiert und diese damit auf die Elektrophorese im Rahmen des Comet-Assays vorbereitet.

Lyse-Puffer: > NaCl: 146,1 g  
> EDTA: 37,22 g  
> N-Laurylsarcosinat: 10 g  
> Tris Ultra Qualität (Tris-hydroxymethyl-aminomethan): 1,21 g  
> H<sub>2</sub>O (bidest): ad 1000 ml  
> pH-Wert: 10  
> Autoklavieren

→ Der Lyse-Puffer dient zur Herstellung der Lyse-Lösung.

---

Methanol-Lösungen:	> Methanol:	88 Vol-%
	> PBS / CMF:	12 Vol-%
	> Kühlung:	-20 °C

→ Die Methanol-Lösungen werden zur Zellfixation gebraucht. Die gezeigte 88 Vol-%-ige Lösung findet bei der Methylierungsmessung Anwendung. Eine reine Methanol-Lösung wird zur Zellfixierung/-lagerung im Rahmen der Präparateherstellung mittels Cytospin zur mikroskopischen Analyse benötigt.

PBS-Puffer:	> 8,0 g Natriumchlorid
	> 0,2 g Kaliumchlorid
	> 0,575 g Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat
	> 0,2 g Kaliumhydrogenphosphat
	> H <sub>2</sub> O (bidest) ad 1000ml
	> pH-Wert: 7,0
	> Autoklavieren

→ Der Puffer findet vielseitig Verwendung bei der Herstellung anderer Puffer und Lösungen, dient als Lösungsmittel und zum Waschen der Zellen.

PFA-Lösung:	> Paraformaldehyd (Sigma, P-6148):	50 mg
	> PBS:	ad 20 ml

→ Diese 0,25 %-ige Lösung wird bei der Zellfixierung im Rahmen der Methylierungsmessung benötigt. Sie muss immer frisch angesetzt werden und ist zur besseren Löslichkeit kurz aufzukochen.

- PI-Färbelösungen:
- > Propidium-Iodid (PI, Sigma),  
verdünnt auf 20 µg/ml mit H<sub>2</sub>O (bidest): 200 µl
  - > H<sub>2</sub>O (bidest): ad 10 ml
  - > Lichtschutz

→ Mit jeweils 15 µl der Färbelösung werden die Präparate beim Comet-Assay für die mikroskopische Auswertung angefärbt. Die Präparate können bis zur Auswertung etwa 1 Woche bei 4 °C gelagert werden.

- > Propidium-Iodid (PI, 1 mg/ml, Sigma): 1 ml
- > PBS: 9 ml
- > Lichtschutz

→ Mit jeweils 10 µl der Färbelösung wird jeder Ansatz (1 ml) im Rahmen der FACS-Messung von oxidativem Stress angefärbt, um gleichzeitig auch zytotoxische Effekte zu erfassen.

- Sörensen-Puffer:
- > Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat: 5,84 g in 492 ml H<sub>2</sub>O (bidest)
  - > Kaliumhydrogenphosphat: 4,61 g in 508 ml H<sub>2</sub>O (bidest)
  - > pH-Wert des Puffers: 6,8

→ Der Puffer dient dem Entfärben der Zellen bei der Mikrokernauszählung (2 x 5 Minuten) und zur Herstellung der Acridin-Orange-Lösung.

- Stop-Lösung:
- > Wasch-Puffer: 45 ml
  - > Fetal Bovine Serum (FBS): 5 ml

→ Diese Lösung bereitet die Zellen auf die Immunfärbung im Rahmen der Methylierungsmessung vor. Die Lösung ist vor jedem Gebrauch frisch anzusetzen.

Tris-Puffer:	> Tris Ultra Qualität (Tris-hydroxymethyl-aminomethan):	48,452 g
	> H <sub>2</sub> O (bidest):	ad 1000 ml
	> pH-Wert:	7,5
	> Autoklavieren	

→ Dieser Puffer dient zur Neutralisation nach der Elektrophorese und ermöglicht eine Färbung mittels Propidium-Iodid.

Wasch-Puffer:	> PBS-Puffer:	1000 ml
	> BSA (Albumine from bovine serum, Sigma A-7906): (= 1 %)	10 g
	> Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate, Sigma P-1379): (= 0,2 %)	2 ml

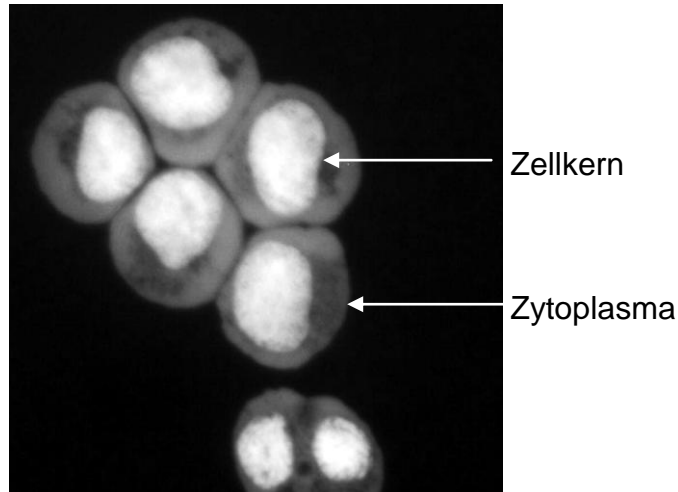
→ Mit diesem Puffer werden die Zellen im Rahmen der Methylierungsmessung gewaschen.

> PBS-Puffer:	2000 ml
> BSA (Albumine from bovine serum, Sigma A-7906): (= 1 %)	20 g
> Kühlung:	4 °C

→ Mit diesem Puffer werden die Zellen im Rahmen der Messung von oxidativem Stress gewaschen.

### 3.3. Zellkultur

#### 3.3.1. Verwendete Zelllinie



**Abb. 1:** Cytospin-Präparat von L5178Y-Zellen (murine Mauslymphomzelllinie) nach Anfärbung mit Acridin-Orange.

Alle Versuche wurden mit Maus-Lymphom-Zellen L5178Y tk<sup>+/-</sup> (MoLy) durchgeführt, die von Prof. Dr. W. J. Caspary, National Institute of Environmental Health Sciences, North Carolina (USA), zur Verfügung gestellt wurden. Diese Suspensions-Zelllinie besitzt nur eine geringe metabolische Kompetenz. Daher sollte für die zu untersuchende DNA-schädigende Wirkung von Substanzen ein aktivierungsunabhängiger Mechanismus verantwortlich sein. Abbildung 4.1 zeigt die Suspensions-Zelllinie nach Färbung mit Acridin-Orange (Aufnahme: René Jonas, 2006).

#### 3.3.2. Kulturmedium

Das verwendete Medium setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

> Grundmedium RPMI 1640 (Sigma, 500ml, mit Phenolrot):	500 ml
> Pferdeserum, hitzeinaktiviert 30 min bei 56 °C (10 % der Lösung):	50 ml
> Natrium-Pyruvat 107 µg/ml (Sigma, 100ml):	5 ml
> L-Glutamin 0,25 mg/ml (Sigma, 100 ml):	5 ml
> Penicillin 40 U/ml; Streptomycin 0,04 mg/ml (Sigma, 100ml):	2 ml

### **3.3.3. Kultivierung der Zellen**

#### **3.3.3.1. Auftauen**

Die in flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ °C}$  gelagerten Zellen wurden zu Beginn der Versuchsreihe im Wasserbad bei  $37\text{ °C}$  aufgetaut. Nachdem unter der Sterilbank die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert wurde, waren nun in der Zentrifuge die Zellen vom DMSO-haltigen Einfriermedium zu trennen. Danach wurde der Überstand abdekantiert und das Zellpellet in eine Zellkulturflasche (T25, Greiner) überführt, nachdem es in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und zur Vereinzlung der Zellen mehrfach resuspendiert wurde. Es folgte die Inkubation im Brutschrank bei  $37\text{ °C}$  und 5 %-iger  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre. Am nächsten Tag war ein Mediumwechsel zur Entfernung entstandener Zelltrümmer durchzuführen, und die Zellen wurden in eine T100 - Zellkulturflasche überführt, von wo aus sie zur Zellgewinnung für die Versuchsreihen passagiert wurden.

#### **3.3.3.2. Passagieren der Stammkultur**

Die L5178Y-Zelllinie wurde als Suspension frei wachsender Zellen bei  $37\text{ °C}$  und 5 %-iger  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre in T100-Zellkulturflaschen (Greiner) im Brutschrank kultiviert und dreimal pro Woche passagiert. Das Passagieren der Zellen wurde wie folgt durchgeführt:

Zur Vereinzlung der Zellen wurde die Zellsuspension unter der Sterilbank zunächst mit 5 ml-Pipetten wiederholt suspendiert. Dann wurde durch Entnahme eines Aliquots der Suspension (200  $\mu\text{l}$ ) die Zellzahl mit Hilfe des Coulter-Counters bestimmt. Hierdurch konnte auf einfache Art und Weise eine Qualitätskontrolle der Zellen durchgeführt werden, da beurteilt werden konnte, ob eine normale Replikationsrate der Zellen von etwa 10 Stunden vorlag. Danach wurde aus der bestehenden Zellkulturflasche mit der konzentrierten Zellsuspension soviel Volumen entnommen und mit neuem Kulturmedium ( $37\text{ °C}$ , ca. 20 ml) in einer neuen Flasche resuspendiert, dass eine Aussaat in einer Ausgangskonzentration von  $1,5 \cdot 10^5$  Zellen/ml erreicht wurde.

### 3.4. Testsubstanzen

Die Zellkulturen wurden mit folgenden Testsubstanzen inkubiert:

Testsubstanz	Hersteller	Lösungsmittel
--------------	------------	---------------

#### A. Reine Arseneffekte

1. Arsenic NaAsO <sub>2</sub> (Arsen)	Sigma, S-7400, 5 g	Aqua dest.
2. 4-Nitrochinolin-1-Oxid (NQO)	Sigma N-8141	DMSO
3. Methylmethansulfonat (MMS)	Sigma	DMSO

#### B. Modulation der Arseneffekte

4. N-Acetyl-L-Cystein (NAC)	Sigma, A-9165, 5 g	Aqua dest.
5. Benfotiamin (Vitamin B)	Yonezawa Hamari Chem., Ltd., Apply Chem GmbH, A-0776	Pyridin 1 T Aqua dest. 4 T
6. (+)- $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E)	Sigma, T-3634, 10 g	DMSO
7. 4-Nitrochinolin-1-Oxid (NQO)	Sigma, N-8141	DMSO
8. S-Adenosyl-L-Methionin Chlorid (SAM)	Sigma, A-7007, 5 mg	Aqua dest.
9. Folsäure (Folat)	Sigma, F-8758, 5 g	Aqua dest.
10. 5-Azacytidin (5-Aza)	Sigma, A-3656, 5 mg	Aqua dest.

Die Testsubstanzen, welche zur Modulation der Effektinduktion durch Arsen herangezogen wurden, finden sich in der Tabelle in Abschnitt B. Diese wurden überprüft, indem das Test-Konzentrationspektrum ansteigend vom „no effect level“ bis hin zur Toxizitätsgrenze der Substanzen gelegt wurde. Traten bis zur Löslichkeitsgrenze der Substanzen keine adversen Effekte auf, so bildete diese die obere Begrenzung des Untersuchungsspektrums.

Prinzipiell durften die zu den Testansätzen hinzupipettierten Lösungen der Kontroll- und Testsubstanzen nicht mehr als 1 % des gesamten Kulturvolumens betragen, um Lösungsmittel-bedingte Zellschäden zu vermeiden und konstante Qualität des Wachstumsmediums zu erzielen.



## **3.5. Verfahren und Methoden**

### **3.5.1. Allgemeines**

Die Vorgehensweise vorliegender Arbeit bei der Untersuchung des Risikoprofils von Arsen sowie dessen Modulation durch oben genannte Substanzen beruht generell auf zwei Prinzipien: der Ermittlung des toxischen sowie der Ermittlung des gentoxischen Potentials. Im Gegensatz zur Untersuchung auf akute, chronische und reproduktionstoxische Aktivitäten, für die auf Tierversuche (*in vivo*) nicht verzichtet werden kann, eignen sich für diese Arbeit *in-vitro*-Testverfahren am besten, mit deren Hilfe durch die Möglichkeit der Bearbeitung einer großen Probenzahl ein großflächiges Screening erzielt werden kann. Außerdem eignen sie sich vorzüglich zur Aufklärung molekularer Wirkmechanismen.

Die Kenntnis des toxischen Potentials von Testsubstanzen, insbesondere die Kenntnis der Konzentrationsabhängigkeit zytotoxischer Effekte, ist eine essentielle Voraussetzung für eine korrekte Bewertung und Interpretation gentoxischer Effekte, zu deren Beurteilung insbesondere die Ermittlung von Mikrokernfrequenzen herangezogen wurde. Eine vitale und in ihrer Funktion integre Zelle ist nämlich die Grundvoraussetzung für die Induktion von Mikrokernen. Fehlende Induktion von Mikrokernen bei Missachtung stark zytotoxischer Konzentrationen kann zur falsch-negativen Ergebnisinterpretation führen. Rückschlüsse auf den Mechanismus gentoxischer Aktivität konnten aus der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) und der Methylierungsmessung gezogen werden.

### **3.5.2. Proliferationsexperiment**

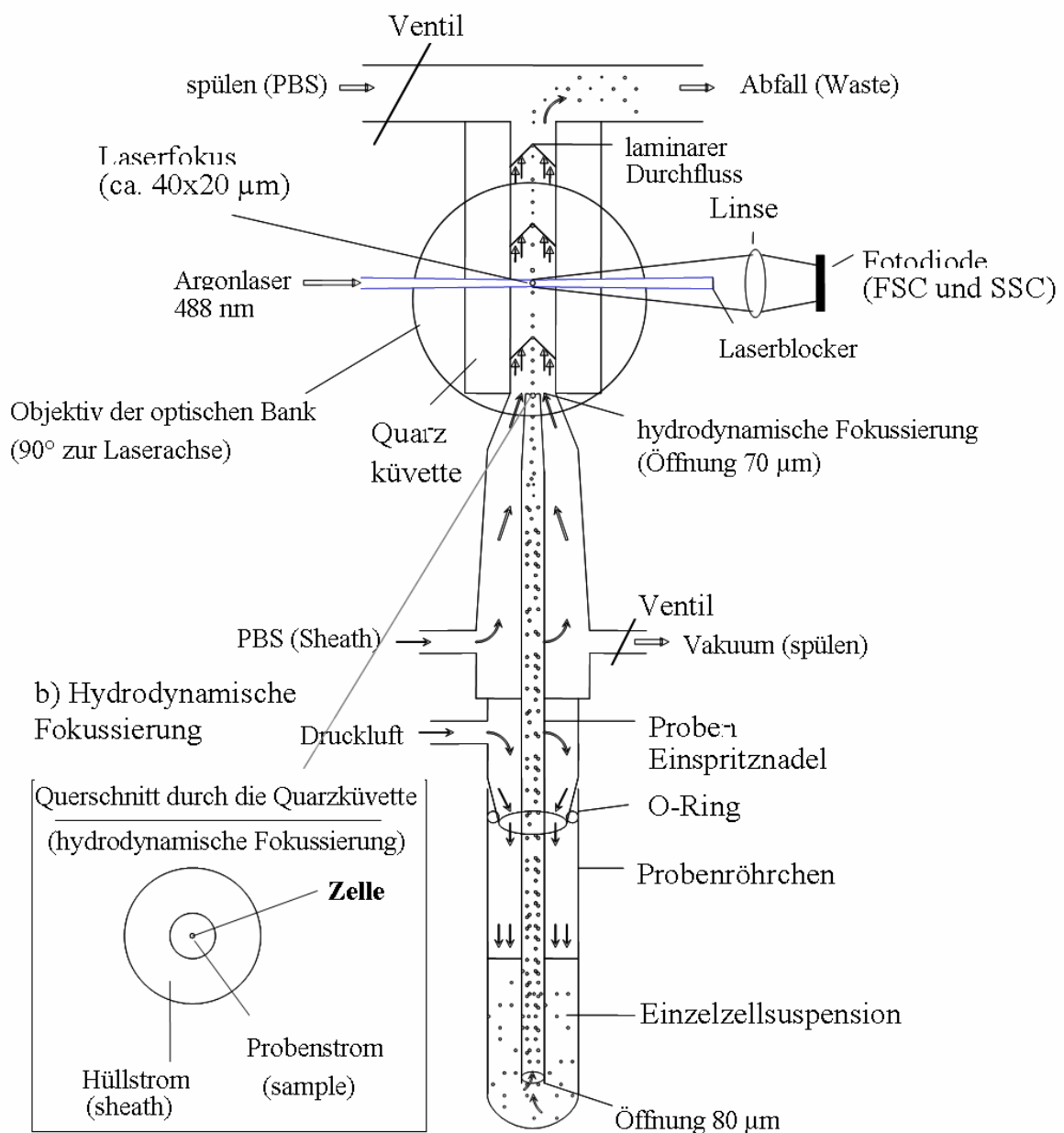
Um eine Steigerung oder Inhibierung der Zellproliferation im Vergleich zur normalen Replikationsrate von ca. 10 Stunden und damit mögliche toxische Effekte festzustellen, wurden Wachstumskurven der Zellen erstellt.

Die Werte zur Erstellung der Wachstumskurven erhielt man, indem aus jedem Versuchsansatz zum Feststellungszeitpunkt ein Aliquot von 200 µl aus den resuspendierten Zellsuspensionen entnommen wurde, dieses mit isotoner Natriumchlorid-Lösung auf 10 ml Gesamtvolumen ergänzt wurde und im Coulter-Counter die Zelldichte des Ansatzes als Mittelwert aus jeweils zwei Einzelmessungen ermittelt wurde.

Die Auswertung des Tests vollzog sich tabellarisch und grafisch entweder in der Darstellung des Zellwachstums bezüglich der Zeit oder in Abhängigkeit von den eingesetzten Testsubstanzkonzentrationen zu einem definierten Feststellungszeitpunkt.

### 3.5.3. Durchflusszytometrie

#### 3.5.3.1. Prinzip



**Abb.2:** Aufbau eines Durchflusszytometers

Die Grundlagen der Durchflusszytometrie basieren auf den Erkenntnissen zur Zählung gelöster Partikel von Wallace Coulter und auf der Entdeckung des hydrodynamischen Prinzips durch Van Dilla. Aufgrund moderner Laser- und Computertechnologie ist heute eine Erfassung von bis zu 70.000 Partikeln pro Sekunde bei simultaner Analyse bzw. Sortierung nach zehn Parametern möglich. Die Durchflusszytometrie (FACS steht für Fluorescence Activated Cell Sorting) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln (Zellen, Kunststoffkügelchen usw.) in einem Flüssigkeitsstrom. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren.

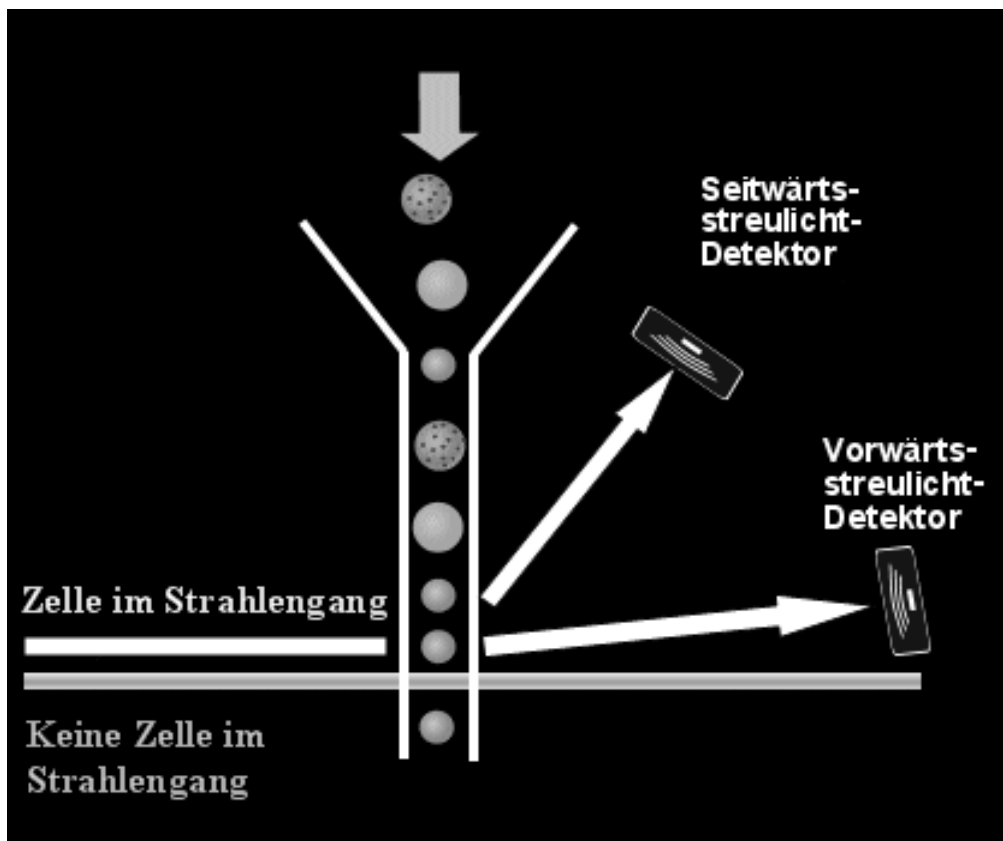
Das Prinzip der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse (FACS-Analyse) ist die quantitative Bestimmung eines Zelltyps, von Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Proteinen (Abb. 2). Grundlage ist entweder die Zellfärbung mittels Fluoreszenzfarbstoffen, wie sie in dieser Arbeit bei der Detektion von zytotoxischer Effekte und der Quantifizierung von oxidativem Stress zur Anwendung kommt, oder die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt und in dieser Arbeit bei der Bestimmung der Apoptosefrequenz und der DNA-Methylierung verwendet wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, ist proportional zur Menge an gebundenem Fluoreszenzfarbstoff bzw. Antikörper pro Zelle. Die Daten werden an ein Auswertungsprogramm weitergeleitet und in Diagrammen angezeigt.

Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar mit einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen (Tab. 1).

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Abkürzung
	[nm]	[nm]	
Annexin V Fluos	395	509	ANE 5
Dichlorodihydrofluoresceindiacetat	495	519	DCFH <sub>2</sub> -DA
Propidiumjodid	550	650	PI

**Tab. 1:** Absorptions- und Emissionsmaxima der bei der durchflusszytometrischen Zytotoxizitäts-Analyse eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe

Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße sowie die Oberflächen- und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen. Eine den Laserstrahl kreuzende Zelle verursacht Streulicht. Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen in ihrem Inneren sind, desto stärker wird das Licht gestreut. Somit erhält man durch Messung des Streulichts auf einfache Weise wichtige Informationen über die Zelle. Eine Zelle im Strahlengang streut das Licht in verschiedene Richtungen. Je nachdem, in welchem Winkel man das Streulicht misst, erhält man unterschiedliche Informationen (Abb. 3):



**Abb 3:** Streulichtmessung. Solange der Laserstrahl ungehindert durch die Flusszelle geht, entsteht kein Streulicht. Quert hingegen eine Zelle den Strahl, wird das Licht in verschiedenste Richtungen gestreut. Gemessen wird das Streulicht meist an 2 Stellen: a) (fast) in Richtung des ursprünglichen Strahls (Vorwärtsstreulicht) und b) etwa im 90° Winkel zum ursprünglichen Strahl (Seitwärtsstreulicht).

Das Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Light Scatter oder Low Angle Scatter) hängt vor allem von der Größe einer Zelle ab. Das heißt, kleine Zellen verursachen ein kleines Vorwärtsstreulichtsignal, große Zellen ein großes.

Das Seitwärtsstreulicht (engl. Side Scatter) hängt außer von der Größe auch sehr stark vom Inhalt einer Zelle ab. Finden sich in der Zelle sehr viele Lysosomen (das sind kleine, Enzym-speichernde Bläschen), dann hat sie ein großes Seitwärtsstreulicht, finden sich nur wenige, dann ist ihr Seitwärtsstreulicht gering. In der Fachsprache nennt man diese Körner in der Zelle Granula und die Körnigkeit einer Zelle Granularität. Man spricht dann davon, dass das Seitwärtsstreulicht von der Granularität der Zelle abhängt.

### **3.5.3.2. Apoptosemessung**

Das Durchflusszytometer eignet sich hervorragend zur Feststellung toxischer Effekte und ermöglicht desweiteren eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose. Zellbiologen verstehen unter Apoptose den kontrollierten Selbstmord von Zellen. Im Gegensatz zum Tod durch Nekrose, der die Zellen meist unverhofft durch äußere Einwirkungen wie Verbrennung, Vergiftung oder mechanische Verletzung der Zellmembran ereilt, läuft bei der Apoptose ein fein gesteuertes Zellprogramm ab, das ausgesuchte Zellen in den Selbstmord treibt. Apoptotische Zellen ändern schrittweise ihre Morphologie. Zuerst schrumpfen sie und bilden Membranausbuchtungen, später kondensiert das Chromatin, und Endonukleasen fragmentieren die DNA. Die Zellmembran bleibt aber erhalten. Bei der Apoptose findet, im Gegensatz zur Nekrose, keine Immunreaktion statt.

Im Durchflusszytometer kann man erkennen, wie die Zellen in der Anfangsphase der Apoptose schrumpfen und eine leicht granuläre Oberfläche bekommen, und zwar bereits, ohne dass die Zellen angefärbt sind. Innerhalb weniger Stunden verkleinern sich die Zellen immer mehr und die Granularität nimmt ab, bis am Ende nur noch winzige apoptotische Partikel, so genannte Apoptotic Bodies, übrigbleiben.

Vorliegende Arbeit nutzt Veränderungen in der Plasmamembran apoptotischer Zellen für den Nachweis von Apoptose im Durchflusszytometer. Die Membran ist in "normalen" Zellen asymmetrisch aufgebaut. So befindet sich zum Beispiel das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) immer auf der Innenseite. Nur bei apoptotischen Zellen tritt PS auch auf der Außenseite auf. Diese Veränderung der Zellmembran dient als so genanntes „Eat-me“-Signal für Makrophagen.

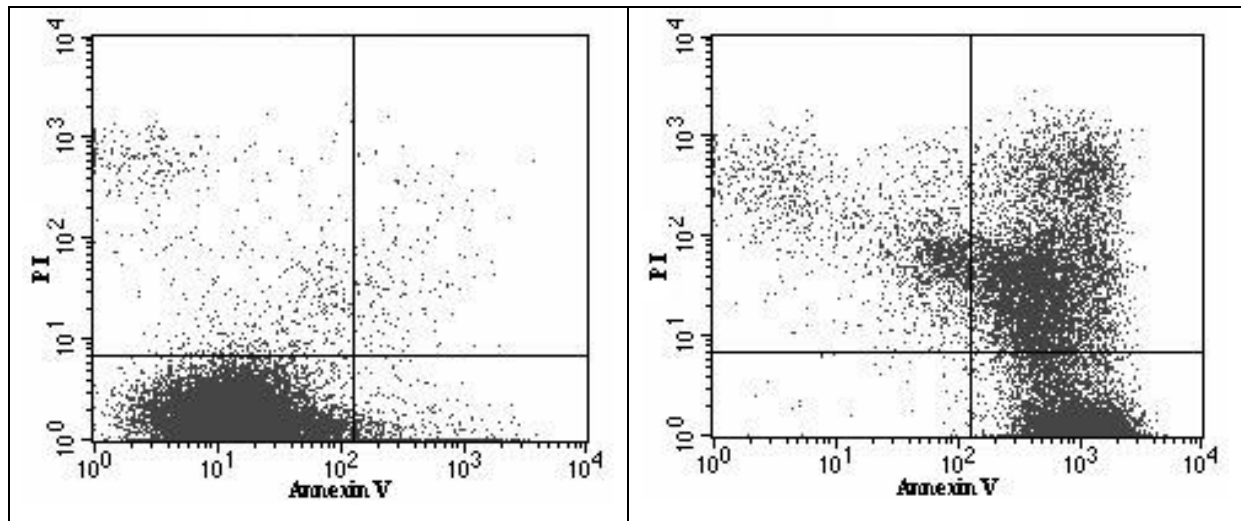
Mit Hilfe des fluoreszenzmarkierten (Fluoreszeinisothiocyanat) Proteins Annexin V, das an das PS auf der Membranaußenseite bindet, können die apoptotischen Zellen im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Die Membran von nekrotischen Zellen ist für Annexin V ebenfalls durchlässig. Es wird deshalb eine zusätzliche Ausschluss-Färbung mit PI durchgeführt, damit nekrotische von apoptotischen Zellen unterschieden werden können. Das Propidiumiodid dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran ein, also in nekrotische Zellen.

Lebende Zellen sind daher Annexin-negativ und PI-negativ (LL), frühe apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-negativ (LR), frühe nekrotische Zellen sind Annexin-negativ und PI-positiv, späte nekrotische und apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-positiv (UR). In der Literatur wird eine vierte Kategorie von PI-positiven, aber Annexin-negativen Zellen (UL) beschrieben (Frey, Ormerod), die nach dem beschriebenen Prinzip gar nicht auftreten dürfte. Derartige Zellen werden in dieser Arbeit als Marker für schwere zytotoxische, aber möglicherweise noch reversible Effekte verwendet (Abb.4).

Für die Färbung werden pro Ansatz ca.  $1 \times 10^6$  Zellen aus der Suspension eingesetzt und bei 1000 rpm 5 Minuten abzentrifugiert. Dann folgen: abgießen des Überstandes und absaugen von noch verbliebenem Medium; zupipettieren von 100 µl Annexin-V-/PI-Färbelösung pro Ansatz und kurzes Aufschütteln des Pellets auf dem Vortexer; 20-minütige Farbstoff-Inkubation bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz, um photochemische Inaktivierung der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Zupipettieren von 400 µl Binding-Puffer beendet die Färbung. Die Ansätze haben nun jeweils ein Gesamtvolumen von 500 µl und werden bis zur Messung bei 4 °C gelagert.

Es werden pro Versuchsansatz 20.000 Zellen durchflusszytometrisch ausgewertet. Jede analysierte Zelle entspricht einem Punkt im Diagramm und wird jeweils einem der vier Auswertungs-Quadranten mit der oben genannten Bedeutung zugeordnet (Abb. 4). Die prozentuale Verteilung auf die vier Quadranten wird vom Computer errechnet.

Versuchsansatz <u>ohne</u> Inkubation mit Apoptoseinduktor	Versuchsansatz <u>mit</u> Inkubation mit Apoptoseinduktor
--	---



**Abb. 4:** Beispielhafte Darstellung zweier durchflusszytometrisch analysierter Proben. Quadrantenbezeichnung:

- UL:** Upper Left: Propidiumiodid (PI)-positiv und Annexin-V-negativ
- UR:** Upper Right: PI-positiv und Annexin-V-positiv
- LL:** Lower Left: PI-negativ und Annexin-V-negativ
- LR:** Lower Right: PI-negativ und Annexin-V-positiv

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt tabellarisch und grafisch. Zytotoxische Effekte werden in Form der prozentualen Verteilung der Zellen auf die einzelnen Quadranten entweder Inkubationszeit-abhängig oder in Abhängigkeit von den eingesetzten Testsubstanz-Konzentrationen zu einem definierten Feststellungszeitpunkt aufgezeigt.

### **3.5.3.3. Semiquantitative Bestimmung von oxidativem Stress**

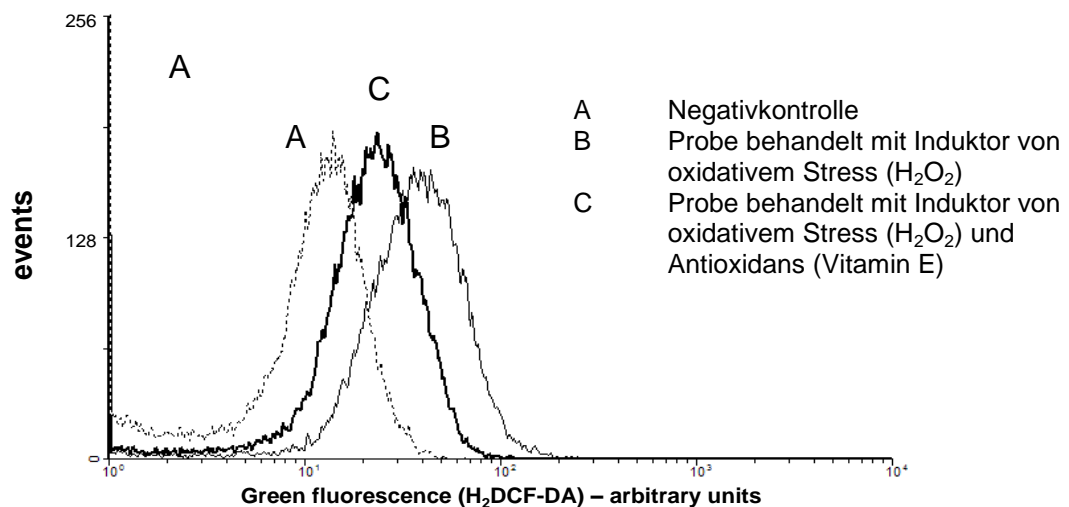
Die Versuchskultur wird mit der zu testenden Substanz inkubiert. Jeweils 10 Minuten vor Ende der jeweiligen Inkubationszeit erfolgt die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffs 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H<sub>2</sub>DCF-DA).

Die Zellen werden nach der 10-minütigen Inkubation mit H<sub>2</sub>DCF-DA geerntet, zweimal mit 1 % BSA in PBS gewaschen, mit Propidiumjodid gegengefärbt, 10 min auf Eis im Dunkeln inkubiert und die Fluoreszenzintensität anschließend sofort gemessen.

Die Zellen nehmen während der Vorinkubation H<sub>2</sub>DCF-DA (unpolar, membrangängig) auf. Intrazelluläre Esterasen spalten die Acetatgruppen ab, das Molekül wird polar und kann die Membran nicht mehr passieren. In der Zelle

vorhandene ROS sind dann in der Lage, H<sub>2</sub>DCF zu DCF zu oxidieren, das nun fluoresziert.

Die Intensität der Fluoreszenz ist somit abhängig von der Menge an oxidiertem Farbstoff, also von der Menge an ROS in der Zelle, und wird als Linksverschiebung auf der x-Achse sichtbar. Gezählt werden 30.000 Zellen pro Probe (Abb. 5), die Auswertung der Histogramme erfolgte mit Hilfe der Freeware Win MDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>).



**Abb. 5:** Beispielhafte Darstellung eines Histogramms der Messung von oxidativem Stress. Auf der Y-Achse aufgetragen ist die Zahl der gezählten Ereignisse, auf der X-Achse die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffs H<sub>2</sub>DCF-DA. Eine Zunahme von oxidativem Stress bewirkt eine Verschiebung des Histogramms nach rechts auf der X-Achse.

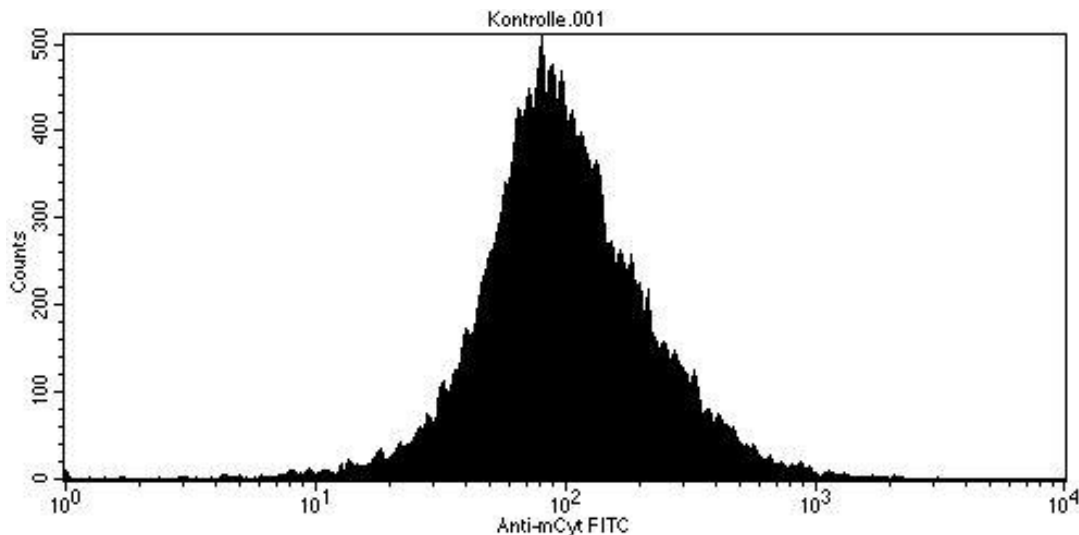
### 3.5.3.4. Bestimmung des DNA-Methylierungsstatus

L5178Y-Zellen werden mit den Testsubstanzen für 72 h inkubiert, wobei täglich ein Mediumwechsel vorgenommen und die jeweilige Substanz frisch zugesetzt wird. Sämtliche verwendeten Puffer werden für jedes Experiment frisch hergestellt.

Nach der Inkubationszeit von 72 h werden die Zellen in 50-ml-Röhrchen überführt und bei 1200 rpm 5 Minuten abzentrifugiert. Dann werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und erneut bei 1200 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wird das entstandene Pellet in 10 ml PBS aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und die Zellzahl am Coulter Counter bestimmt. Pro Ansatz werden  $2,5 \cdot 10^6$  Zellen in 10-ml-Röhrchen überführt und wieder bei 1200 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Nach Zusatz von 500 µl PFA-Lösung (0,25 % Paraformaldehyd in PBS) wird das Pellet durch Vortexen resuspendiert und die Zellen anschließend 30 Minuten im Wasserbad



inkubiert. Dann werden die Proben auf Eis für 10 Minuten in den Kühlraum gestellt, bevor unter vorsichtigem Vortexen zu jedem Ansatz PFA-fixierter Zellen 4,5 ml eiskalten (-20 °C) Methanols 88 % zupipettiert wird. Die Zellen werden nun für mindestens 15 Minuten auf Eis bei -20 °C erneut fixiert. Zur Neutralisierung werden die Proben zweimal mit 2 ml PBST-BSA (1 % BSA, 0,2 % Tween in PBS) gewaschen und zentrifugiert. Anschließend werden 1,5 ml 2 N HCl (HCl 2 mol/l) zugegeben und das Pellet durch Vortexen resuspendiert, bevor die Zellen für 25 Minuten bei 37 °C inkubiert werden. Danach wird 1,5 ml 0,1 M Borsäure (pH 8,5 in Wasser) zu den in HCl suspendierten Zellen pipettiert und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Nach der Zentrifugation werden die Proben zweimal mit je 2 ml PBST-BSA gewaschen, danach in 2 ml Stop-Lösung (10 % FCS in PBST-BSA) aufgenommen und bei 37 °C 30 Minuten inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren werden die Zellen mit Waschpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Nun werden 300 µl des primären Antikörpers Anti-5-methyl-Cytosin mAB (Endkonzentration 2 µg/ml, Stammlösung: 1 mg/ml) zum Zellpellet gegeben und vorsichtig gevortext, woran sich eine 40-minütige Inkubationszeit anschließt. Danach werden die Pellets zweimal mit PBST-BSA gewaschen und anschließend der Sekundär-Antikörper Goat-Anti-Human IgG FITC (Endkonzentration 30 µg/ml, Stammlösung: 1,5 mg/ml) zugegeben und vorsichtig gevortext. Anschließend werden die Proben erneut 40 Minuten bei 37 °C inkubiert und zweimal mit je 2 ml PBST-BSA gewaschen. Nach der Zentrifugation werden die Zellen in 0,5 ml Staining Buffer (3 % FCS, 0,9 % Natriumazid in PBS) aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert. Pro Probe werden 20.000 Zellen gezählt. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität, was gleichbedeutend mit einer größeren Menge gebundenen Antikörpers, also mit einer DNA-Hypermethylierung ist, ist als Linksverschiebung der Peaks auf der x-Achse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu erkennen, eine Hypomethylierung als Rechtsverschiebung (Abb. 6). Die Auswertung der Histogramme erfolgte ebenfalls mit Hilfe der Freeware WinMDI 2.8.



**Abb. 6:** Histogramm einer Kontrollmessung. Auf der y-Achse ist die Zahl der Ereignisse, auf der x-Achse die Intensität des FITC-konjugierten Antikörpers aufgetragen, wobei die Intensität abhängig ist von der Anzahl an Methylcytosin-Bindungsstellen, das heißt dem Grad der DNA-Methylierung.

### 3.5.4. Mikroskopie

#### 3.5.4.1. Allgemeines

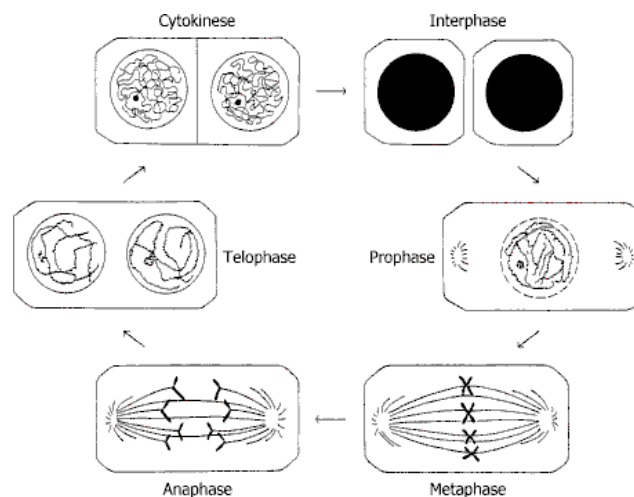
Die mikroskopische Detektion toxischer (Mitosen, C-Mitosen, Apoptosen) und gentoxischer (Mikrokerne) Effekte erfolgt unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung. Als Farbstoff dient Acridin-Orange, ein basisches und kationisches Fluorochrom, das zwischen pH 5 und 8 elektroadsorptiv wird. Chromatin und paraplastische Einschlüsse werden intensiv grün angefärbt, das Cytoplasma leuchtet rot (Strugger 1949). Die direkte mikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie dient in dieser Arbeit – neben der Kontrolle und dem Vergleich mit durchflusszytometrisch erhobenen Daten – zur Detektion der Mitosefrequenz und möglicher Störungen im Zellzyklus sowie zur Feststellung von Mikrokerninduktion als gentoxischem Endpunkt. Die Mikroskopie gilt hierbei als zwar aufwändiges, aber sehr sicheres Verfahren. Es werden pro Versuchsansatz und Messzeitpunkt jeweils zwei Präparate hergestellt. Dazu werden nach Resuspendieren einer zu analysierenden Probe jeweils zwei Aliquots von 130 µl entnommen, mittels Cytospin auf Objektträger zentrifugiert (5 min, 1000 rpm) und nach kurzem Antrocknen an der Luft in eisgekühltem Methanol (-20 °C) fixiert und gelagert. Die Färbung der Präparate erfolgte durch 3-minütiges Tauchen in Acridin-Orange-Färbelösung mit anschließendem zweimaligem Entfärben der Präparate für jeweils 5 Minuten durch Tauchen in Sörensen-Puffer (danach Lichtschutz erforderlich). Bei der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden pro Versuchsansatz mindestens 1000 Zellen nach folgenden Kriterien ausgewertet:

- Intakte Zellen (ein- oder mehrkernig)
- Mitose (reguläre Morphologie)
- C-Mitose (atypische Morphologie)
- Apoptose
- Mikrokernhaltige Zellen (ein- oder mehrkernig)

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt tabellarisch und grafisch, wobei Effektinduktionen als Relativwerte zur Kontrolle entweder Inkubationszeit-abhängig oder in Abhängigkeit von den eingesetzten Testsubstanzkonzentrationen zu einem definierten Feststellungszeitpunkt aufgezeigt werden.

### 3.5.4.2. Mitosen und C-Mitosen

Zellen können nur durch Teilung bereits vorhandener Zellen entstehen. Da alle Zellen einen Zellkern besitzen, muss jede sich teilende Mutterzelle für ihre Tochterzellen Zellkerne bereitstellen. Es geht daher jeder Zellteilung eine Kernteilung voraus. Der Zellzyklus durchläuft 5 Phasen (Abb. 7):



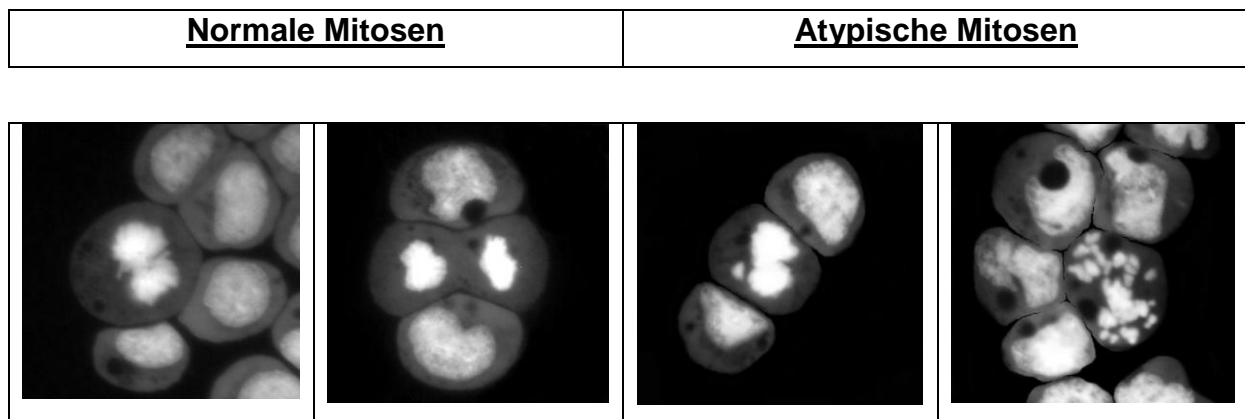
**Abb. 7:** Schematische Darstellung des Zellzyklus

- In der Prophase kommt es zur Aufschraubung und Verdickung des Chromatins mit Formation der Chromosomen. Entstehung des Spindelapparates. Auflösen der Kernhülle.
- In der Metaphase rücken die Chromosomen in die Äquatorialebene des Spindelapparates und bilden die Äquatorialplatte.
- In der Anaphase trennt der Spindelapparat die Chromatiden und zieht diese zu entgegengesetzten Polen

- In der Telophase entschauben sich gleichmäßig verteilte Chromatiden und bilden wieder je ein Kerngerüst. Bildung von neuer Kernmembran und Zellteilung.
- In der Telophase entschauben sich gleichmäßig verteilte Chromatiden und bilden wieder je ein Kerngerüst. Bildung von neuer Kernmembran und Zellteilung.
- Die Interphase ist der Zeitraum zwischen zwei Mitosen. Verdopplung des Erbmaterials und Steuerung des Stoffwechsels in der Zelle.

Zytotoxische Effekte können sich in einem Rückgang der Mitosefrequenz manifestieren, was auch bei der Interpretation möglicher gentoxischer Effekte berücksichtigt werden muss. Es gibt eine Vielzahl von Zellgiften, die die korrekte Ausbildung oder die Funktion des Spindelapparates während der Mitose stören können.

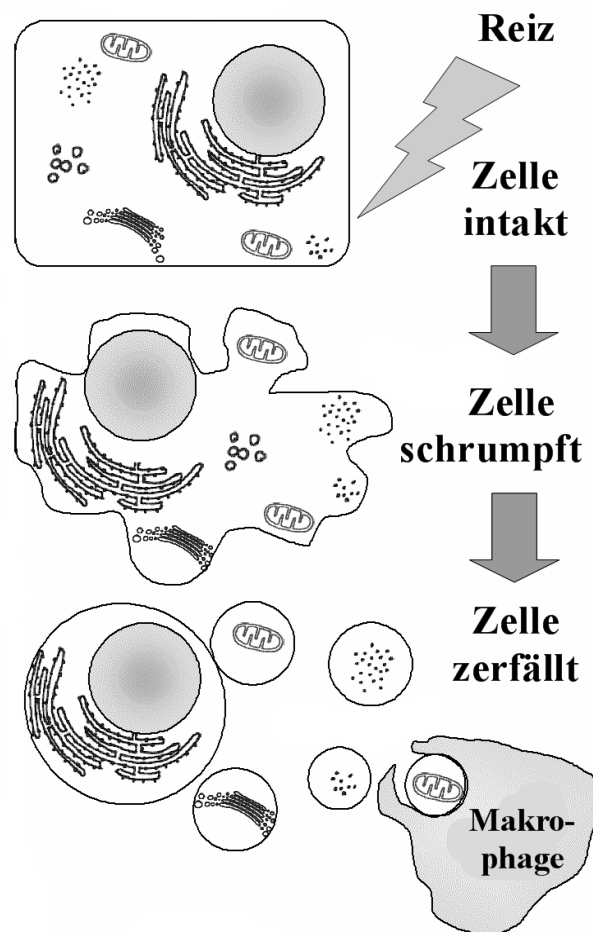
Mikroskopisch lässt sich dies häufig an der Ausbildung atypischer Mitosemorphologien oder an einem Mitosearrest mit Auftreten ungewöhnlich vieler Zellen im Mitosezyklus erkennen. Diese atypischen Mitosemorphologien mit meist verstreut liegenden Chromosomen werden in dieser Arbeit aufgrund von Ähnlichkeiten zum Mitosebild nach Colchicineinwirkung als C-Mitosen bezeichnet und von Zellen, deren Mitosebild eine normale Morphologie aufweist, differenziert (siehe Abb. 8).



Anaphase	Telophase	C-Mitose; Anaphase; leichte Schädigung	C-Mitose; Metaphase; starke Schädigung
----------	-----------	---	---

**Abb. 8:** Beispielhafte Darstellung normaler und atypischer Mitosen im Vergleich, L5178Y (René Jonas, 2006)

### 3.5.4.3. Apoptosen

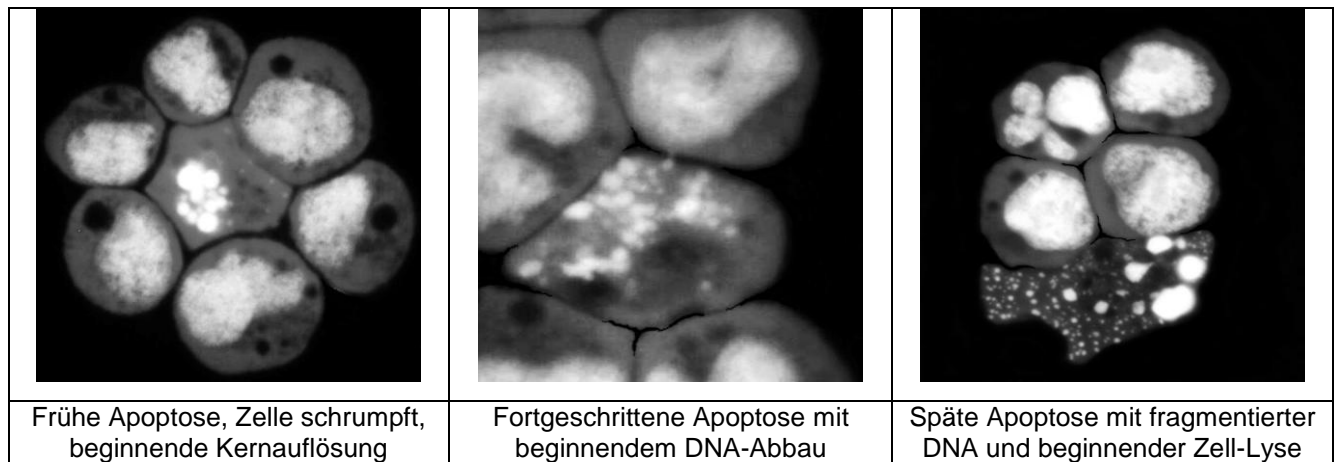


**Abb. 9:** Schematische Darstellung der Apoptose

Die Apoptose (griechisch ἀπόπτωσης: Abfallen, Niedergang) ist eine Form des programmierten Zelltods. Es ist gewissermaßen ein „Selbstmordprogramm“ einzelner biologischer Zellen. Dieses kann durch äußere (toxische) Reize angeregt werden oder aufgrund von zellinternen Prozessen ausgelöst werden (etwa nach starker Schädigung der Erbinformation). Im Gegensatz zum anderen bedeutenden Mechanismus des Zelltodes, der Nekrose, wird die Apoptose von der betreffenden Zelle selbst aktiv durchgeführt, ist Teil des Stoffwechsels der Zelle. Dadurch unterliegt diese Form des Zelltods strenger Kontrolle, und es wird gewährleistet, dass die betreffende Zelle ohne Schädigung des Nachbargewebes zugrunde geht.

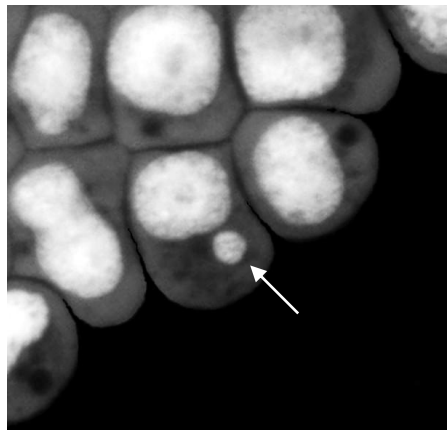
Apoptose und Nekrose lassen sich mikroskopisch unterscheiden. Während bei der Apoptose ein Schrumpfen der Zelle einsetzt und ein Abbau der DNA durch Endonukleasen in definierte Stücke stattfindet (mittels Elektrophorese im Comet Assay nachweisbar), schwillt bei der Nekrose die Zelle an, wobei deren Plasmamembran zerstört wird. Als Folge kommt es zu lokalen Entzündungen, da

Cytoplasma und Zellorganellen in den Extrazellularraum freigesetzt werden, welche durch Makrophagen (Fresszellen) beseitigt werden müssen. Im Vergleich zur Nekrose ist die Apoptose die häufigere Form des Zelltods (Abb. 9 und 10).



**Abb. 10:** Beispielhafte Darstellung von Apoptosestadien, L5178Y

### 3.5.5. In-vitro-Mikrokerntest



**Abb. 11:** L5178Y mit Mikrokern (Pfeil)

Der Mikrokern-Test dient in dieser Arbeit als *in-vitro*-Test zum Aufdecken von chromosomalen Schäden (Chromosomenbruch bzw. klastogener Effekt) und Schäden des Spindelapparates (aneugener Effekt) an mitotisch aktiven Zellen. Er wurde entwickelt, um das genotoxische Potential chemischer Substanzen nachzuweisen.

Mikrokerne (MN) stellen von einer doppelten Kernmembran umgebenes Chromatin im Zytoplasma der Zelle dar, das sich vom Hauptkern abgesondert hat (Abb. 11).

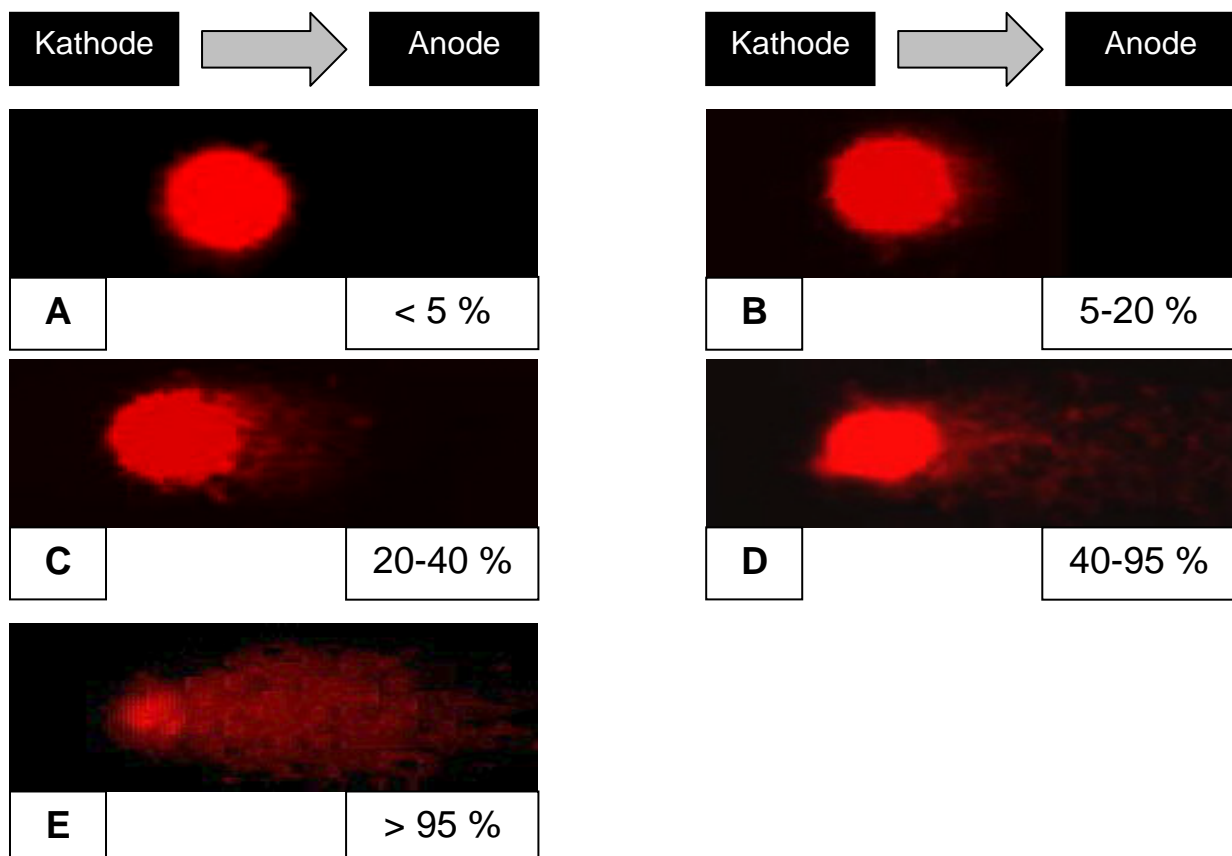
Es sind also kleinere Kerne (max. 1/3 des Hauptkerndurchmessers), die sich außerhalb (dürfen den Hauptkern nicht berühren), aber in enger Nachbarschaft (nicht weiter als 2 Hauptkerndurchmesser entfernt) zum Hauptkern befinden, von dem sie

abstammen. Die Ultrastruktur des MN entspricht der eines normalen Kerns, er besitzt Kernporen, Kernhülle, Hetero- und Euchromatin.

Zur Entstehung von MN trägt der Verlust von Chromatinmaterial aus dem Hauptkern bei. Dieser wird in der Mitose möglich, wenn das Chromatin durch Kondensation in der „Transportform“, den Chromosomen, vorliegt. Da MN durch den Verlust von Chromatinmaterial bei der Zellteilung entstehen, ist eine vorausgegangene Zellteilung für die Entstehung der MN obligat. Dabei können durch Schäden verschiedener Herkunft ganze Chromosomen oder aber azentrische Fragmente bei der Polwanderung verloren gehen. MN kommen in gesunden Zellen sehr selten vor, ihr Vorkommen kann aber durch Mutagene drastisch erhöht werden.

Da mutagene Substanzen in höherer Konzentration oft toxisch wirken, teilen sich die Zellen nur noch bedingt. Zur Entstehung eines MN ist aber die Zellteilung Grundvoraussetzung. Bei Feststellung einer hohen Zelltoxizität durch andere Testverfahren muss daher bei fehlender Mikrokerninduktion die Möglichkeit eines falsch-negativen Befundes in Betracht gezogen werden.

### 3.5.6. Einzelzell-Gelelektrophorese



**Abb. 12:** L5178Y im Comet-Assay. Von Bild A nach E steigt der Anteil geschädigter DNA von < 5 % auf > 95 % an.

Die Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay oder Single Cell Gel Electrophoresis Assay SCGE) ist eine Technik, durch die es ermöglicht wird, DNA-Schädigungen in einzelnen Zellen festzustellen. Entwickelt wurde der Assay 1984 von Östling und Johanson zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen. Mit der Weiterentwicklung durch Singh im Jahre 1988 konnten durch die Verwendung von basischen Puffern zusätzlich auch DNA-Einzelstrangbrüche festgestellt werden (Östling et al, 1984; Singh et al, 1988).

Das Prinzip des Comet Assay beruht darauf, dass Zellen in Agarose eingebettet, lysiert und einem elektrischen Feld ausgesetzt werden, der so genannten Elektrophorese. Während der Elektrophorese wandert die negativ geladene DNA zur Anode; dank der Agarose trennen sich die Bruchstücke der Größe nach auf, da die kleineren Bruchstücke in einer bestimmten Zeit eine weitere Strecke zurücklegen als die größeren. Chromosomale DNA ist jedoch zu groß, um als Ganzes im elektrischen Feld zu wandern. Nur geschädigte, bruchstückhafte DNA ist hier in der Lage, aus dem Zellkern herauszuwandern. Unter dem UV-Mikroskop erscheinen die beschädigten Zellen, welche vorher mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie Propidium-Iodid eingefärbt worden sind, nun mit einem Schweif aus DNA-Bruchstücken, der ihnen das Aussehen eines Kometen gibt (Abb. 12). Beim Comet Assay können alle Zellen verwendet werden, die einen Zellkern besitzen (Martin R., 1996). Vorteile des Comet-Assay sind hohe Sensitivität, der Nachweis gentoxischer Effekte auch ohne Zellproliferation und die relativ einfache und schnelle Durchführbarkeit.

Zur Versuchsdurchführung wurden die Objektträger zunächst mit High Melting Point Agarose (HMP; 1,5 %) einseitig beschichtet und getrocknet. Danach: Aufwärmen der Low Melting Point Agarose (LMP; 0,5 %) auf 37 °C. Je Testansatz Entnahme von 20 µl Zellsuspension und Vermischen mit 180 µl LMP auf dem Vortexer. Aufbringen von 45 µl dieser Mischung auf die HMP-beschichteten Objektträger und Abdecken mit einem Deckglas (24 x 24 mm). Nach kurzem Abkühlen zur Verfestigung der LMP wird das Deckglas vorsichtig entfernt. Zur alkalischen Lyse der Zellmembran werden die Objektträger für mindestens 1 Stunde bei 4 °C und unter Lichtschutz in eine Küvette mit Lyselösung gestellt. Danach werden die Präparate in der Elektrophorese-Kammer ausgerichtet und mit alkalischem Elektrophorese-Puffer (-20 °C) überschichtet. Die Einwirkzeit unter Lichtschutz zur Trennung der doppelsträngigen DNA und Detektion alkalilabiler Stellen der DNA beträgt 20 Minuten. Beginn der Elektrophorese durch Anlegen des elektrischen Feldes (25 V, 300 mA). Nach exakt



20 Minuten wird die Wanderung der DNA-Fragmente im Agarose-Gel beendet. Vor der Färbung müssen die Präparate für 10 Minuten in Neutralisationspuffer gewaschen werden. Färbung der Objektträger mit 20 µl Propidium-Iodid-Färbelösung [20 µg/ml] und Abdecken mit Deckglas. Bis zur Auswertung werden die Präparate unter Lichtschutz bei 4 °C in der feuchten Kammer gelagert.

Ausgewertet werden in dieser Arbeit je 50 Zellen pro Testansatz (25 Zellen pro Objektträger, keine Randbereiche) bei 200-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Gemessen wird der DNA-Anteil im Kometenschwanz nach Länge und Intensität, also die Menge beschädigter DNA abhängig von der Anzahl erfolgter DNA-Strangbrüche. Die Auswertung kann entweder von Hand oder wie in dieser Arbeit durch spezielle Computerprogramme mit visueller Erfassung erfolgen. Die Interpretation der Ergebnisse muss sowohl gentoxische als auch Apoptose als zelluläre Reaktion auf toxische Effekte in Betracht ziehen.

## 4. Ergebnisse

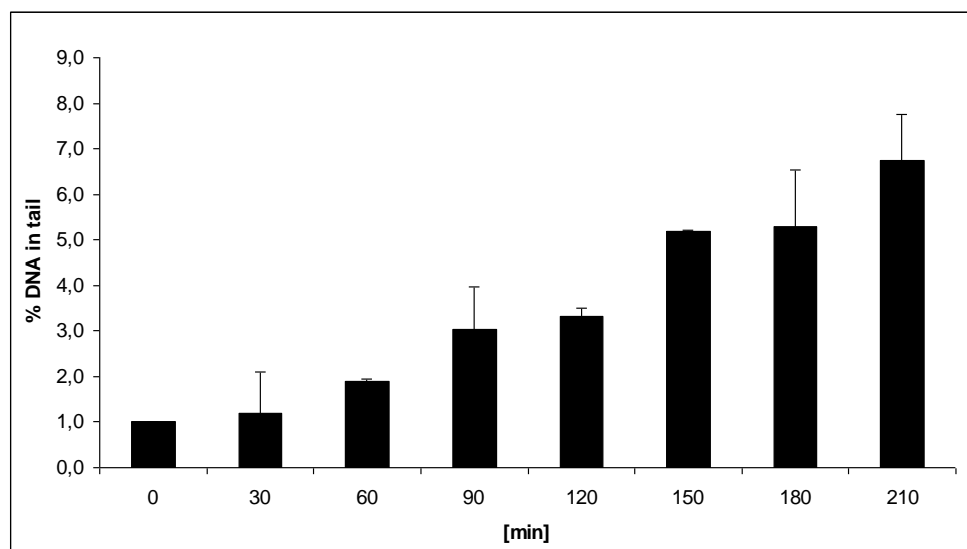
### 4.1. Allgemeines

Im Folgenden sollen die Ergebnisse dargestellt werden, die im Rahmen dieser Doktorarbeit erzielt wurden. Hierfür wurde eine Aufteilung in zwei Teile vorgenommen. Teil 1 befasst sich mit der mechanistischen Untersuchung der Induktion von DNA-Schäden durch Natrium-Arsenit ( $\text{NaAsO}_2$ ) und der Fragestellung, ob der Comet Assay eine geeignete Detektionsmethode für diese Schäden ist. In Teil 2 wurden zwei mögliche Wege für die Entstehung der  $\text{NaAsO}_2$ -induzierten Schäden und potenzielle Inhibitoren dieser Mechanismen eingehender untersucht.

### 4.2. Genotoxizität von Natrium-Arsenit ( $\text{NaAsO}_2$ )

#### 4.2.1. Modellsubstanz Methylmethansulfonat

Methylmethansulfonat (MMS), eine bekanntermaßen genotoxische Substanz, wurde als für die folgenden Experimente geeignete Modellsubstanz identifiziert und in einer Konzentration von  $25 \mu\text{g/ml}$  untersucht. Nach einer Behandlungszeit von 0 bis 210 Minuten war ein Inkubationsdauer-abhängiger Anstieg des prozentualen Anteils von DNA-Fragmenten im Schweif zu erkennen (Abb. 1).



**Abb. 1:** Prozentualer Anteil migrierter DNA-Fragmente in L5178Y-Zellen gemessen im Comet Assay über eine Zeitspanne von 210 min nach Inkubation mit Methylmethansulfonat (MMS) [ $25 \mu\text{g/ml}$ ] normiert auf den Zeitpunkt 0 min. Dargestellt sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente.

Bei detaillierter Aufschlüsselung der auftretenden Schadensklassen (Abb. 2) zeigte sich, dass MMS zwar Strangbrüche der Schadensklassen C0 (% tail DNA  $\leq 5$  %, kein Schaden) und C1 ( $5\% < \text{ % tail DNA} \leq 60$  %, mittlerer Schaden) induzierte, dies auch schon nach kurzen Inkubationszeiten. Kerne, die in die Schadensklasse C2 (% tail DNA  $> 60$  %, Zellen mit kaum oder nicht mehr erkennbarem Kopf und großen diffusen Schweifen) einzuordnen gewesen wären, waren jedoch nicht zu detektieren (Abb. 2.1 bis 2.8).

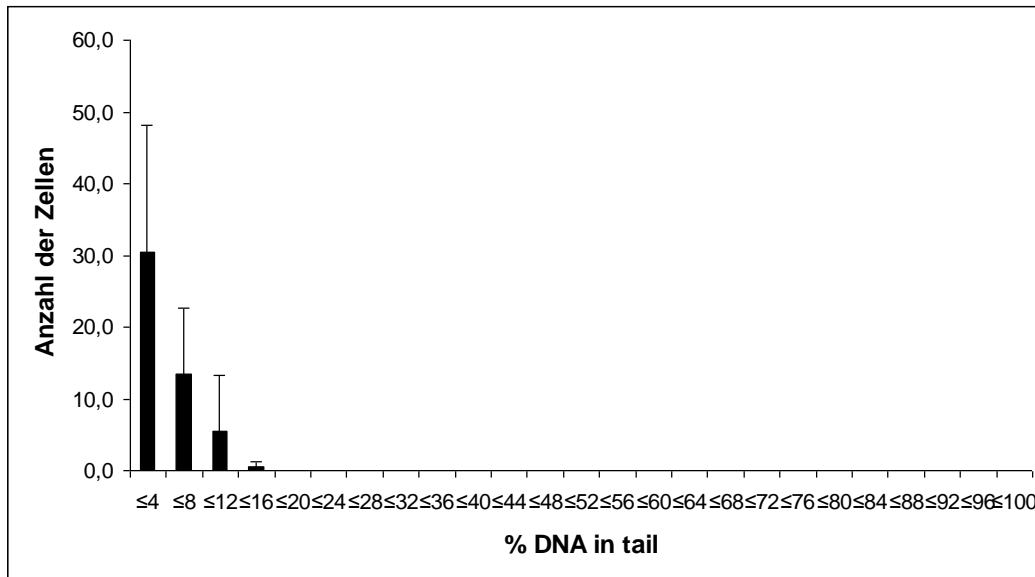


Abb. 2.1

0 min

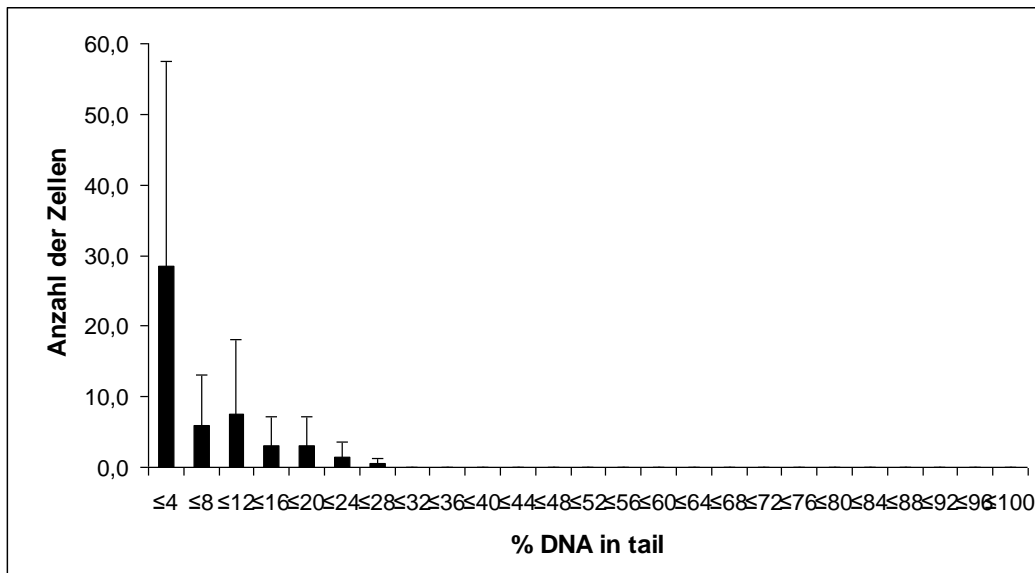


Abb. 2.2

30 min

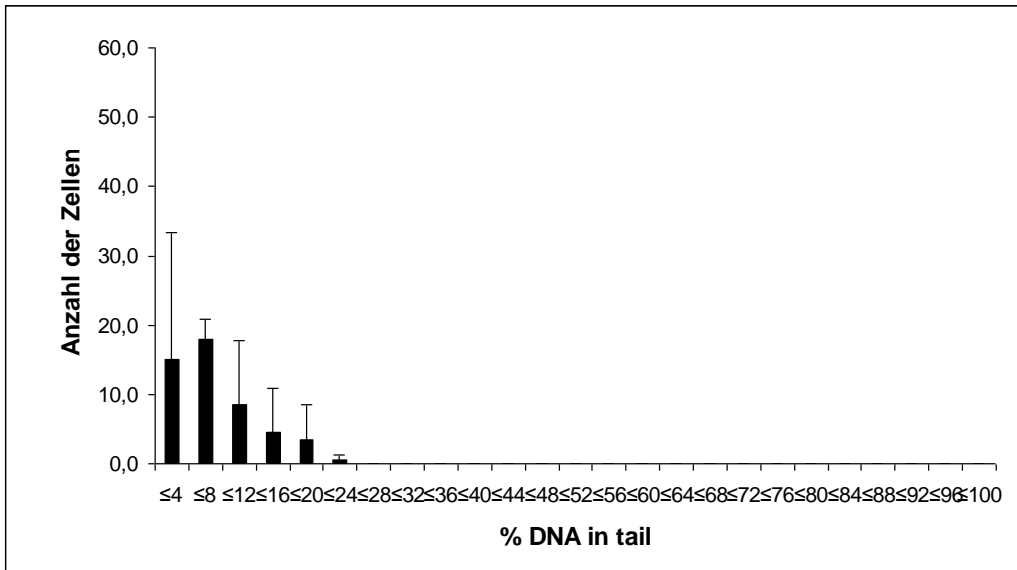


Abb. 2.3

60 min

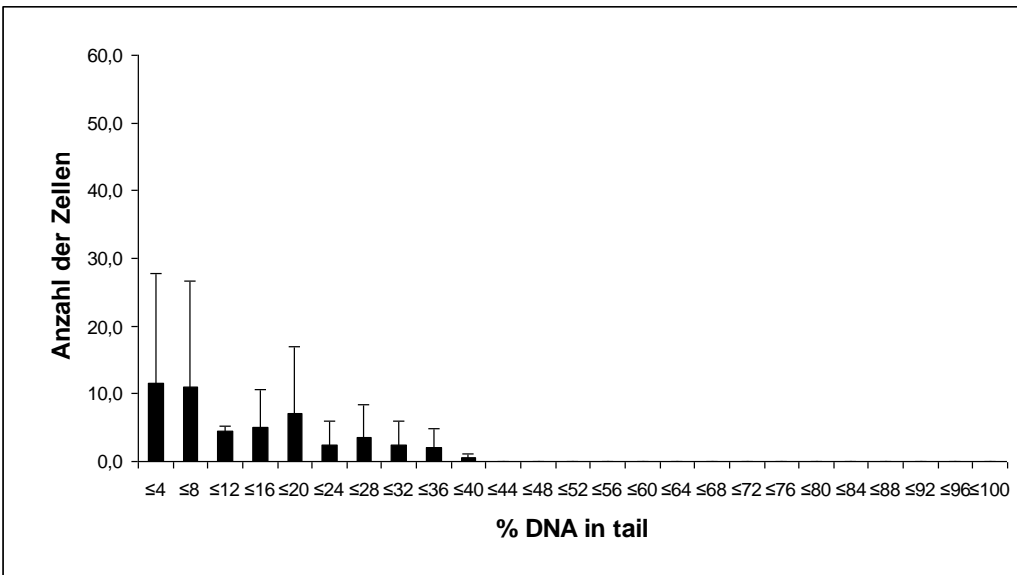
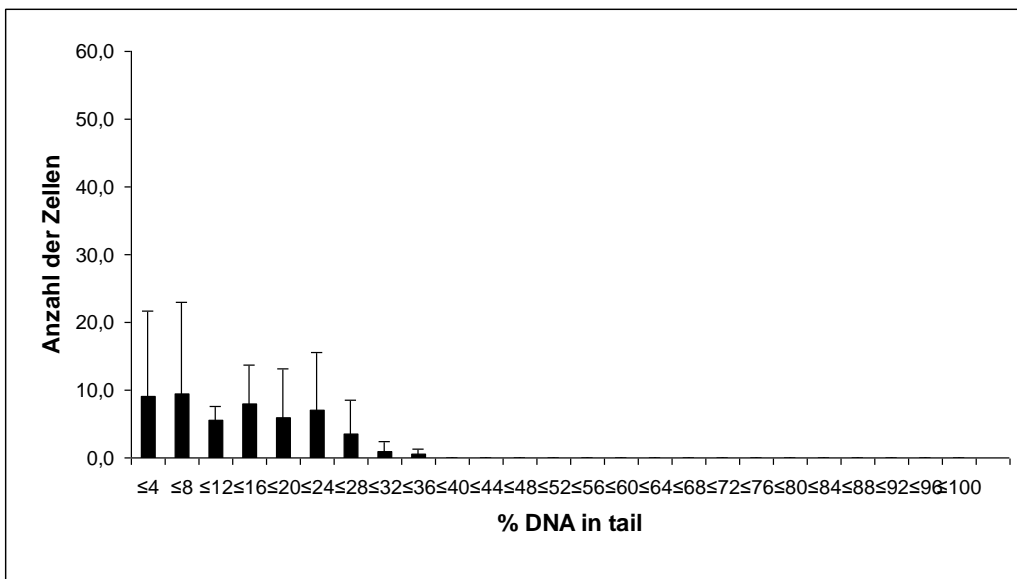


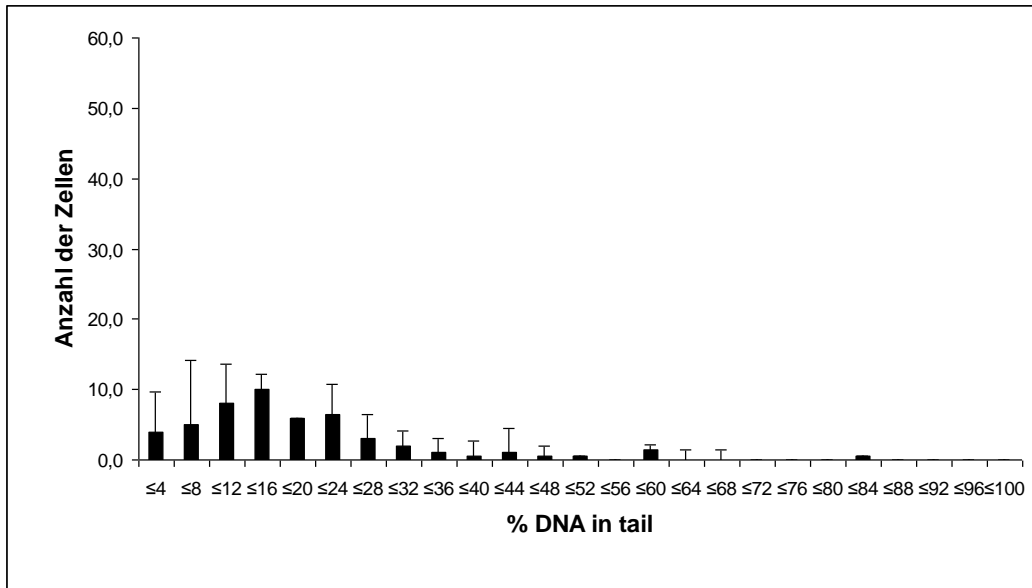
Abb. 2.4

90 min



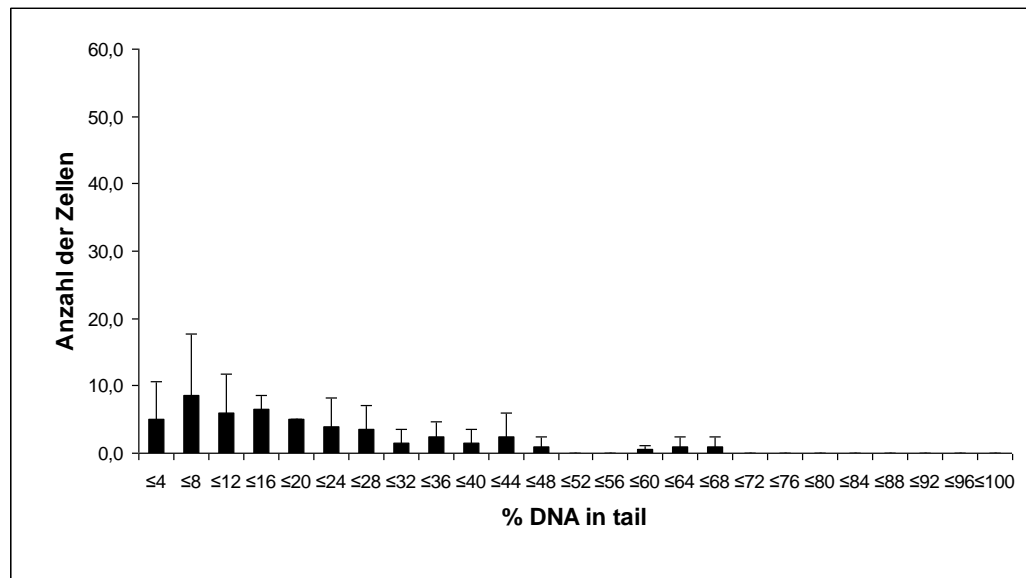
2.5

120 min



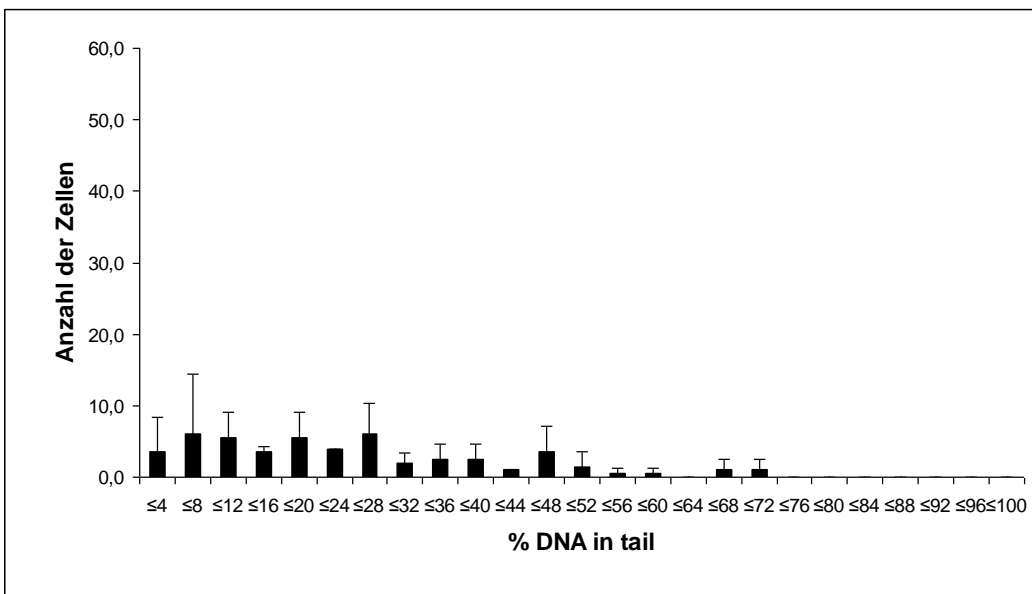
2.6

180 min



2.7

150 min

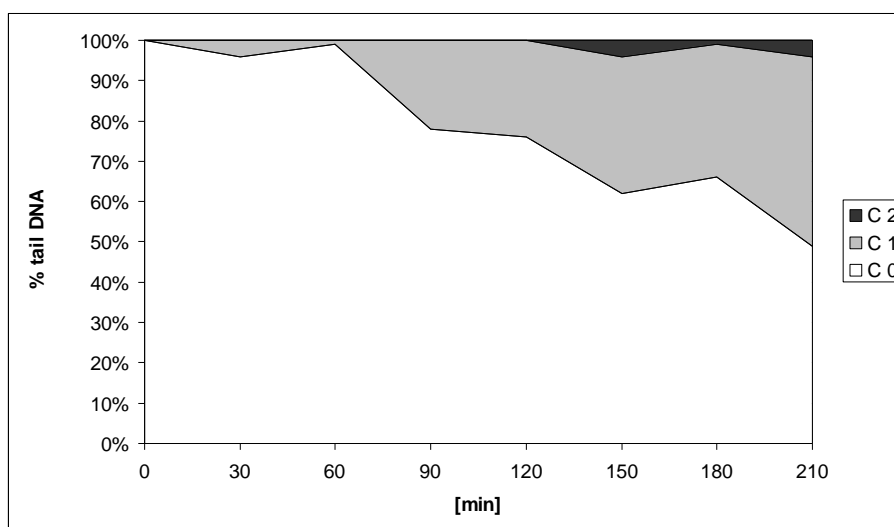


2.8

210 min

**Abb. 2:** Verteilung des prozentualen Anteils migrierter DNA im Comet Assay zu verschiedenen Zeitpunkten (0 min bis 210 min) in L5178Y-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente. Einteilung: C0-Zellen mit % tail DNA  $\leq 5\%$  (kein Schaden); C1-Zellen mit  $5\% < \text{% tail DNA} \leq 60\%$  (mittlerer Schaden); C2-Zellen  $\text{% tail DNA} > 60\%$  (Zellen mit kaum oder nicht mehr erkennbarem Kopf und großen diffusen Schweifen).

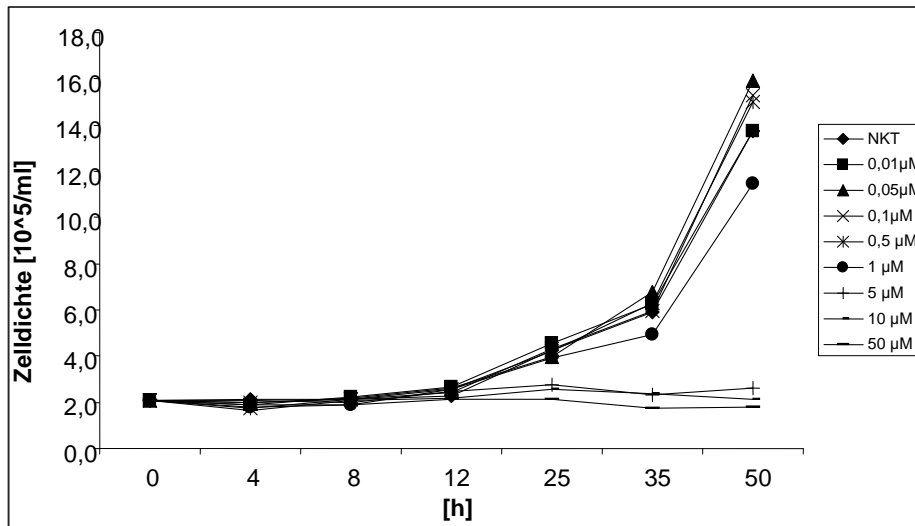
Dies kommt in der folgenden Darstellung nochmals besonders deutlich zum Ausdruck (Abb. 3): Der prozentuale Anteil der C0-Zellen nahm mit steigender Behandlungsdauer ab, während der Anteil der C1-Zellen stetig zunahm. C2-Zellen tauchten kaum auf und wenn, dann erst bei den längsten Behandlungszeiten.



**Abb. 3:** Prozentualer Anteil der Schadensklassen C0 bis C2 in L5178Y-Zellen nach Inkubation mit MMS [25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] in Abhängigkeit von der Inkubationszeit [min]. Einteilung: C0-Zellen mit % tail DNA  $\leq 5\%$  (kein Schaden); C1-Zellen mit  $5\% < \text{% tail DNA} \leq 60\%$  (mittlerer Schaden); C2-Zellen  $\text{% tail DNA} > 60\%$  (Zellen mit kaum oder nicht mehr erkennbarem Kopf und großen diffusen Schweifen).

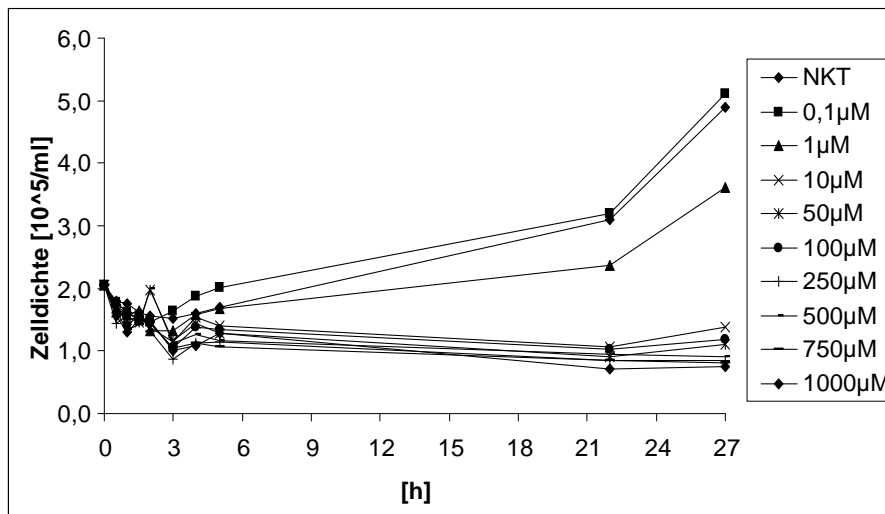
#### 4.2.2. NaAsO<sub>2</sub>

Im Folgenden wurde Natrium-Arsenit (NaAsO<sub>2</sub>) im Hinblick auf seine Zytotoxizität untersucht. Hierzu wurde nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen NaAsO<sub>2</sub> (0,01 bis 50  $\mu\text{M}$ ; NKT = Negativkontrolle PBS) die Proliferation über einen Zeitraum von 50 h bestimmt (Abb. 4). Wie deutlich zu erkennen ist, war ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  NaAsO<sub>2</sub>, ab einer Inkubationsdauer von 12 h eine deutliche Proliferationsinhibierung vorhanden.



**Abb. 4:** Proliferation [ $10^5$  Zellen/ml] von L5178Y-Zellen während der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen  $\text{NaAsO}_2$  (0,01 bis 50  $\mu\text{M}$ ) über einen Zeitraum von 50 h

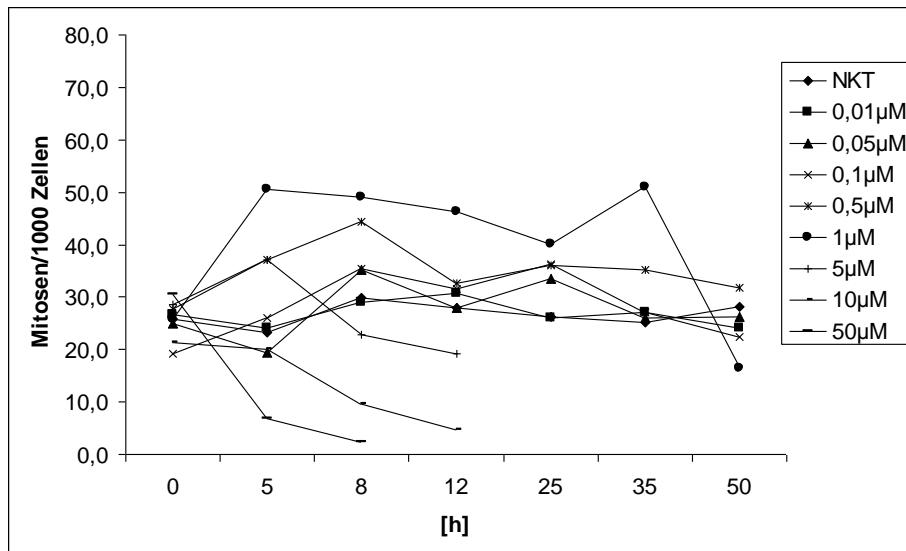
Versuche mit  $\text{NaAsO}_2$ -Konzentrationen bis 1000  $\mu\text{M}$  über einen etwas kürzeren Zeitraum von 27 h brachten ähnliche Ergebnisse. Die Proliferation war ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  nicht nur inhibiert, es war sogar schon ein zytotoxischer Effekt erkennbar (Abb. 5). Im Folgenden wurde deshalb mit den niedrigeren Konzentrationen und den längeren Inkubationszeiten weitergearbeitet.



**Abb. 5:** Proliferation [ $10^5$  Zellen/ml] von L5178Y-Zellen während der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen  $\text{NaAsO}_2$  (0,1 bis 1000  $\mu\text{M}$ ) über einen Zeitraum von 27 h.

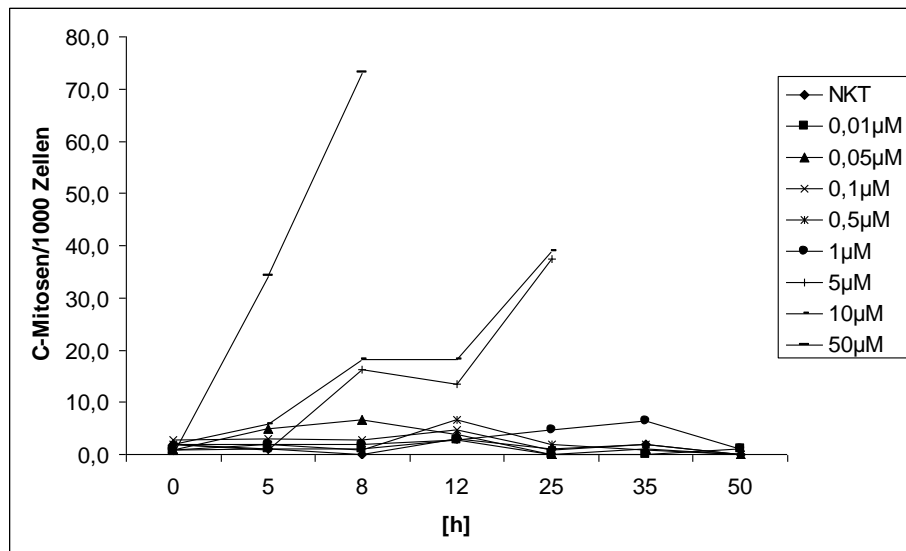
Außer der Proliferation unter  $\text{NaAsO}_2$ -Behandlung wurde noch dessen Wirkung auf die Anzahl der ungestört erscheinenden Mitosen, der C-Mitosen (gestörte Mitosemorphologien), der Mitosen gesamt (ungestört erscheinenden Mitosen und C-Mitosen), der Apoptosen und der Anzahl der Mikrokerne jeweils pro 1000 Zellen bestimmt (Abb. 6). Ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  war die Zytotoxizität so hoch,

dass die Präparate der späteren Zeitpunkte im Hinblick auf die Anzahl der Mitosen gar nicht mehr ausgewertet werden konnten (Abb. 6).



**Abb. 6:** Anzahl von ungestört erscheinenden Mitosen pro 1000 Zellen in L5178Y-Zellen nach Inkubation mit 0,01 bis 50  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  über einen Zeitraum von 50 h. NKT = Negativkontrolle PBS

Ebenfalls ab der Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  war erkennbar, dass die Zahl der C-Mitosen, das heißt die Zahl der deformierten Mitosen, stark zunahm, bevor die Präparate der späteren Zeitpunkte ebenfalls nicht mehr ausgewertet werden konnten (Abb. 7).

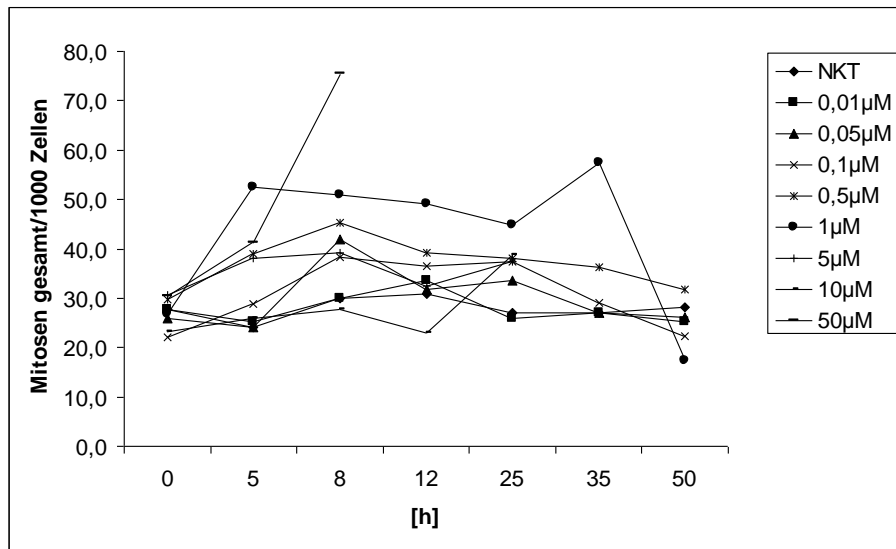


**Abb. 7:** Anzahl von C-Mitosen pro 1000 Zellen in L5178Y-Zellen nach Inkubation mit 0,01 bis 50  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  über einen Zeitraum von 50 h. NKT = Negativkontrolle PBS

Bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  überwiegt der Mitose-Arrest, ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  hingegen werden vermehrt C-Mitosen gebildet. Bei den dazwischenliegenden Konzentrationen von z. B. 5 und 10  $\mu\text{M}$  ist teils eine Reduktion

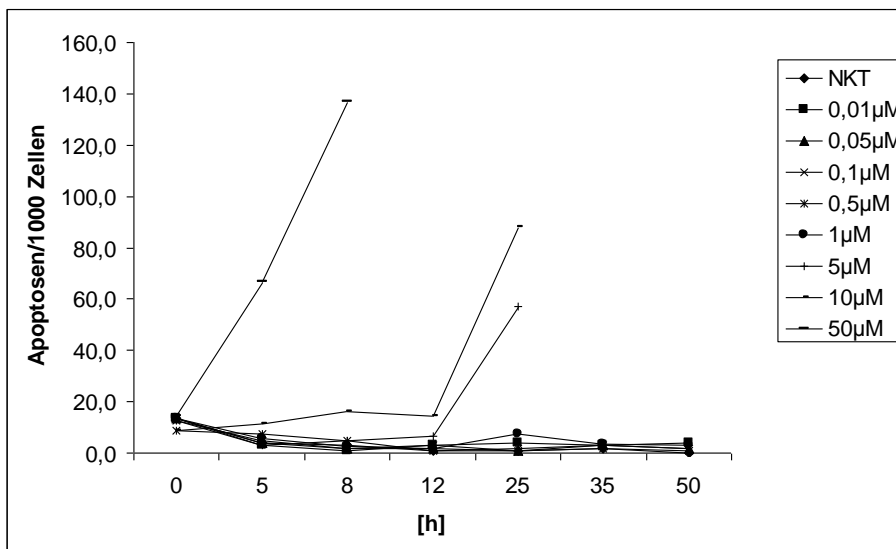


der ungestörten Mitosen, teils eine Erhöhung der deformierten Mitosen zu beobachten. (Abb. 8).

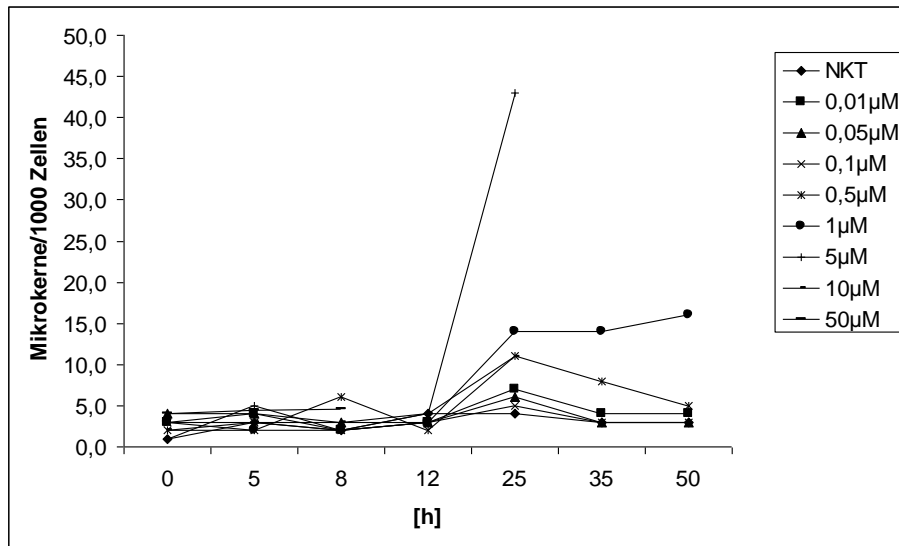


**Abb. 8:** Anzahl von Mitosen gesamt ( $\Sigma$  = Mitosen + C-Mitosen) pro 1000 Zellen in L5178Y-Zellen nach Inkubation mit 0,01 bis 50  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  über einen Zeitraum von 50 h. NKT = Negativkontrolle PBS

Die Zahl der Apoptosen wurde durch die  $\text{NaAsO}_2$ -Konzentrationen 5, 10 und 50  $\mu\text{M}$  merklich induziert (Abb. 9), während die Mikrokernraten auch durch die niedrigen Konzentrationen zunahmen, hier allerdings erst ab einer Inkubationsdauer von 12 h (Abb. 10).

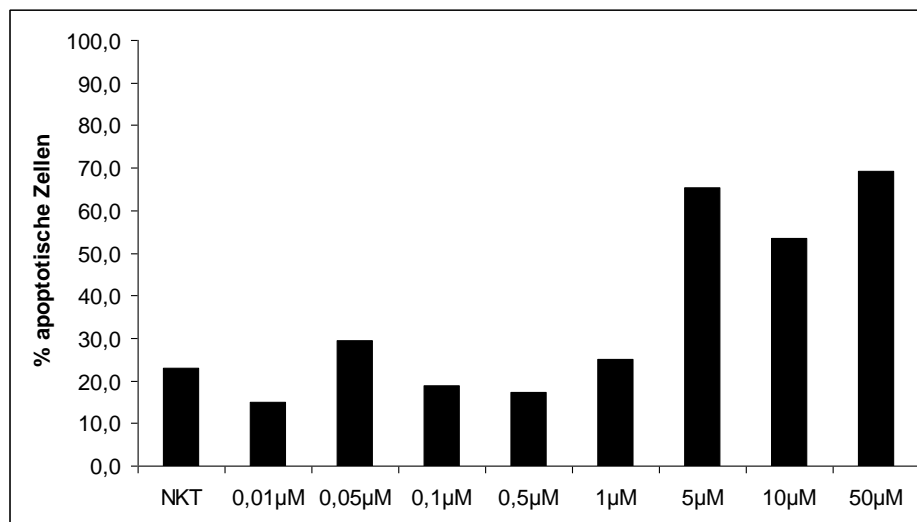


**Abb. 9:** Anzahl Apoptosen pro 1000 Zellen in L5178Y-Zellen nach Inkubation mit 0,01 bis 50  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  über einen Zeitraum von 50 h. NKT = Negativkontrolle PBS



**Abb. 10:** Anzahl von Mikrokerneln pro 1000 Zellen in L5178Y-Zellen nach Inkubation mit 0,01 bis 50 µM NaAsO<sub>2</sub> über einen Zeitraum von 50 h. NKT = Negativkontrolle PBS

Des Weiteren wurde die Zahl der Apoptosen nach 25 h (Abb. 11.1), 35 h (Abb. 11.2), und 50 h (Abb. 11.3) parallel am Durchflusszytometer bestimmt. Durch diese Messung konnte gezeigt werden, dass mit steigender Konzentration und Inkubationsdauer die Zahl der NaAsO<sub>2</sub>-induzierten Apoptosen deutlich zunahm. Nach 50 h lag sie bei den höheren Konzentrationen bei annähernd 100 % (Abb. 11.1).



**Abb. 11.1**

25 h

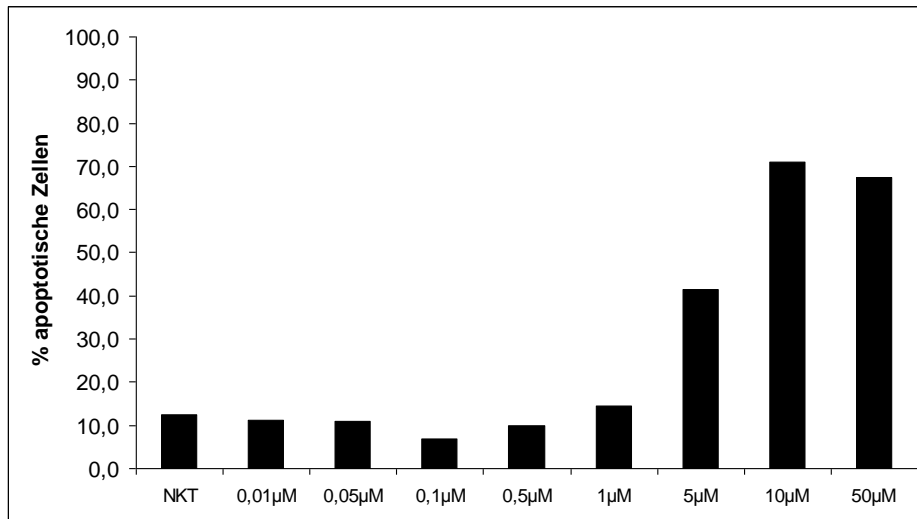


Abb. 11.2

35 h

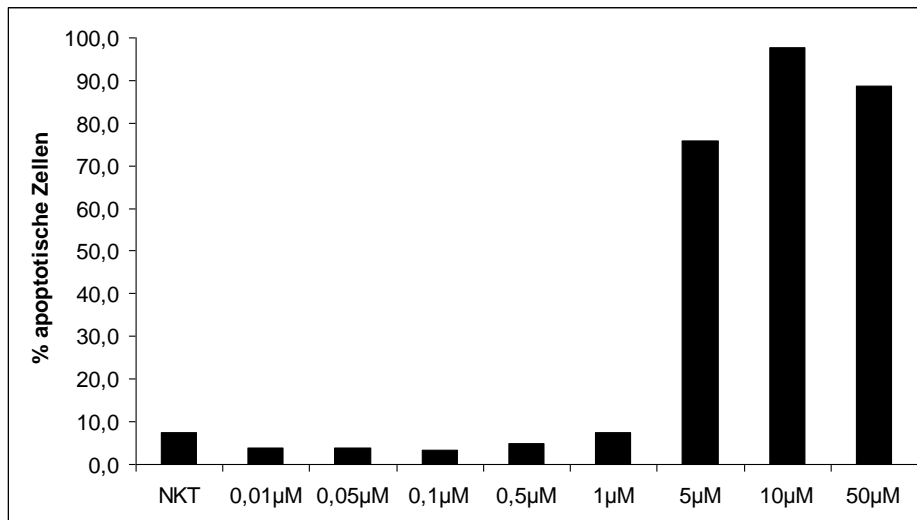
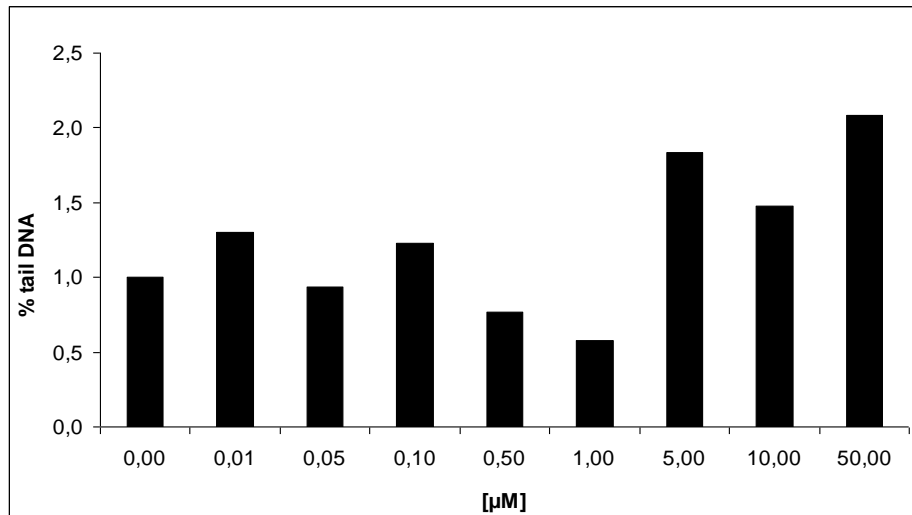


Abb. 11.3

50 h

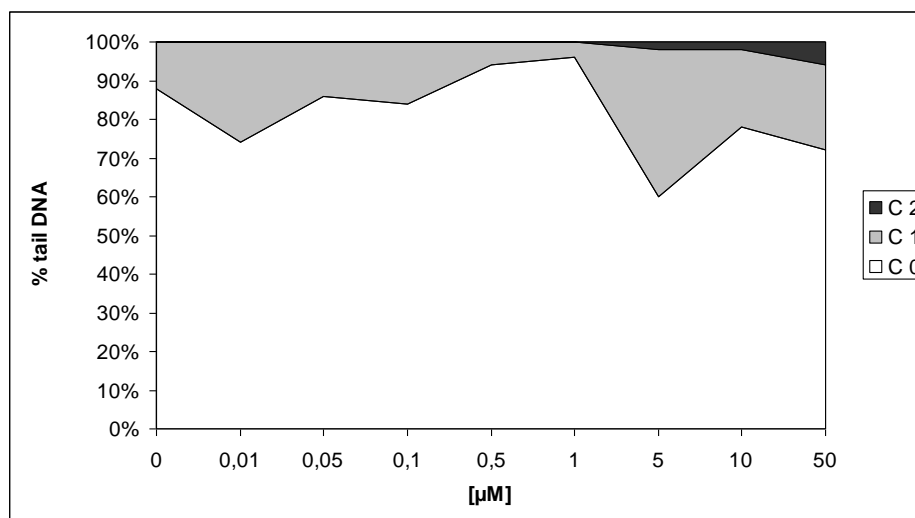
**Abb. 11:** Prozentualer Anteil apoptotischer Zellen in L5178Y nach Inkubation mit unterschiedlichen  $\text{NaAsO}_2$ -Konzentrationen (0,01 bis 50  $\mu\text{M}$ ) gemessen am Durchflusszytometer nach 25, 35 und 50 h. NKT = Negativkontrolle PBS

Mit Hilfe des Comet Assay wurde die Induktion von DNA-Strangbrüchen gemessen, die durch  $\text{NaAsO}_2$  verursacht wurden (Abb. 12). Nach der Inkubationszeit von 4 h gab es einen deutlichen Anstieg der migrierten DNA erst ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$ .



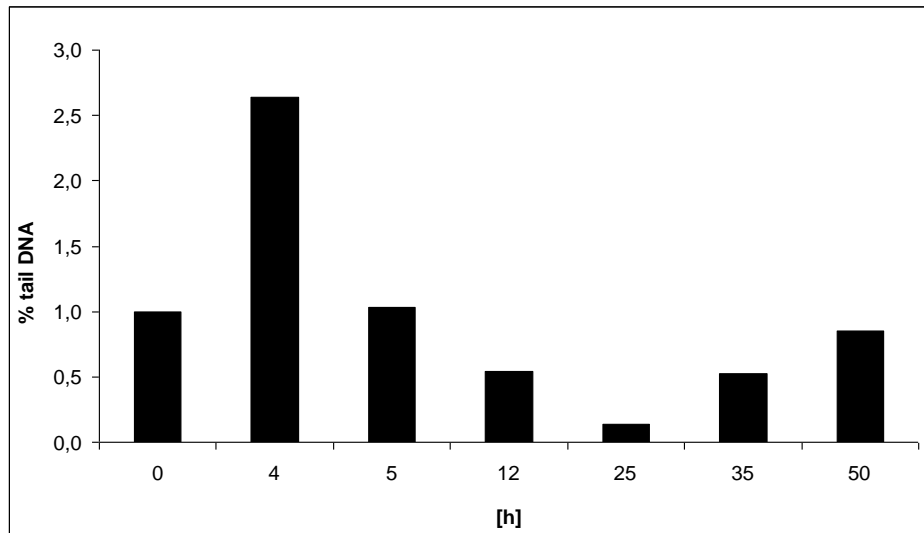
**Abb. 12:** Prozentualer Anteil an migrierter DNA in L5178Y-Zellen gemessen im Comet Assay nach Inkubation mit verschiedenen NaAsO<sub>2</sub>-Konzentrationen (0,01 bis 50 µM) für 4 h relativ zur unbehandelten Kontrolle.

Die Auftragung des prozentualen Anteils der einzelnen Schadensklassen zeigt, dass erst bei den höchsten Konzentrationen eine deutliche Zunahme der Klasse C1 ersichtlich war, einige wenige Kerne waren beginnend mit der Konzentration 5 µM dann auch schon in die Klasse C2 einzuordnen (Abb. 13).



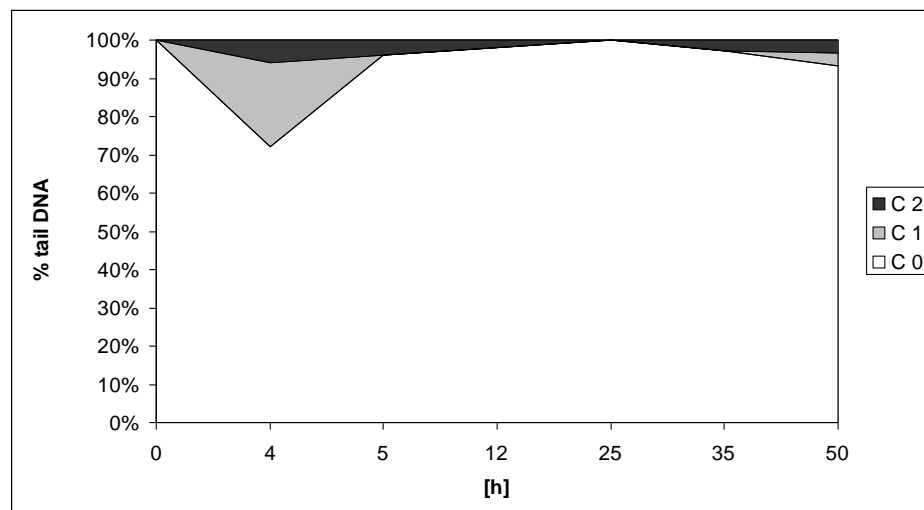
**Abb. 13:** Prozentualer Anteil an C0-, C1- und C2-Zellen in L5178Y gemessen im Comet Assay nach Inkubation mit verschiedenen NaAsO<sub>2</sub>-Konzentrationen (0,01 bis 50 µM) für 4 h. Einteilung: C0-Zellen mit % tail DNA ≤ 5 % (kein Schaden); C1-Zellen mit % tail DNA 5 % < % tail DNA ≤ 60 % (mittlerer Schaden); C2-Zellen % tail DNA > 60 % (Zellen mit kaum oder nicht mehr erkennbarem Kopf und großen diffusen Schweifen).

Die Effekte der höchsten dort getesteten Konzentration von 50 µM wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht (Abb. 14). Hier war nach einer Zeit von 4 Stunden der prozentuale DNA Schaden auf mehr als das 2,5-fache erhöht, die folgenden Zeitpunkte lagen dann allerdings wieder auf Kontrollniveau oder sogar darunter.



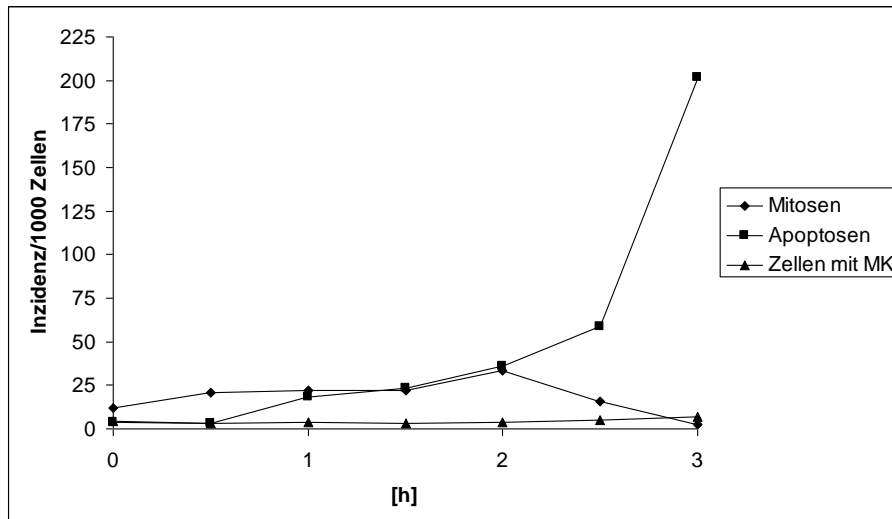
**Abb. 14:** Prozentualer Anteil an migrierter DNA in L5178Y-Zellen nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  über einen Zeitraum von 50 h relativ zur unbehandelten Kontrolle.

Wie aus der Auftragung der Anteile der Schadensklassen erkennbar, waren sowohl C1 und C2 ebenfalls nach einer Inkubationszeit von 4 h am stärksten vertreten. Mit zunehmender Inkubationsdauer nahm der prozentuale Anteil von C1 und C2 dann wieder ab (Abb. 15).



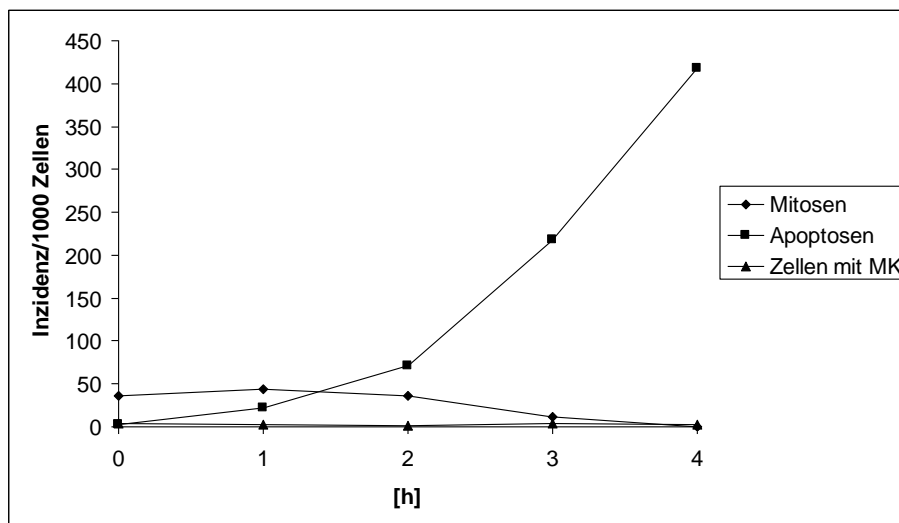
**Abb. 15:** Prozentualer Anteil an C0-, C1- und C2-Zellen in L5178Y nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  über einen Zeitraum von 50 h. Einteilung: C0-Zellen mit % tail DNA  $\leq 5$  % (kein Schaden); C1-Zellen mit % tail DNA  $5 < \text{tail DNA} \leq 60$  % (mittlerer Schaden); C2-Zellen % tail DNA  $> 60$  % (Zellen mit kaum oder nicht mehr erkennbarem Kopf und großen diffusen Schweifen).

Um im Comet Assay deutlichere Effekte zu erzielen, wurde mit der höheren Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  über einen Inkubationszeitraum von 3 h die Effekte von  $\text{NaAsO}_2$  auf die Mitosen-, Apoptosen- und Mikrokernfrequenz beobachtet (Abb. 16). Während die Mitose- und die Mikrokernrate weitgehend unbeeinflusst blieben, war bereits nach 2 h ein deutlicher Anstieg der apoptotischen Zellen erkennbar.



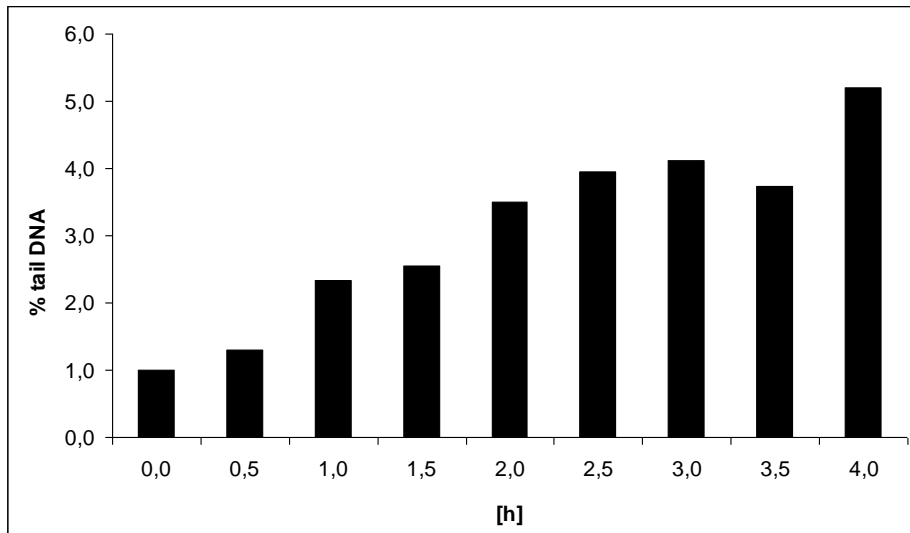
**Abb. 16:** Inzidenz von Mitosen, Apoptosen und mikrokernhaltigen L5178Y-Zellen pro 1000 insgesamt ausgezählten Zellen nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  untersucht am Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 3 h.

Auch nach der Verlängerung der Inkubationsdauer auf 4 h war ersichtlich, dass weder Mitose- noch Mikrokernfrequenz erhöht wurden, wohl aber die der apoptotischen Zellen (Abb. 17). Alle Proben, die später als 4 h genommen wurden, waren aufgrund des lysierten Zellbildes mikroskopisch nicht mehr auswertbar.



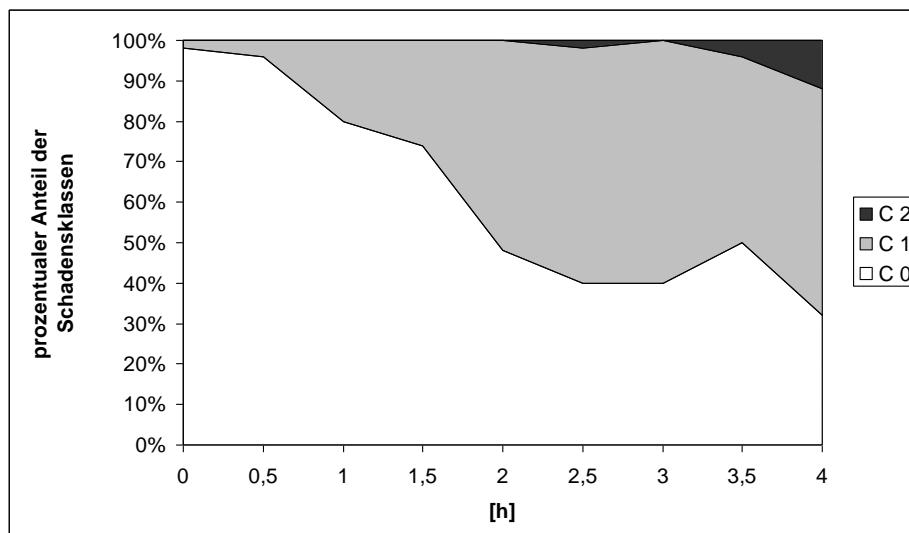
**Abb. 17:** Inzidenz von Mitosen, Apoptosen und mikrokernhaltigen L5178Y-Zellen pro 1000 insgesamt ausgezählten Zellen nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  untersucht am Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 4 h.

Bei der Auswertung der mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  inkubierten Zellen im Comet Assay konnte ein zeitabhängiger Anstieg der detektierten Strangbrüche beobachtet werden (Abb. 18).



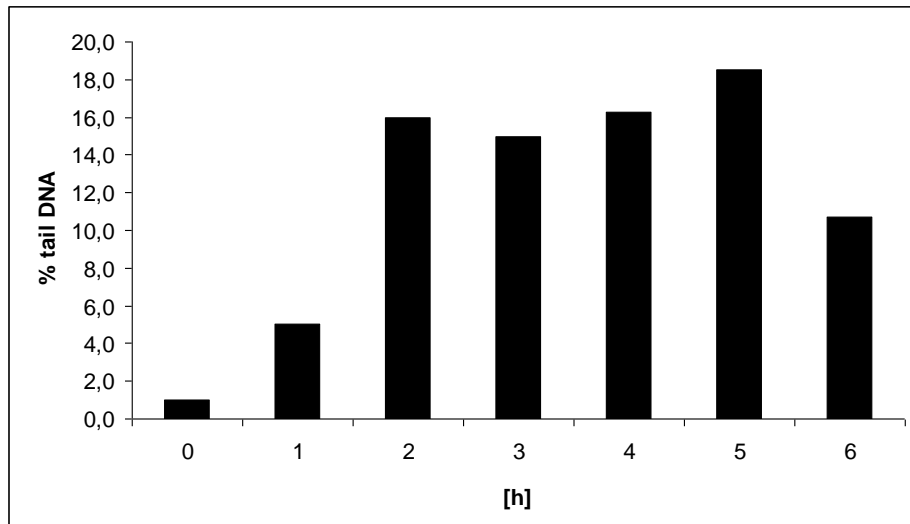
**Abb. 18:** Prozentualer Anteil der migrierten DNA in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [h] in L5178Y-Zellen nach Behandlung mit 100 µM NaAsO<sub>2</sub> gemessen im Comet Assay.

Die genaue Aufschlüsselung der zu den Messzeitpunkten auftretenden Schadensklassen zeigte, dass nach 4 h zwar ebenfalls zeitabhängig die zu Schadensklasse C1 gehörigen Zellkerne zugenommen hatten, Schadensklasse C2 jedoch kaum vorhanden war (Abb. 19).



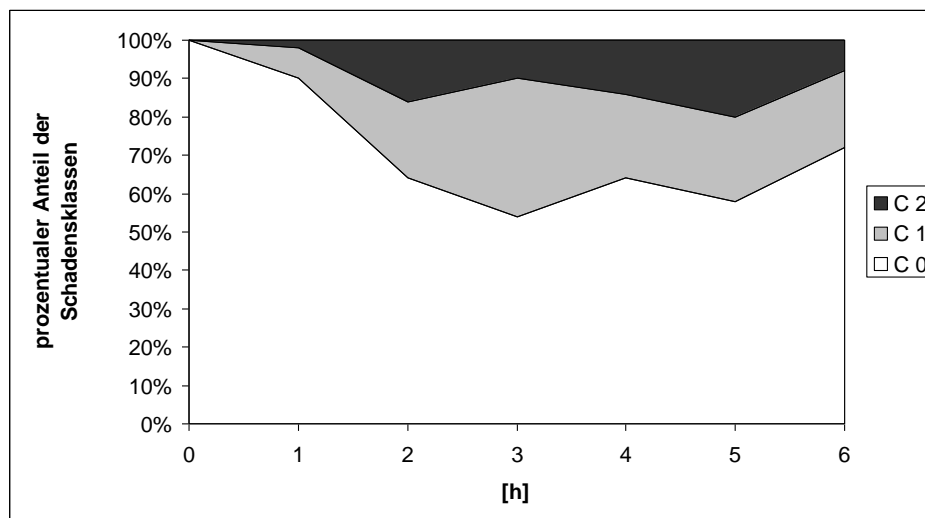
**Abb. 19:** Prozentualer Anteil an C0-, C1- und C2-Zellen in L5178Y nach Inkubation mit 100 µM NaAsO<sub>2</sub> über einen Zeitraum von 4 h. Einteilung: C0-Zellen mit % tail DNA ≤ 5 % (kein Schaden); C1-Zellen mit 5 % < % tail DNA ≤ 60 % (mittlerer Schaden); C2-Zellen % tail DNA > 60 % (Zellen mit kaum oder nicht mehr erkennbarem Kopf und großen diffusen Schweifen).

Die folgende Erhöhung der Inkubationsdauer mit NaAsO<sub>2</sub> auf 6 h zeigte einen fast zeitproportionalen Anstieg der Strangbrüche während der ersten 5 h, nach 6 h waren dann wieder weniger Strangbrüche detektierbar (Abb. 20).



**Abb. 20:** Prozentualer Anteil der migrierten DNA in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [h] in L5178Y-Zellen nach Behandlung mit 100 µM NaAsO<sub>2</sub> gemessen im Comet Assay relativ zur unbehandelten Kontrolle.

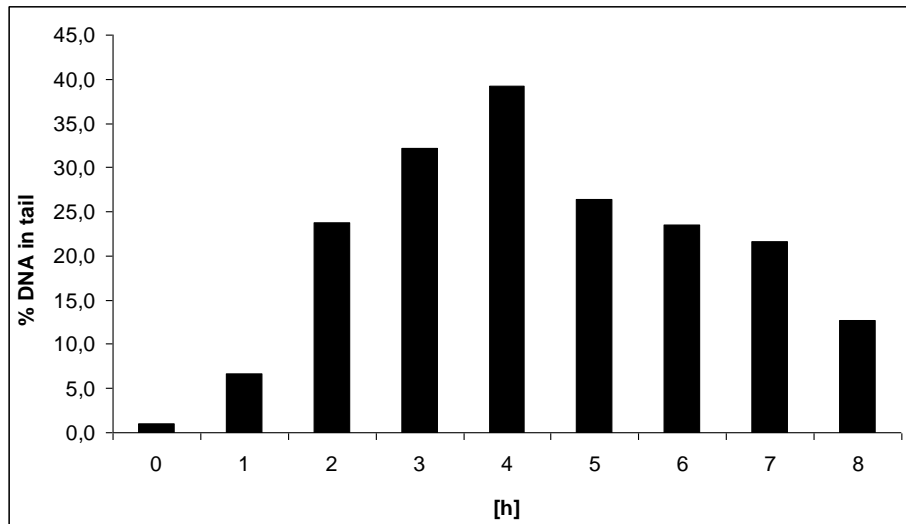
Aus der Verteilung der Schadensklassen in Abhängigkeit von der Zeit war ersichtlich, dass sowohl der Anteil der Zellkerne in Schadensklasse C1 als auch der Anteil in Schadensklasse C2 nach 5 h wieder deutlich zurückging (Abb. 21).



**Abb. 21:** Prozentualer Anteil an C0-, C1- und C2-Zellen in L5178Y nach Inkubation mit 100 µM NaAsO<sub>2</sub> über einen Zeitraum von 6 h. Einteilung: C0-Zellen mit % tail DNA ≤ 5 % (kein Schaden); C1-Zellen mit 5 % < % tail DNA ≤ 60 % (mittlerer Schaden); C2-Zellen % tail DNA > 60 % (Zellen mit kaum oder nicht mehr erkennbarem Kopf und großen diffusen Schweifen).

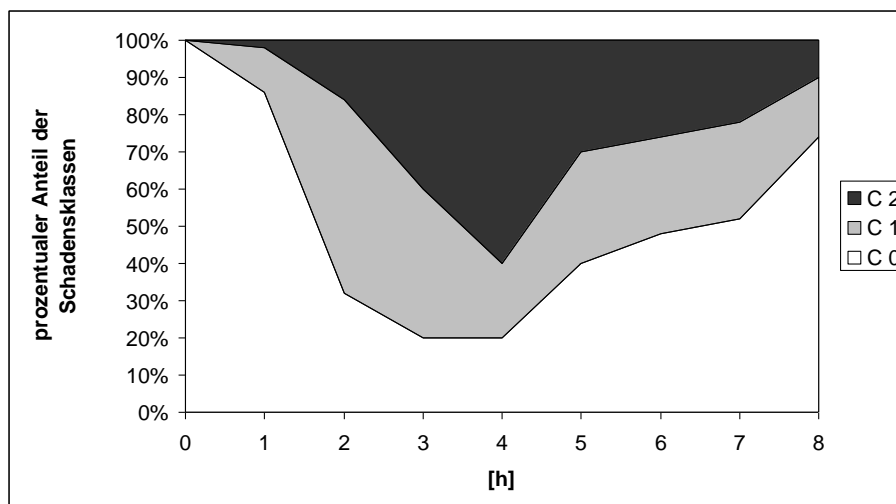
Dieser Effekt trat noch deutlicher zu Tage, als NaAsO<sub>2</sub> für 8 h inkubiert wurde. Ab einer Behandlungsdauer von 5 h war auch hier ein Rückgang der nachweisbaren DNA-Strangbrüche zu beobachten (Abb. 22).





**Abb. 22:** Prozentualer Anteil der migrierten DNA in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer [h] in L5178Y-Zellen nach Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  gemessen im Comet Assay relativ zur unbehandelten Kontrolle.

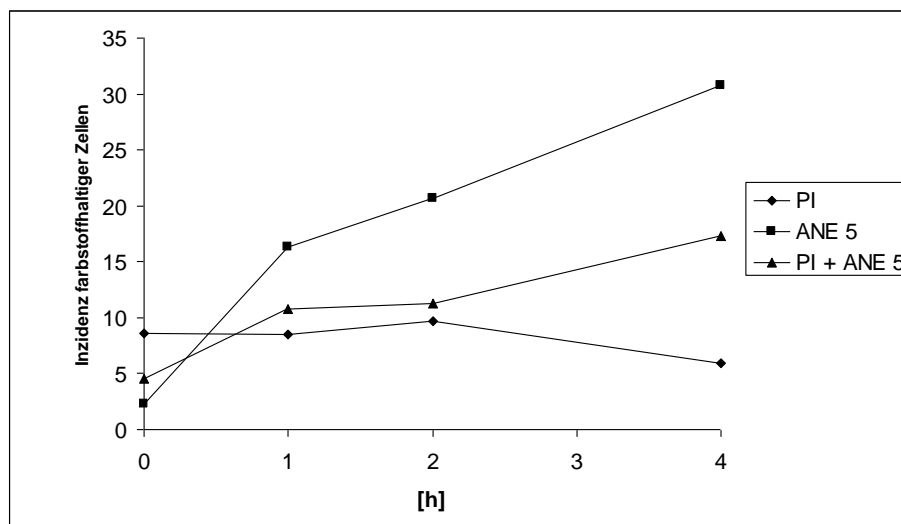
Wurden die prozentualen Anteile der Schadensklassen gegen die Inkubationszeit aufgetragen, war klar erkennbar, dass bereits nach 4 h die Anzahl der Zellkerne in C2 deutlich zurückging; in der Schadensklasse C1 war der Rückgang zuerst weniger deutlich, wurde mit steigender Inkubationsdauer aber immer klarer erkennbar (Abb. 23).



**Abb. 23:** Prozentualer Anteil an C0-, C1- und C2-Zellen in L5178Y nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  über einen Zeitraum von 8 h. Einteilung: C0-Zellen mit % tail DNA  $\leq 5\%$  (kein Schaden); C1-Zellen mit % tail DNA  $5\% < \text{tail DNA} \leq 60\%$  (mittlerer Schaden); C2-Zellen % tail DNA  $> 60\%$  (Zellen mit kaum oder nicht mehr erkennbarem Kopf und großen diffusen Schweifen).

Parallel im Durchflusszytometer durchgeführte Messungen zeigten, dass eine 4-stündige Inkubation mit  $\text{NaAsO}_2$  keine Auswirkung auf die Anzahl der PI-positiven Zellen hatte, das heißt, Zytotoxizität konnte ausgeschlossen werden. Nach 2 h war ein leichter Anstieg der PI-/Annexin-5-positiven Zellen erkennbar. Dies bedeutet,

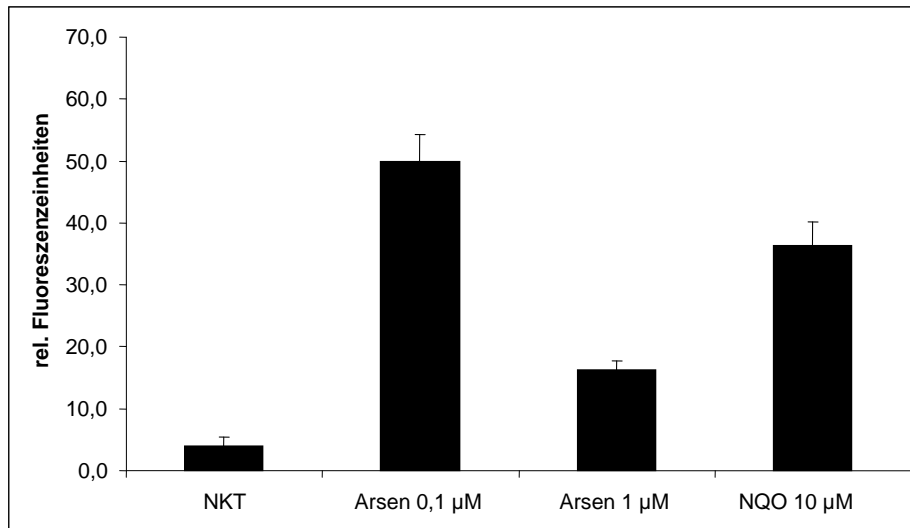
dass bereits späte Apoptosen und/oder Nekrosen vorhanden waren, da sich nur diese doppelt anfärben lassen. Am deutlichsten war der Effekt der Inkubation mit  $\text{NaAsO}_2$  im Hinblick auf die Zahl der Annexin-5-positiven Zellen, also die Zahl der frühen Apoptosen. Diese stieg bereits nach einer 1-stündigen Behandlung stark an, ein Trend, der sich im weiteren Verlauf fortsetzte (Abb. 24).



**Abb. 24:** Inzidenz PI-positiver, Annexin-5-positiver und PI-/Annexin-5-positiver L5178Y-Zellen nach Inkubation mit  $100 \mu\text{M NaAsO}_2$  im Zeitverlauf über 4 h gemessen am Durchflusszytometer.

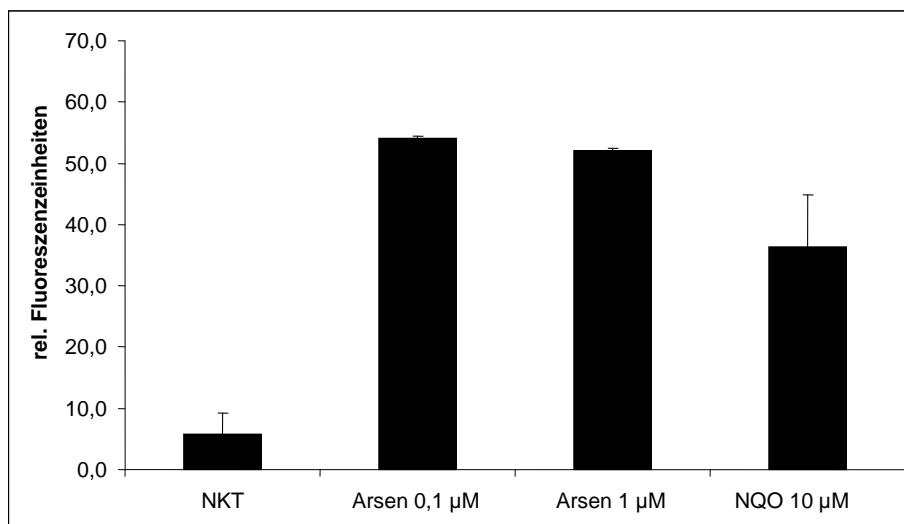
Nachdem nun deutlich geworden war, dass  $\text{NaAsO}_2$  DNA-Schäden verursacht, resultierend zum Beispiel in Einzel- und Doppelstrangbrüchen (nachweisbar im Comet Assay) sowie genomischen Aberrationen (nachweisbar im Micronucleus-Test), wurden als Mechanismen für die Entstehung dieser Schäden zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen: erstens oxidativer Stress durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, zweitens epigenetische Veränderung der DNA durch Methylierung bzw. Demethylierung von Basen.

Nach 30-minütiger Inkubation mit verschiedenen  $\text{NaAsO}_2$ -Konzentrationen und  $10 \mu\text{M}$  4-Nitrochinolin-1-Oxid (NQO) als Positivkontrolle war zu erkennen, dass bereits eine Konzentration von  $0,1 \mu\text{M}$  eine ca. 10-fache Erhöhung der durch ROS entstehenden Fluoreszenz von 2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat zur Folge hatte. Die höhere Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  schien weniger oxidativen Stress zu verursachen, was aber vermutlich an der in diesem Konzentrationsbereich beginnenden Zytotoxizität liegt (Abb. 25).



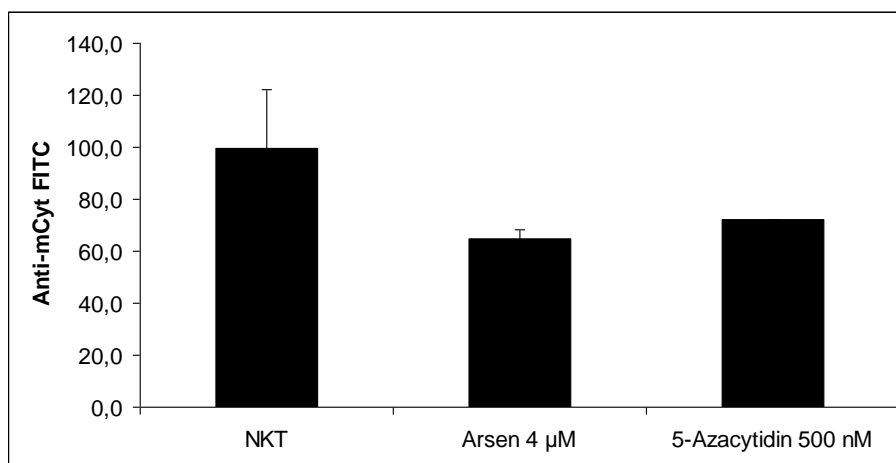
**Abb. 25:** Zunahme der ROS-induzierten Fluoreszenz von 2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat durch Inkubation mit 0,1 µM und 1 µM NaAsO<sub>2</sub> nach 30 min in L5178Y-Zellen gemessen am Durchflusszytometer. NKT = Negativkontrolle PBS. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Einzelversuchen.

Parallel wurden zum Vergleich humane Leukämie-Zellen (HL60) mit den gleichen NaAsO<sub>2</sub>-Konzentrationen ebenfalls über 30 min inkubiert, da in dieser Zelllinie die Messung von oxidativem Stress und die verwendete Positivkontrolle 10 µM NQO schon etabliert war. Auch hier zeigte sich nach Behandlung mit NaAsO<sub>2</sub> eine ca. 10-fach stärkere Fluoreszenz; die Konzentration 1 µM zeigte wiederum eine leichte Abnahme, die auf eine beginnende Zytotoxizität zurückzuführen sein könnte (Abb. 26).



**Abb. 26:** Zunahme der ROS-induzierten Fluoreszenz von 2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat durch Inkubation mit 0,1 µM und 1 µM NaAsO<sub>2</sub> nach 30 min in HL60-Zellen gemessen am Durchflusszytometer. NKT = Negativkontrolle PBS. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Einzelversuchen.

Der Methylierungsstatus wurde nach einer 72-stündigen Behandlungszeit gemessen, da derartige Veränderungen der DNA meist erst nach längeren Inkubationszeiten beobachtet werden können. Als Positivkontrolle wurde 500 nM-5-Azacytidin verwendet, das bekanntermaßen eine Hypomethylierung verursacht. Auch 4  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  war in der Lage, die Anzahl methylierter Cytosine deutlich zu verringern, sogar noch etwas stärker als die Positivkontrolle (Abb. 27).



**Abb. 27:** Inzidenz der methylierten Cytosine durch Inkubation mit 4  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  nach 72 h in L5178Y-Zellen gemessen am Durchflusszytometer. NKT = Negativkontrolle PBS. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Einzelversuchen.

### 4.3. Modulatoren

#### 4.3.1. Allgemeines

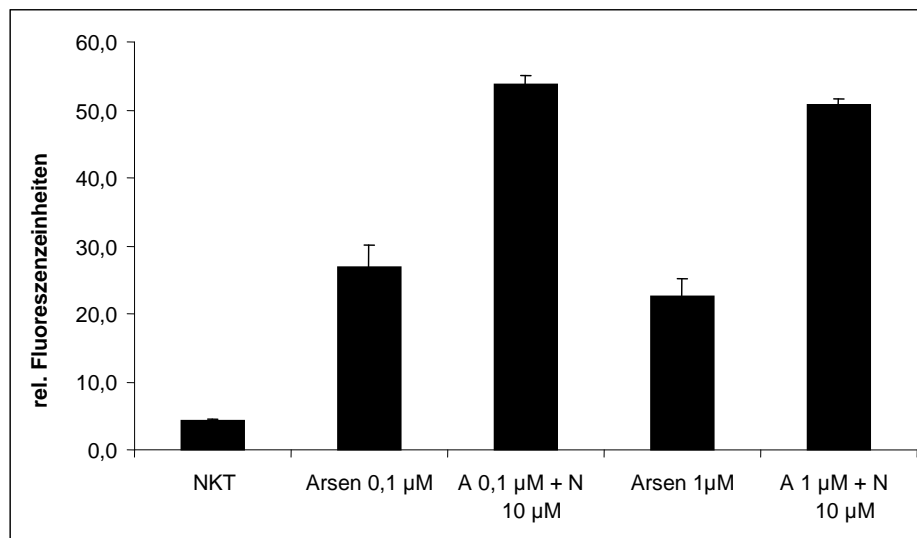
Nachdem nun aus den vorliegenden Messungen geschlossen werden konnte, dass beide Mechanismen (oxidativer Stress und Methylierung) für die Entstehung des  $\text{NaAsO}_2$ -induzierten Schadens verantwortlich sein könnten, wurden für die weiteren Experimente Substanzen ausgewählt, die bei einer kombinierten Behandlung mit Arsen aufgrund ihrer Eigenschaften modulierend auf diese Mechanismen wirken können. Für die Inhibierung der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wurden Benfotiamin, N-Acetylcystein (NAC) und  $\alpha$ -Tocopherol ausgewählt, für die verstärkte Freisetzung von ROS wiederum NQO als Positivkontrolle. Für die Modulation des Methylierungsstatus wurden Folat, S-Adenosylmethionin (SAM), als Positivkontrolle 5-Azacytidin verwendet. Von Folat und SAM wird angenommen, dass sie eine Hypermethylierung zur Folge haben, also eine durch  $\text{NaAsO}_2$  induzierte Hypomethylierung ausgleichen könnten. 5-Azacytidin wiederum wurde ausgewählt, um die  $\text{NaAsO}_2$ -induzierte Hypomethylierung zu verstärken. In Vorversuchen wurden alle Modulatoren jeweils alleine inkubiert, um eventuelle durch den Modulator selbst

ausgeübten Effekte auszuschließen und um optimale Konzentrationen zu identifizieren.

### 4.3.2. Oxidativer Stress

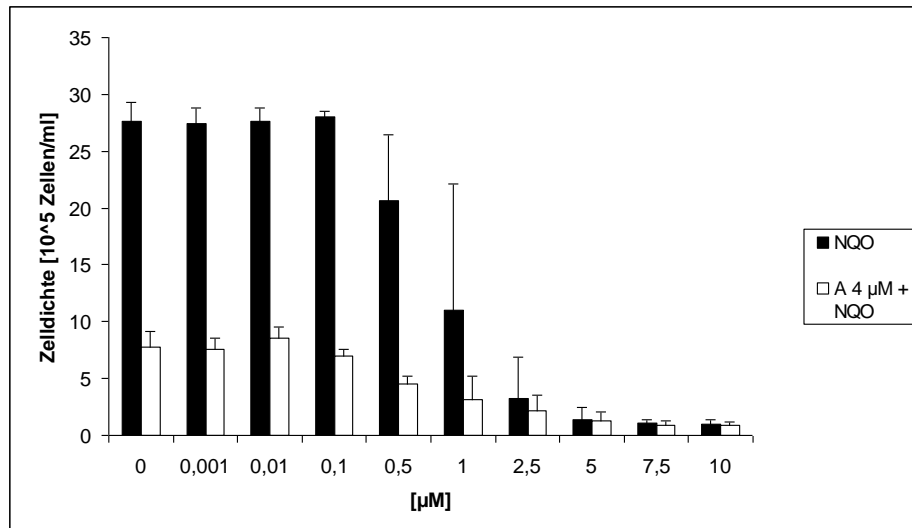
#### 4.3.2.1. 4-Nitrochinolin-1-Oxid (NQO)

Zuerst wurde das als Prooxidans gewählte 4-Nitrochinolin-1-Oxid (NQO) eingesetzt. Bei der Quantifizierung der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies zeigte sich, dass 10  $\mu\text{M}$  NQO bei Simultaninkubation mit  $\text{NaAsO}_2$  in der Lage war, deutlich mehr oxidativen Stress zu induzieren als 1  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  allein (Abb. 28).



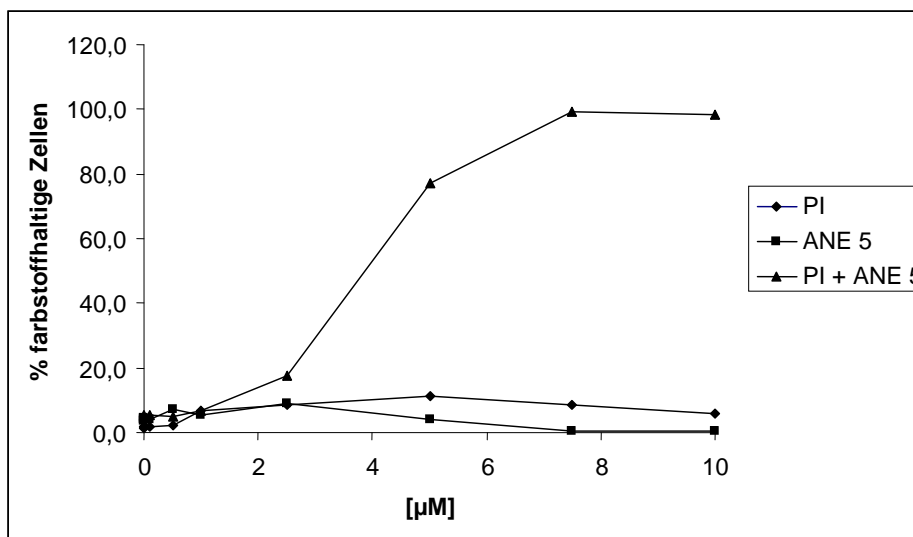
**Abb. 28:** Zunahme der ROS-induzierten Fluoreszenz von 2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat durch Inkubation mit 0,1  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  (Arsen) alleine und simultan mit 10  $\mu\text{M}$  4-Nitrochinolin-1-Oxid (N) nach 30 min in L5178Y-Zellen gemessen am Durchflusszytometer. NKT = Negativkontrolle PBS. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Einzelversuchen.

Die Ergebnisse der Proliferationsmessungen zeigten, dass NQO, das in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 10 mM getestet wurde, schon ab einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  die Proliferation sowohl bei Einzelinkubation als auch bei Simultaninkubation mit 4  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  inhibierte (Abb. 29).



**Abb. 29:** Proliferation [ $10^5$  Zellen/ml] von L5178Y-Zellen nach der Inkubation mit 4  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  (A) simultan mit 4-Nitrochinolin-1-Oxid (NQO) in verschiedenen Konzentrationen (0 bis 10  $\mu\text{M}$ ) und mit den unterschiedlichen NQO-Konzentrationen allein über einen Zeitraum von 35 h. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Einzelversuchen.

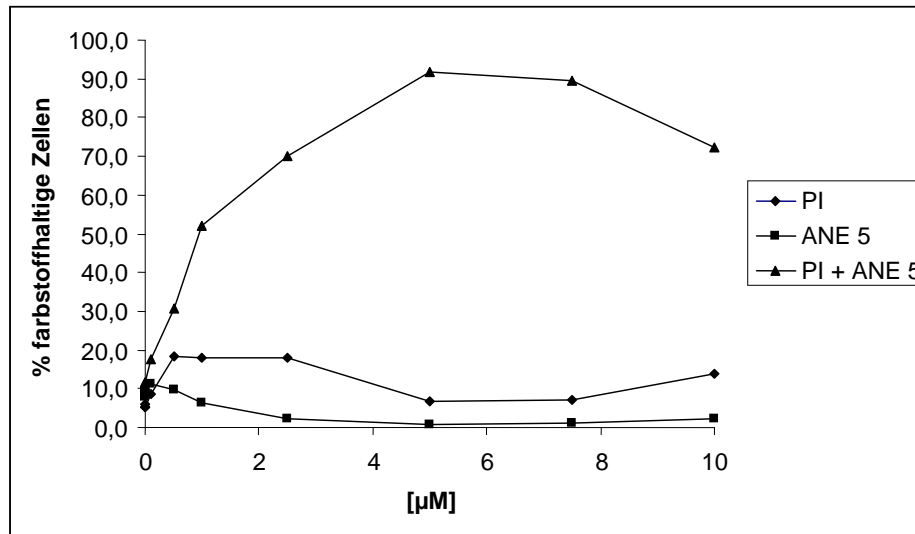
Aus der durchflusszytometrischen Messung ging hervor, dass die Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen NQO (0 bis 10  $\mu\text{M}$ ) keine Auswirkung auf die Frequenz der frühen Apoptosen und die Vitalität der Zellen hatte (Abb. 30). Lediglich ein Anstieg der PI- und Annexin-5-gefärbten Zellen konnte verzeichnet werden, das heißt, dass der Anteil an späten Apoptosen/Nekrosen größer wurde (Abb. 30.1).



**Abb. 30.1:** Inzidenz PI-positiver, Annexin-5-positiver und PI-/Annexin-5-positiver L5178Y-Zellen [%] nach Inkubation mit verschiedenen 4-Nitrochinolin-1-Oxid-Konzentrationen (0 bis 10  $\mu\text{M}$ ), gemessen am Durchflusszytometer.

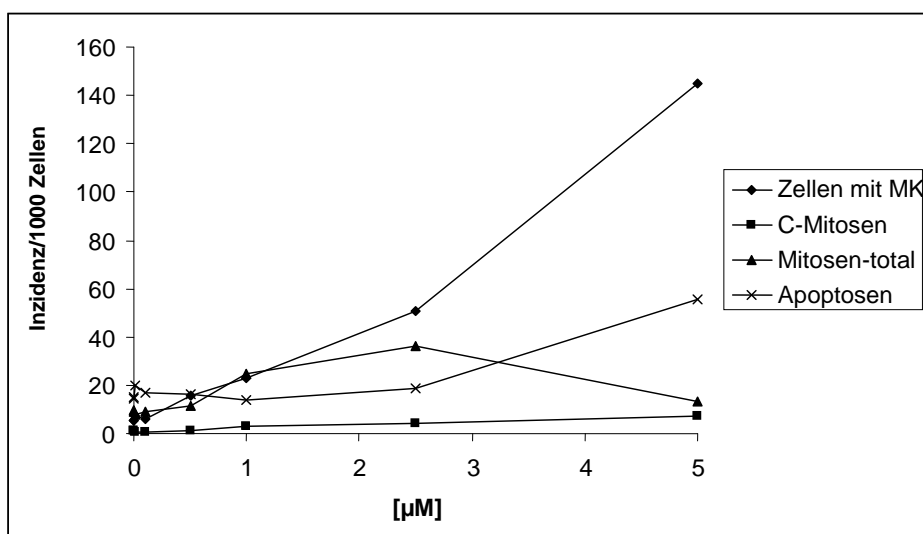
Das gleiche Bild ergab sich bei der Auswertung der Proben, die mit 4  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  und 0 bis 10  $\mu\text{M}$  NQO behandelt waren. Wiederum nahm weder die Anzahl der toten

Zellen noch die der frühen Apoptosen zu, sondern lediglich die der späten Apoptosen/Nekrosen (Abb. 30.2).



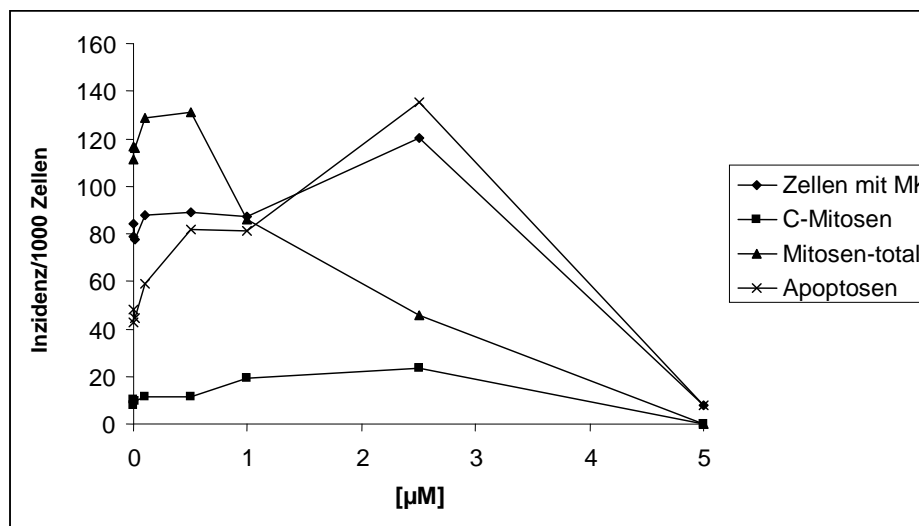
**Abb. 30.2:** Inzidenz PI-positiver, Annexin-5-positiver und PI-/Annexin-5-positiver L5178Y-Zellen [%] nach Inkubation mit 4 µM NaAsO<sub>2</sub> simultan mit verschiedenen 4-Nitrochinolin-1-Oxid-Konzentrationen (0 bis 10 µM) gemessen am Durchflusszytometer.

Weiterhin wurden mikroskopisch noch eventuelle Veränderungen in den Frequenzen von mikrokernhaltigen Zellen, C-Mitosen, Mitosen gesamt und erneut Apoptosen untersucht. Hier war deutlich erkennbar, dass die Zahl der deformierten Mitosen (C-Mitosen) von der Behandlung mit verschiedenen NQO-Konzentrationen unbeeinflusst blieb, während die Zahl der Apoptosen und der Zellen mit Mikrokern deutlich zunahm (Abb. 31.1). Konzentrationen oberhalb von 5 µM waren aufgrund der starken Fragmentierung der Zellen nicht mehr auswertbar.



**Abb. 31.1:** Inzidenz mikrokernhaltiger Zellen, C-Mitosen, Mitosen und Apoptosen in L5178Y-Zellen pro 1000 insgesamt ausgezählten Zellen nach Inkubation mit verschiedenen 4-Nitrochinolin-1-Oxid-Konzentrationen (0 bis 5 µM) untersucht am Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 35 h.

Die Auswertung der Präparate der mit 4  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  und NQO behandelten Zellen ergab, dass die Zellen durch die Doppelbehandlung stark geschädigt waren (Abb. 31.2), auch hier konnten Konzentrationen oberhalb von 5  $\mu\text{M}$  NQO nicht mehr ausgewertet werden. Dies war der Fall, obwohl für diese Testreihe mit 4  $\mu\text{M}$  extra eine relativ niedrige  $\text{NaAsO}_2$ -Konzentration gewählt wurde, damit eine eventuelle Verschlimmerung durch Simultanbehandlung mit NQO noch gut hätte erkannt werden können.

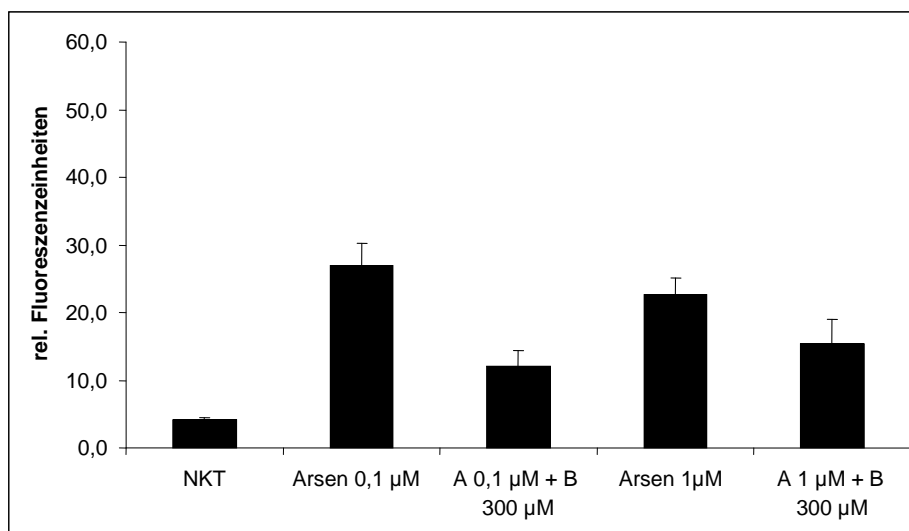


**Abb. 31.2:** Inzidenz mikrokernhaltiger Zellen, C-Mitosen, Mitosen und Apoptosen in L5178Y-Zellen pro 1000 insgesamt ausgezählten Zellen nach Inkubation mit 4  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  simultan mit verschiedenen 4-Nitrochinolin-1-Oxid-Konzentrationen (0 bis 5  $\mu\text{M}$ ) untersucht am Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 35 h.

#### 4.3.2.2. Benfotiamin

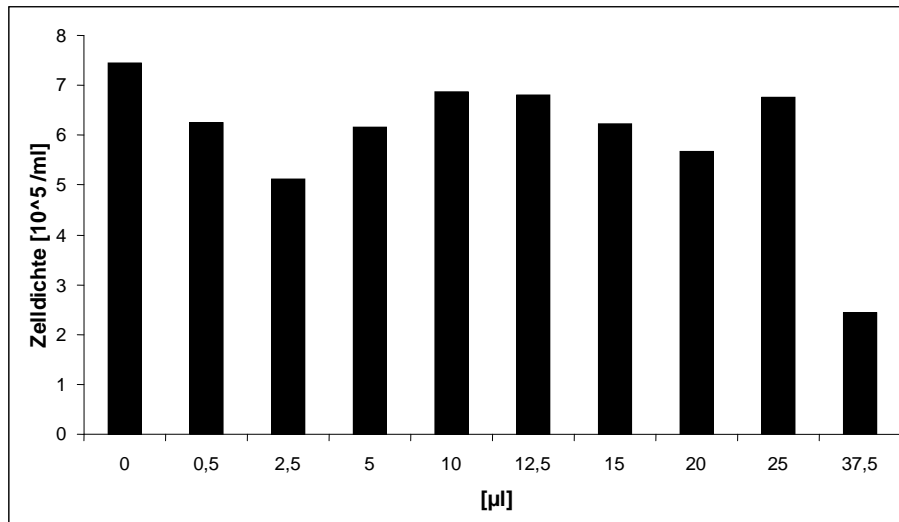
Als erste potenziell antioxidativ wirkende Substanz wurde Benfotiamin getestet, ein lipophiles Prodrug von Thiamin (Vitamin  $\text{B}_1$ ). Folgende Versuchsparmeter wurden gewählt: 30-minütige Inkubation, weil die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies eine schnelle Reaktion ist; 300  $\mu\text{M}$  Benfotiamin, weil diese Konzentration in vorherigen Messreihen im Durchflusszytometer gute Effekte gezeigt hatte. Die durchflusszytometrische Messung ergab, dass der oxidative Stress induziert durch 0,1 bzw. 1  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  bei Co-Inkubation mit Benfotiamin deutlich geringer war als ohne (Abb. 32).





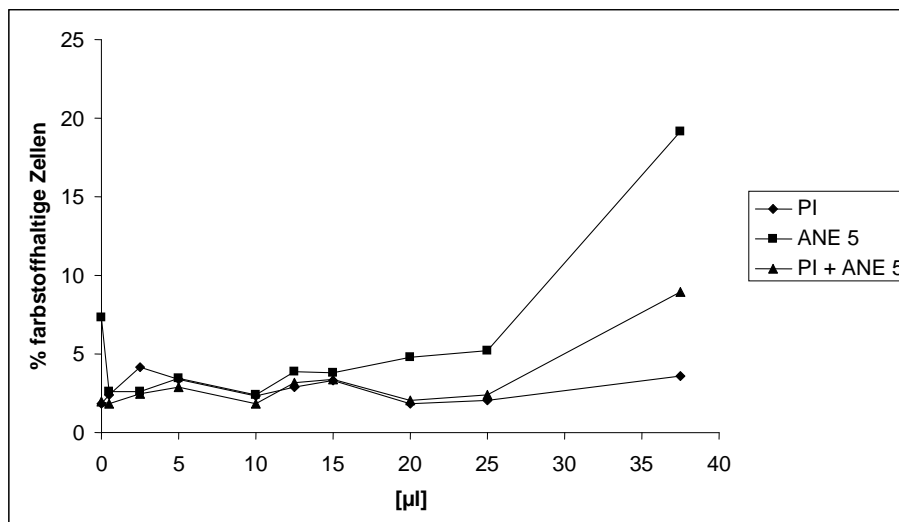
**Abb. 32:** Zunahme der ROS-induzierten Fluoreszenz von 2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat durch Inkubation mit 0,1 µM und 1 µM NaAsO<sub>2</sub> (Arsen) alleine und simultan mit 300 µM Benfotiamin (B) nach 30 min in L5178Y-Zellen gemessen am Durchflusszytometer. NKT = Negativkontrolle PBS. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Einzelversuchen.

Da aus diesem Experiment geschlossen werden konnte, dass Benfotiamin in der Lage ist, als Antioxidans zu wirken, wurden im Folgenden seine Wirkungen auf die aus dem oxidativen Stress resultierenden Schäden wie DNA-Strangbrüche, chromosomale Aberrationen, Zytotoxizität oder Apoptose-Induktion untersucht. Weil Benfotiamin als lipophile Substanz nicht in einem wässrigen Lösungsmittel aufgelöst werden kann, mussten jedoch vorher noch die Effekte des Pyridin-haltigen Lösungsmittels auf Proliferation, DNA-Schäden und Induktion des programmierten Zelltodes Apoptose getestet werden. Die durchflusszytometrische Messung reaktiver Sauerstoffspezies hatte bereits in vorherigen Messreihen ergeben, dass durch das Pyridin-haltige Lösungsmittel keine Intensitätserhöhung der Fluoreszenz zu erwarten war. Nachdem die Zellen 24 h vorher ausgesät worden waren, wurden sie nach einem Mediumwechsel mit verschiedenen Pyridin-Mengen – entsprechend dem Pyridin-Anteil der später verwendeten Benfotiamin-Konzentrationen – für 35 h behandelt. Erst bei der Zugabe von 37,5 µl Pyridin pro 5 ml Medium war eine Proliferationsinhibierung erkennbar, bei Zugabe geringerer Mengen zeigte sich kein nennenswerter Effekt auf das Zellwachstum (Abb. 33).



**Abb. 33:** Proliferation [ $10^5$  Zellen/ml] von L5178Y-Zellen nach der Inkubation mit verschiedenen Mengen Pyridin (0 bis 37,5 µl) über einen Zeitraum von 35 h.

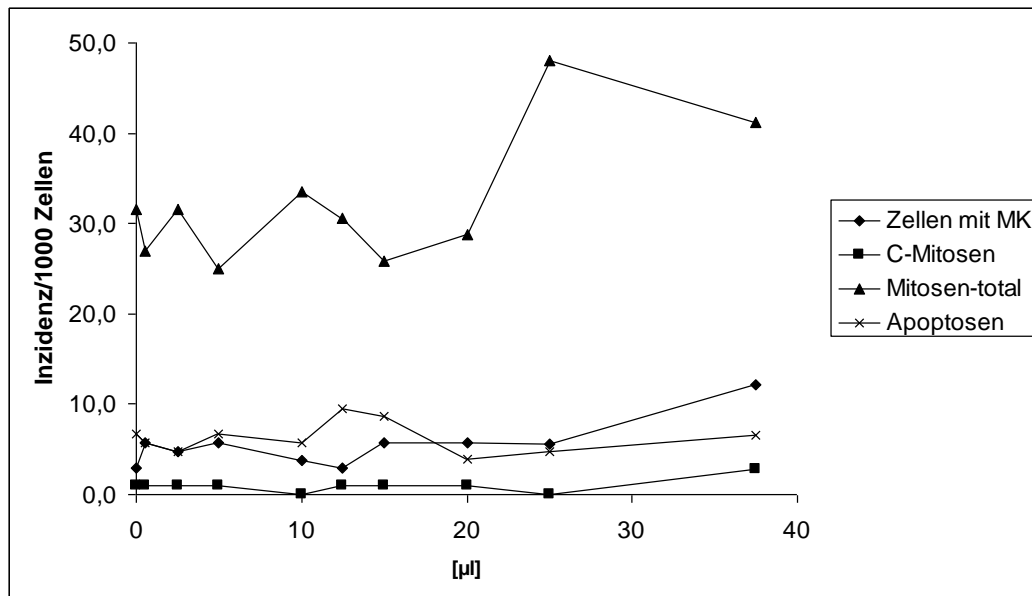
Auch bei der durchflusszytometrischen Bestimmung Propidiumjodid (PI)-, Annexin 5- und PI-/Annexin 5-positiver Zellen zeigten sich Effekte erst bei der Zugabe von 37,5 µl (Abb. 34). Während Zytotoxizität überhaupt nicht auftrat, konnten eine Zunahme vor allem der frühen Apoptosen (Annexin 5-positiv) und eine leichte Zunahme der späten Apoptosen/Nektrosen (PI-/Annexin 5-positiv) verzeichnet werden.



**Abb. 34:** Inzidenz PI-positiver, Annexin-5-positiver und PI-/Annexin-5-positiver L5178Y-Zellen [%] nach Inkubation mit verschiedenen Pyridin-Mengen (0 bis 37,5 µl) gemessen am Durchflusszytometer.

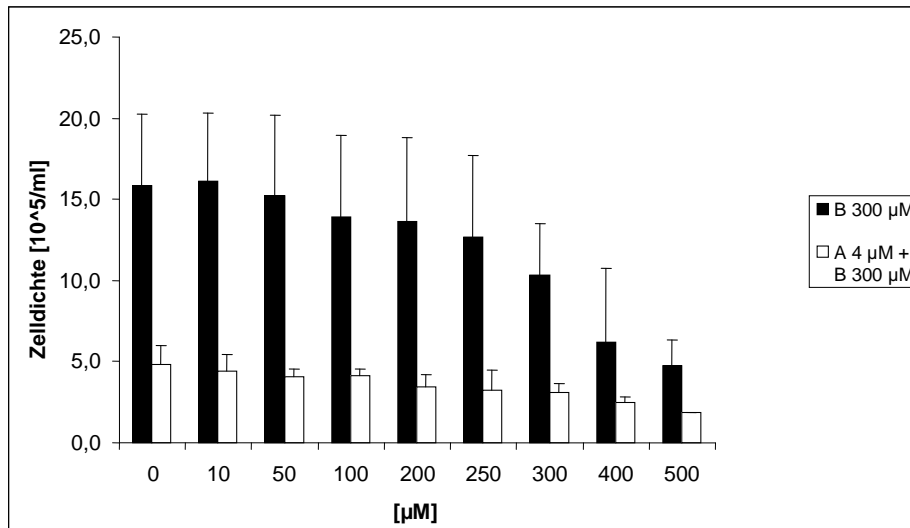
Bei der mikroskopischen Auszählung der Aufkommen von mikrokernhaltigen Zellen, C-Mitosen, Mitosen und Apoptosen war erkennbar, dass Pyridin in keiner Konzentration eine Wirkung auf die Zahl der Mikrokerne, unnatürlichen Mitosen (C-Mitosen) und Apoptosen zeigte. Nur die Anzahl der Mitosen insgesamt war deutlich

erhöht, was für eine Proliferationsförderung oder möglicherweise für einen Mitosearrest bzw. eine Mitoseverlängerung spricht (Abb. 35).



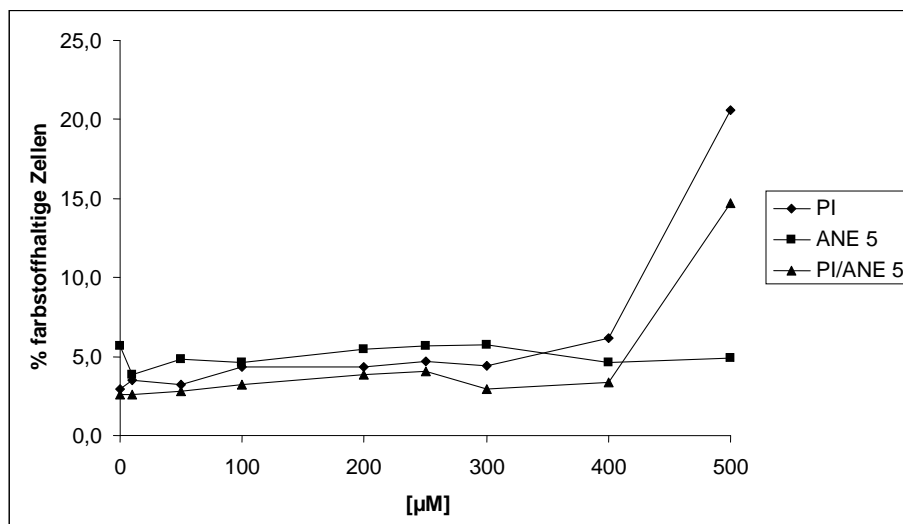
**Abb. 35:** Inzidenz mikrokernhaltiger Zellen, C-Mitosen, Mitosen und Apoptosen in L5178Y-Zellen pro 1000 insgesamt ausgezählten Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Pyridin-Mengen untersucht am Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 35 h.

Nachdem nun nachgewiesen war, dass das im Lösungsmittel enthaltene Pyridin die Ergebnisse nicht beeinflussen würde, wurden die eigentlichen Versuche mit Benfotiamin durchgeführt. Hierfür wurde ein Konzentrationsbereich von 0 bis 500 µM gewählt. Wie schon im Vorversuch wurden die Zellen 24 h vor der Behandlung mit Benfotiamin (0 bis 500 µM) alleine oder simultan mit 4 µM NaAsO<sub>2</sub> mit der gleichen Ausgangszellzahl ausgesät und dann 35 h behandelt. Die NaAsO<sub>2</sub>-Konzentration wurde aufgrund der Erkenntnisse der vorangegangenen Versuche ausgesucht: Für die Untersuchung der Modulation der NaAsO<sub>2</sub>-induzierten Effekte war eine Konzentration nötig, die einen mittleren Schaden hervorruft, und nicht sofort Apoptose induziert. Der Untersuchung des Proliferationsverhaltens der Zellen bei Behandlung mit 4 µM NaAsO<sub>2</sub> simultan mit verschiedenen Benfotiamin-Konzentrationen (0 bis 500 µM) konnte entnommen werden, dass Benfotiamin alleine ab einer Konzentration von 300 µM einen proliferationsinhibierenden Effekt hatte. Wurde simultan mit 4 µM NaAsO<sub>2</sub> inkubiert, war bei allen Konzentrationen fast kein Wachstum mehr erkennbar; da die Ausgangszellzahl jedoch erhalten blieb, konnte auch keine Zytotoxizität festgestellt werden (Abb. 36).



**Abb. 36:** Proliferation [ $10^5$  Zellen/ml] von L5178Y-Zellen nach der Inkubation mit  $\text{NaAsO}_2$  simultan mit Benfotiamin in verschiedenen Konzentrationen (0 bis 500  $\mu\text{M}$ ) und mit den unterschiedlichen Benfotiamin-Konzentrationen allein über einen Zeitraum von 35 h. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Einzelversuchen.

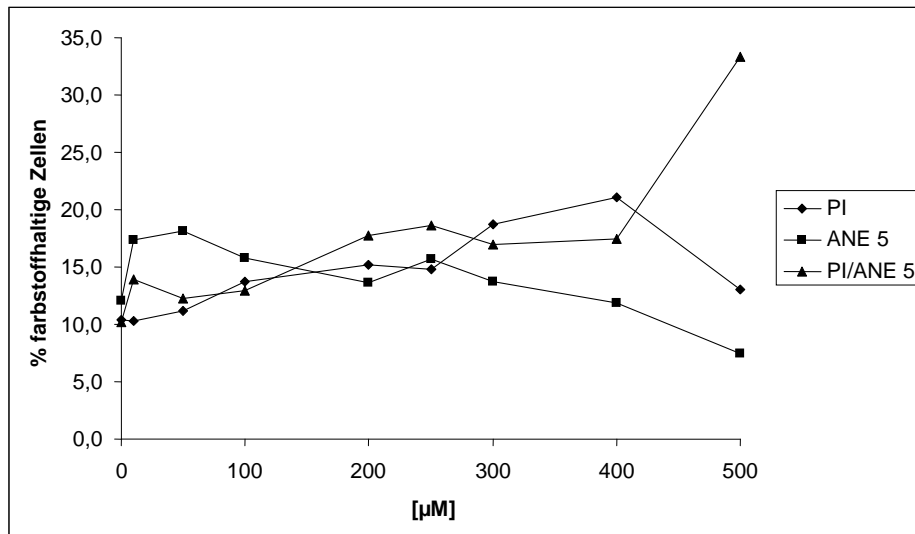
Die Messung der Anzahlen toter, früh apoptotischer und spät apoptotischer/nekrotischer Zellen am Durchflusszytometer ergab, dass Benfotiamin alleine in Konzentrationen oberhalb von 400  $\mu\text{M}$  zytotoxisch war und die Zahl der späten Apoptosen/Nekrosen erhöhte, nicht aber die Zahl der frühen Apoptosen (Abb. 37.1).



**Abb. 37.1:** Inzidenz PI-positiver, Annexin-5-positiver und PI-/Annexin-5-positiver L5178Y-Zellen [%] nach Inkubation mit verschiedenen Benfotiamin-Konzentrationen (0 bis 500  $\mu\text{M}$ ) gemessen am Durchflusszytometer.

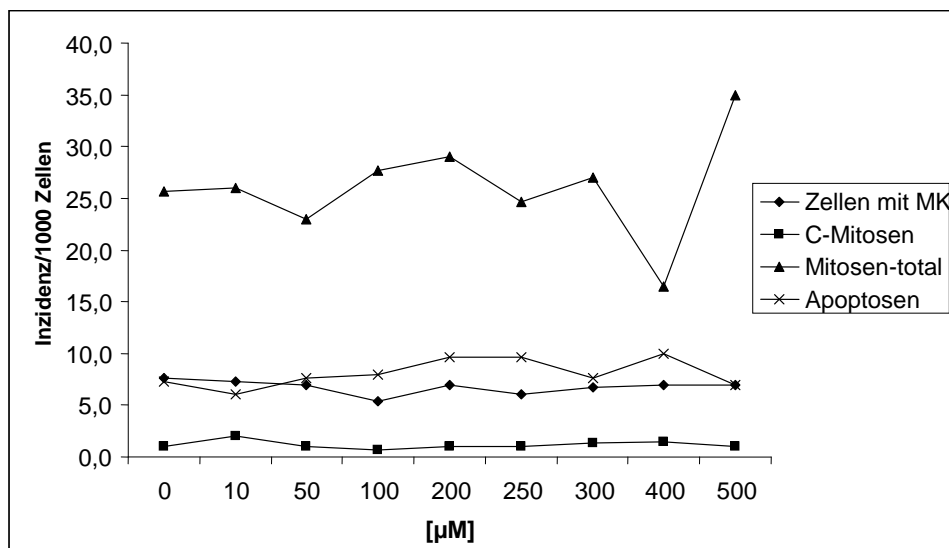
Bei Simultanbehandlung der Zellen mit 4  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  und Benfotiamin (0 bis 500  $\mu\text{M}$ ) war erkennbar, dass Benfotiamin in Konzentrationen oberhalb von 300  $\mu\text{M}$  in der Lage war, die durch  $\text{NaAsO}_2$  hervorgerufene Zytotoxizität und Apoptose-Induktion zu

verringern. Die Zahl der späten Apoptosen/Nekrosen stieg auch hier bei der höchsten Konzentration an (Abb. 37.2).



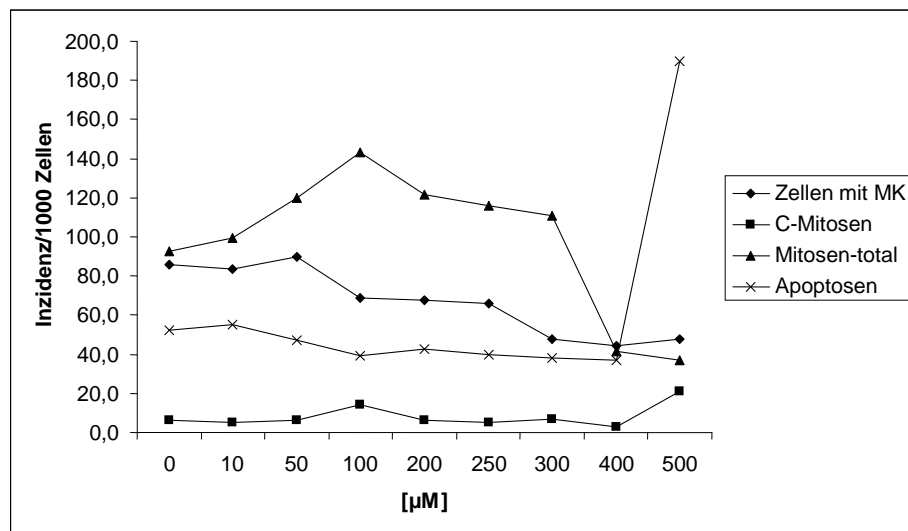
**Abb. 37.2:** Inzidenz PI-positiver, Annexin-5-positiver und PI-/Annexin-5-positiver L5178Y-Zellen [%] nach Inkubation mit 4 µM NaAsO<sub>2</sub> simultan mit verschiedenen Benfotiamin-Konzentrationen (0 bis 500 µM) gemessen am Durchflusszytometer.

Die Auswertung der Präparate am Fluoreszenzmikroskop im Hinblick auf die Inzidenz mikrokernhaltiger Zellen, C-Mitosen, Mitosen und Apoptosen ergab, dass Benfotiamin alleine in keiner getesteten Konzentration einen Effekt hatte. Die Level der untersuchten Morphologien lagen im Bereich der in früheren Messreihen gewonnenen Erfahrungswerte (Abb. 38.1).



**Abb. 38.1:** Inzidenz mikrokernhaltiger Zellen, C-Mitosen, Mitosen und Apoptosen in L5178Y-Zellen pro 1000 insgesamt ausgezählten Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Benfotiamin-Konzentrationen (0 bis 500 µM) untersucht am Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 35 h.

Nach Simultaninkubation mit 4  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  und unterschiedlichen Benfotiamin-Konzentrationen wurde deutlich, dass Benfotiamin in der Lage war, die Inzidenz der mikrokernhaltigen Zellen deutlich zu vermindern. Die Level der C-Mitosen und Mitosen blieben unverändert hoch. Bei 500  $\mu\text{M}$  Benfotiamin stieg die Zahl der Apoptosen dann deutlich an, ein Effekt, der zum Teil wohl auch auf das Lösungsmittel zurückzuführen war (Abb. 38.2).

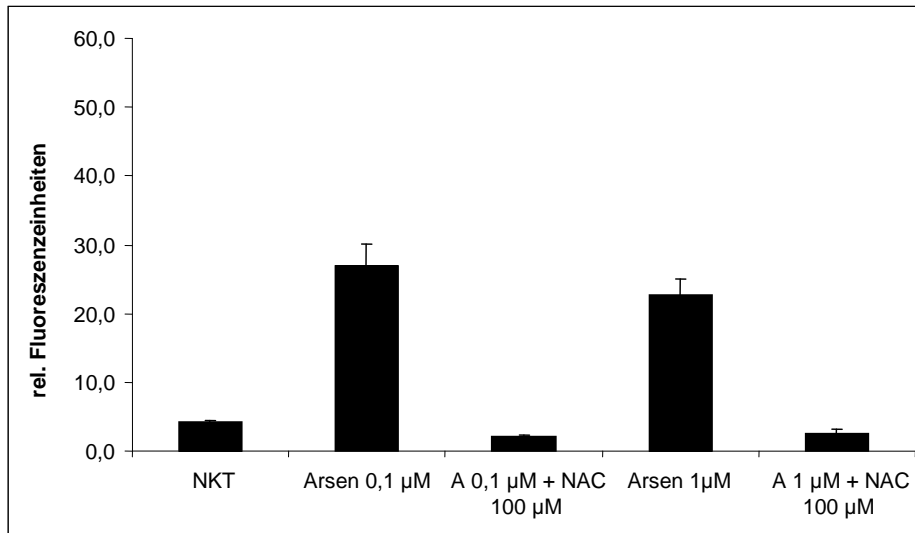


**Abb. 38.2:** Inzidenz mikrokernhaltiger Zellen, C-Mitosen, Mitosen und Apoptosen in L5178Y-Zellen pro 1000 insgesamt ausgezählten Zellen nach Inkubation mit 4  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  simultan mit verschiedenen Benfotiamin-Konzentrationen (0 bis 500  $\mu\text{M}$ ) untersucht am Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 35 h.

Benfotiamin war also in Konzentrationen ab 200  $\mu\text{M}$  in der Lage, die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies zum Teil zu inhibieren, die Apoptosefrequenz und die Anzahl der mikrokernhaltigen Zellen deutlich zu senken. Das Pyridin-haltige Lösungsmittel hatte bis auf die höchste Konzentration keine Auswirkung.

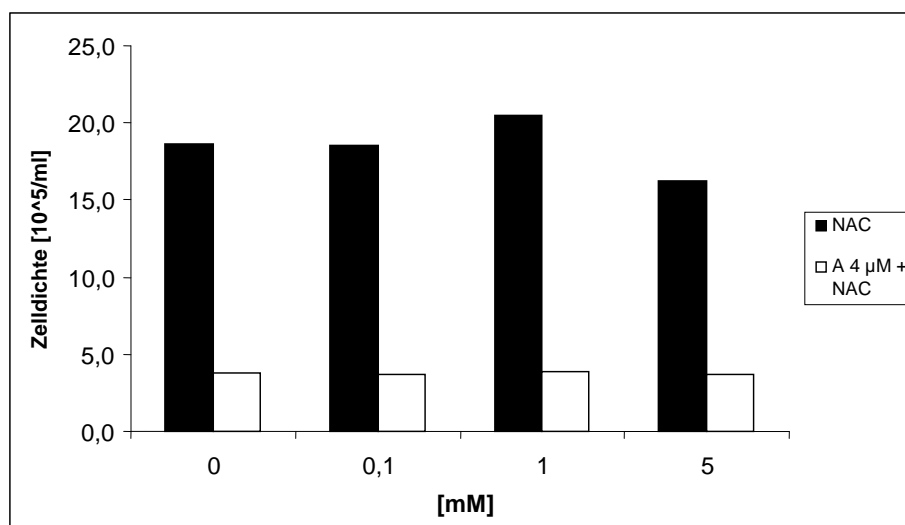
#### 4.3.2.3. *N-Acetylcystein (NAC)*

Als weiteres Antioxidans wurde N-Acetylcystein getestet. In einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  war es in der Lage, die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, induziert durch 0,1 und 1  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$ , völlig zu verhindern (Abb. 39).



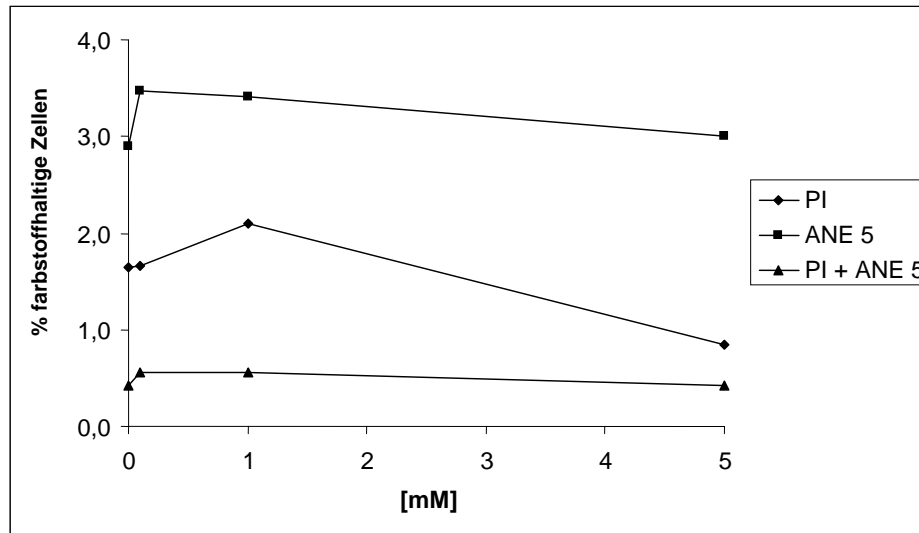
**Abb. 39:** Zunahme der ROS-induzierten Fluoreszenz von 2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat durch Inkubation mit 0,1 µM und 1 µM NaAsO<sub>2</sub> (Arsen) alleine und simultan mit 100 µM N-Acetylcystein (NAC) nach 30 min in L5178Y-Zellen gemessen am Durchflusszytometer. NKT = Negativkontrolle PBS. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Einzelversuchen.

Die Untersuchung der Proliferation unter Inkubation mit verschiedenen N-Acetylcystein-Konzentrationen allein und zusammen mit 4 µM NaAsO<sub>2</sub> ergab, dass NAC in keiner Konzentration eine proliferationsinhibierende Wirkung zeigte (Abb. 40).



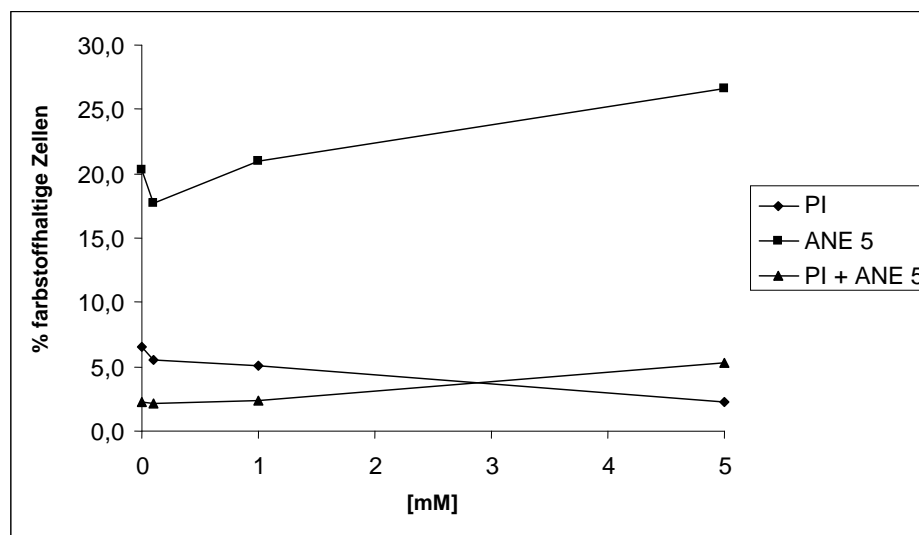
**Abb. 40:** Proliferation [10<sup>5</sup> Zellen/ml] von L5178Y-Zellen nach der Inkubation mit NaAsO<sub>2</sub> simultan mit N-Acetylcystein (NAC) in verschiedenen Konzentrationen (0 bis 5 mM) und mit den unterschiedlichen NAC-Konzentrationen allein über einen Zeitraum von 35 h.

Die Messung von Apoptosen am Durchflusszytometer ergab eine leichte Erhöhung der Anzahl der frühen Apoptosen, der späten Apoptosen/Nekrosen und der toten Zellen in der niedrigsten NAC-Konzentration von 0,1 mM. Bei den höheren Konzentrationen lagen die Werte dann jeweils wieder auf Kontroll-Niveau (Abb. 41.1).



**Abb. 41.1:** Inzidenz PI-positiver, Annexin-5-positiver und PI-/Annexin-5-positiver L5178Y-Zellen [%] nach Inkubation mit verschiedenen N-Acetylcystein-Konzentrationen (0 bis 5 mM) gemessen am Durchflusszytometer.

Wurde NAC zusammen mit  $4 \mu\text{M NaAsO}_2$  inkubiert, war es in der Lage, die Zahl der PI-positiven Zellen konzentrationsabhängig zu verringern. Die Zahl der frühen Apoptosen und die Zahl der späten Apoptosen/Nekrosen konnte allerdings nur in der niedrigsten Konzentration von 0,1 mM leicht gesenkt werden, bei Inkubation mit den hohen Konzentrationen nahm die Zahl dann wieder zu (Abb. 41.2).

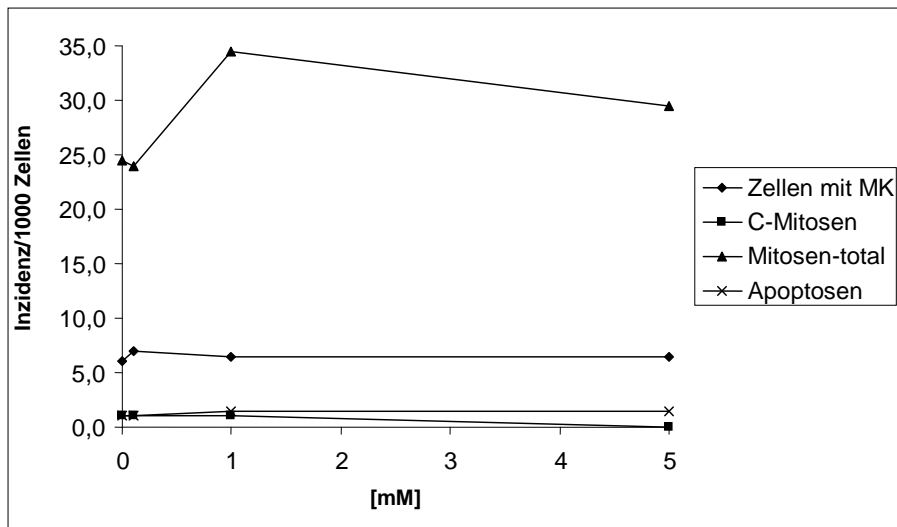


**Abb. 41.2:** Inzidenz PI-positiver, Annexin-5-positiver und PI-/Annexin-5-positiver L5178Y-Zellen [%] nach Inkubation mit  $4 \mu\text{M NaAsO}_2$  simultan mit verschiedenen N-Acetylcystein-Konzentrationen (0 bis 5 mM) gemessen am Durchflusszytometer.

Inkubation mit den verschiedenen NAC-Konzentrationen hatte keine Auswirkung auf die Zahl der mikrokernhaltigen Zellen, die Zahl der unnatürlichen Mitosen (C-Mitosen) oder auf die Zahl der Apoptosen. Die Inzidenz der Mitosen insgesamt stieg

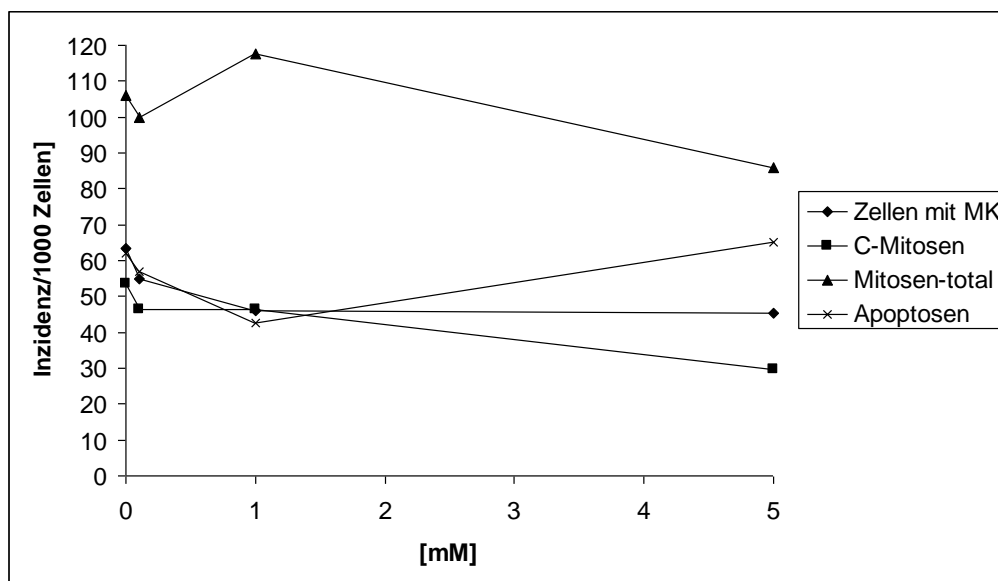


mit zunehmender NAC-Konzentration zuerst deutlich an und nahm dann bei den höchsten Konzentrationen wieder ab (Abb. 42.1).



**Abb. 42.1:** Inzidenz mikrokernhaltiger Zellen, C-Mitosen, Mitosen und Apoptosen in L5178Y-Zellen pro 1000 insgesamt ausgezählten Zellen nach Inkubation mit verschiedenen N-Acetyl-Cystein-Konzentrationen (0,1 bis 5 mM) untersucht am Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 35 h.

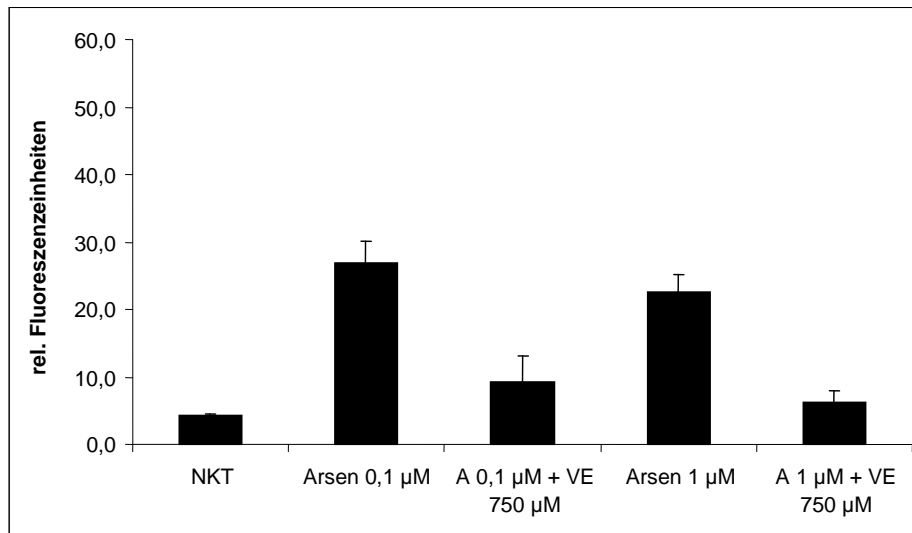
Wurde  $\text{NaAsO}_2$  zusammen mit 0,1 bis 5 mM NAC inkubiert, stieg die Zahl der Mikrokerne, C-Mitosen, Gesamtmitosen und Apoptosen Arsen-bedingt deutlich an. Mit steigenden NAC-Konzentrationen sank die Zahl der mikrokernhaltigen Zellen und der C-Mitosen, die Zahl der Apoptosen und der Gesamtmitosen blieb weitgehend unbeeinflusst (Abb. 42.2).



**Abb. 42.2:** Inzidenz mikrokernhaltiger Zellen, C-Mitosen, Mitosen und Apoptosen in L5178Y-Zellen pro 1000 insgesamt ausgezählten Zellen nach Inkubation mit 4  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  simultan mit verschiedenen N-Acetyl-Cystein-Konzentrationen (0,1 bis 5 mM) untersucht am Fluoreszenz-Mikroskop über einen Zeitraum von 35 h.

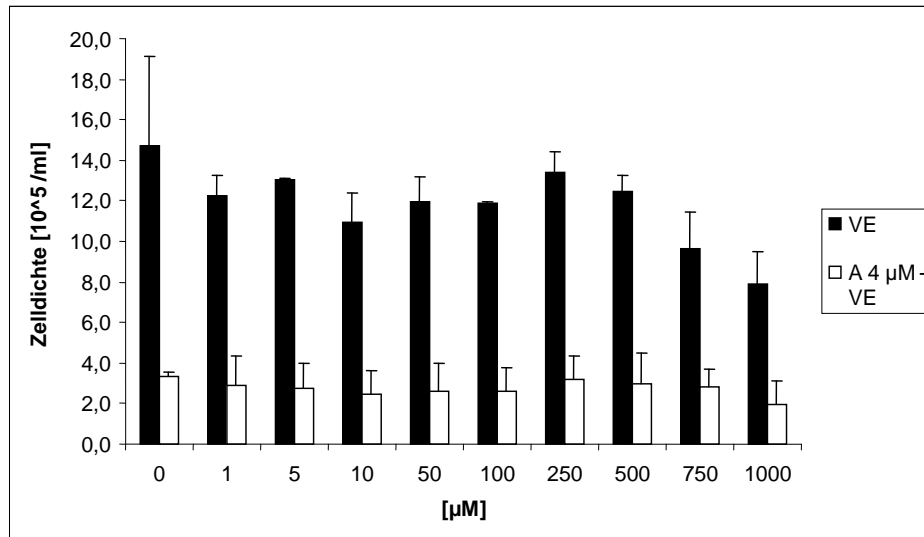
#### 4.3.2.4. $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E)

Als letztes Antioxidans wurde  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) ausgewählt. Auch hier war deutlich erkennbar, dass der oxidative Stress, den  $\text{NaAsO}_2$   $0,1 \mu\text{M}$  und  $1 \mu\text{M}$  induzierte, durch Co-Inkubation mit  $750 \mu\text{M}$  Vitamin E fast komplett inhibierbar war (Abb. 43).



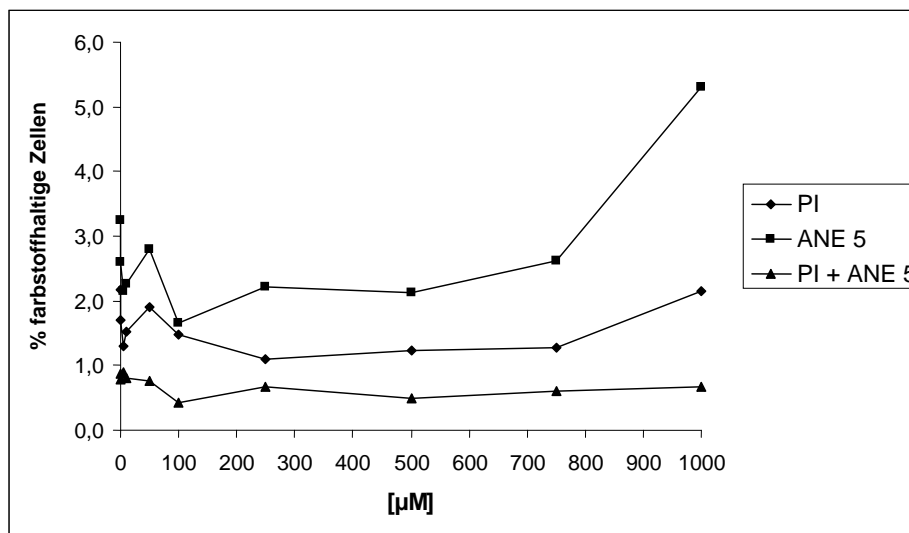
**Abb. 43:** Zunahme der ROS-induzierten Fluoreszenz von 2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat durch Inkubation mit  $0,1 \mu\text{M}$  und  $1 \mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  (Arsen) alleine und simultan mit  $750 \mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol (VE) nach 30 min in L5178Y-Zellen gemessen am Durchflusszytometer. NKT = Negativkontrolle PBS. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Einzelversuchen.

Wurde Vitamin E im Hinblick auf seine proliferationsfördernden oder -inhibierenden Eigenschaften untersucht, zeigte sich, dass keine der im Bereich zwischen 0 und  $1000 \mu\text{M}$  liegenden Konzentrationen einen signifikanten Einfluss auf die Proliferation hatte und zwar sowohl bei der Inkubation mit Vitamin E alleine oder in Kombination mit  $4 \mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  (Abb. 44).



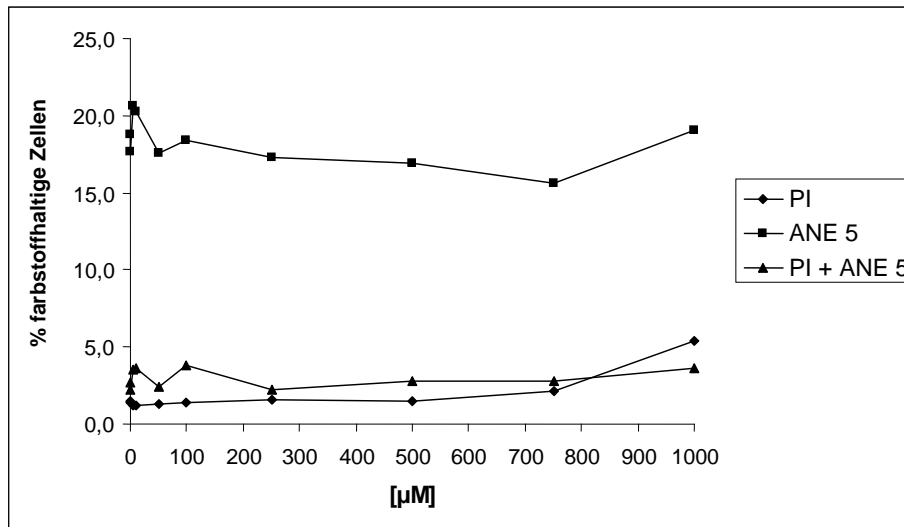
**Abb. 44:** Proliferation [ $10^5$  Zellen/ml] von L5178Y-Zellen nach der Inkubation mit  $\text{NaAsO}_2$  simultan mit verschiedenen Vitamin E (VE)-Konzentrationen oder VE allein über einen Zeitraum von 35 h. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Einzelversuchen.

Ebenfalls keine Auswirkungen hatte Vitamin E auf die Zahl der toten Zellen und der späten Apoptosen/Nekrosen, die am Durchflusszytometer bestimmt wurde. Die höchste Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  induzierte jedoch deutlich die Bildung früher Apoptosen (Abb. 45.1).



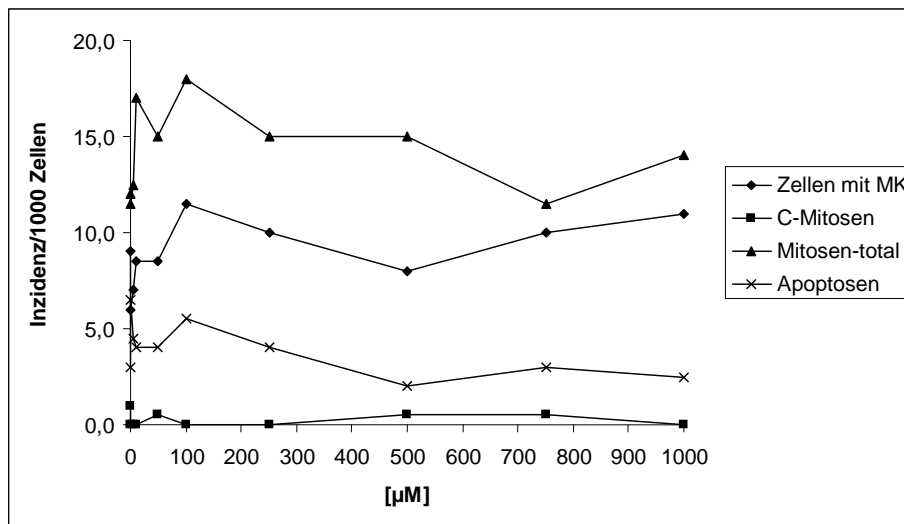
**Abb. 45:1:** Inzidenz PI-positiver, Annexin-5-positiver und PI-/Annexin-5-positiver L5178Y-Zellen [%] nach Inkubation mit verschiedenen  $\alpha$ -Tocopherol (VE)-Konzentrationen (0 bis 1000  $\mu\text{M}$ ) gemessen am Durchflusszytometer

Co-Inkubation von 4  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  und den unterschiedlichen Vitamin E-Konzentrationen brachte eine leichte Reduktion der frühen Apoptosen mit steigender Vitamin-E-Konzentration; die Zahl der späten Apoptosen/Nekrosen und der toten Zellen änderte sich im Vergleich zur Behandlung ohne  $\text{NaAsO}_2$  nicht (Abb. 45.2).



**Abb. 45.2:** Inzidenz PI-positiver, Annexin-5-positiver und PI-/Annexin-5-positiver L5178Y-Zellen [%] nach Inkubation mit 4 µM NaAsO<sub>2</sub> simultan mit verschiedenen α-Tocopherol (VE) -Konzentrationen (0 bis 1000 µM) gemessen am Durchflusszytometer

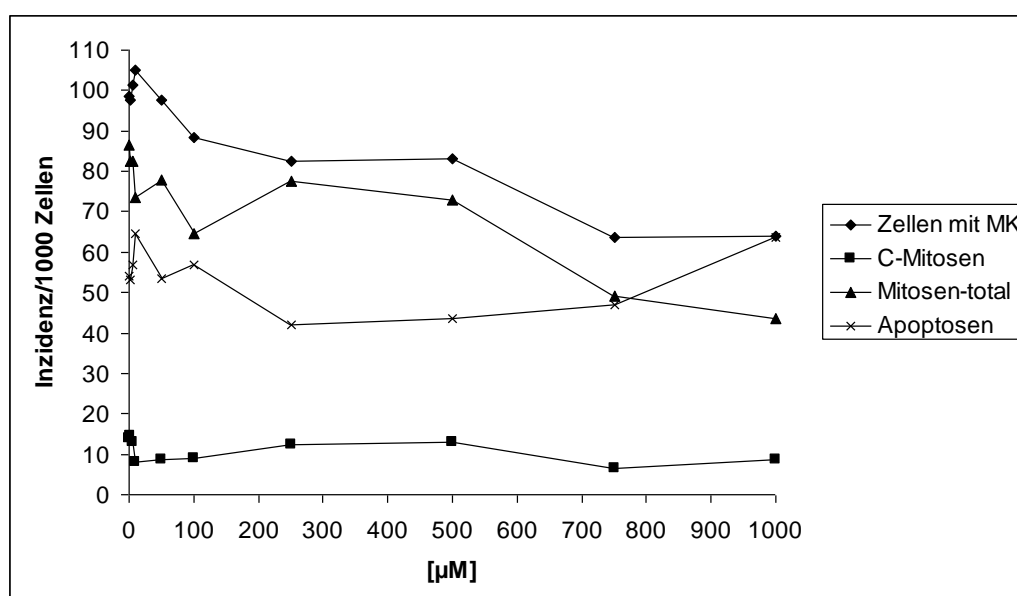
Des Weiteren wurde im Zuge dieser Messreihe auch die Zahl der mikrokernhaltigen Zellen, der C-Mitosen, der Gesamtmitosen und der Apoptosen am Fluoreszenz-Mikroskop bestimmt. Die Behandlung mit 0 bis 1000 µM Vitamin E erhöhte leicht die Gesamtzahl der Mitosen und die Zahl der mikrokernhaltigen Zellen, während die Zahl der Apoptosen zurückging. Auf die Zahl der unnatürlichen Mitosen (C-Mitosen) hatte Vitamin E keine Wirkung (Abb. 46.1)



**Abb. 46.1:** Inzidenz mikrokernhaltiger Zellen, C-Mitosen, Mitosen und Apoptosen in L5178Y-Zellen pro 1000 insgesamt ausgezählten Zellen nach Inkubation mit verschiedenen α-Tocopherol (VE)-Konzentrationen (0 bis 1000 µM) untersucht am Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 35 h.

Wurde Vitamin E zusammen mit dem potenziellen Induktor von oxidativem Stress NaAsO<sub>2</sub> inkubiert, konnte die Zahl der Arsen-induzierten Mikrokern und der unnatürlichen Mitosen gesenkt werden. Die Zahl der Apoptosen nahm in den unteren

Konzentrationen zuerst auch deutlich ab, stieg dann aber bei der höchsten Konzentration (die aber auch schon bei der Behandlung ohne NaAsO<sub>2</sub> selbst Apoptosen induzierte) wieder an. Die Frequenz der Mitosen insgesamt wurde – im Vergleich zur Behandlung mit Vitamin E alleine – durch NaAsO<sub>2</sub> deutlich erhöht. Vitamin E war jedoch nicht in der Lage, Einfluss auf diese Proliferationsförderung zu nehmen (Abb. 46.2).

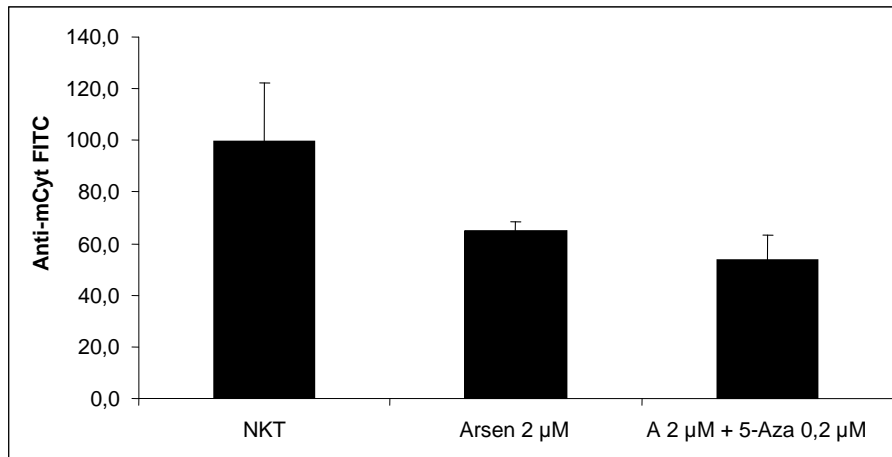


**Abb. 46.2:** Inzidenz mikrokernhaltiger Zellen, C-Mitosen, Mitosen und Apoptosen in L5178Y-Zellen pro 1000 insgesamt ausgezählten Zellen nach Inkubation mit 4 µM NaAsO<sub>2</sub> simultan mit verschiedenen α-Tocopherol (VE)-Konzentrationen (0 bis 1000 µM) untersucht am Fluoreszenz-Mikroskop über einen Zeitraum von 35 h.

### 4.3.3. DNA-Methylierung

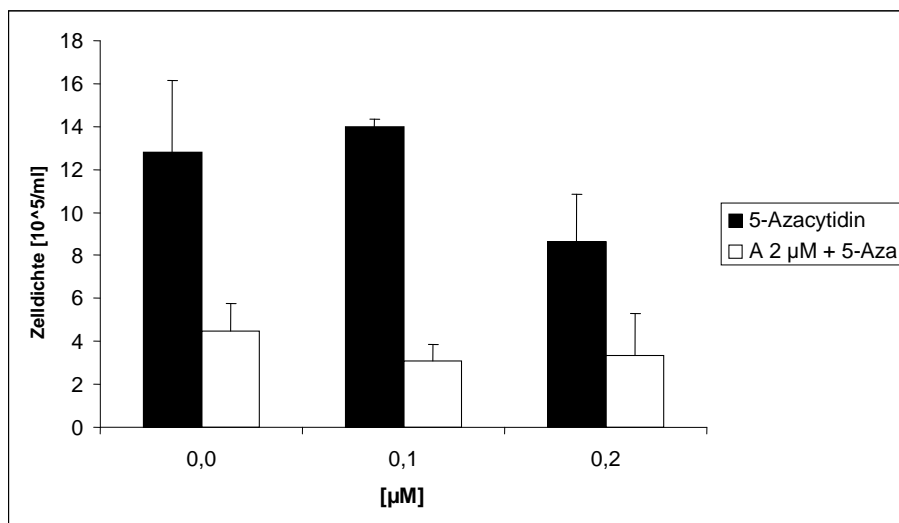
#### 4.3.3.1. 5-Azacytidin

5-Azacytidin wurde ebenso wie NQO als Positivkontrolle ausgewählt, da von dieser Substanz bekannt ist, dass sie eine Hypomethylierung der DNA bewirken kann. Da von NaAsO<sub>2</sub> angenommen wurde, dass es die durch 5-Azacytidin induzierte Hypomethylierung noch verstärken würde, wurde für diese Versuchsreihe wieder die niedrigere NaAsO<sub>2</sub>-Konzentration von 2 µM gewählt. Wie aus der durchflusszytometrischen Bestimmung des DNA-Methylierungsstatus hervorging, verstärkte Co-Inkubation von 2 µM NaAsO<sub>2</sub> und 0,2 µM 5-Azacytidin tatsächlich die Hypomethylierung der DNA gegenüber der Behandlung mit NaAsO<sub>2</sub> alleine (Abb. 47).



**Abb. 47:** Zunahme der ROS-induzierten Fluoreszenz von Anti-Methyl-Cytosin-FITC durch Inkubation mit 2 µM NaAsO<sub>2</sub> (Arsen bzw. A) alleine und simultan mit 200 nM 5-Azacytidin (5-Aza) nach 72 h in L5178Y-Zellen gemessen am Durchflusszytometer. NKT = Negativkontrolle PBS. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Einzelversuchen.

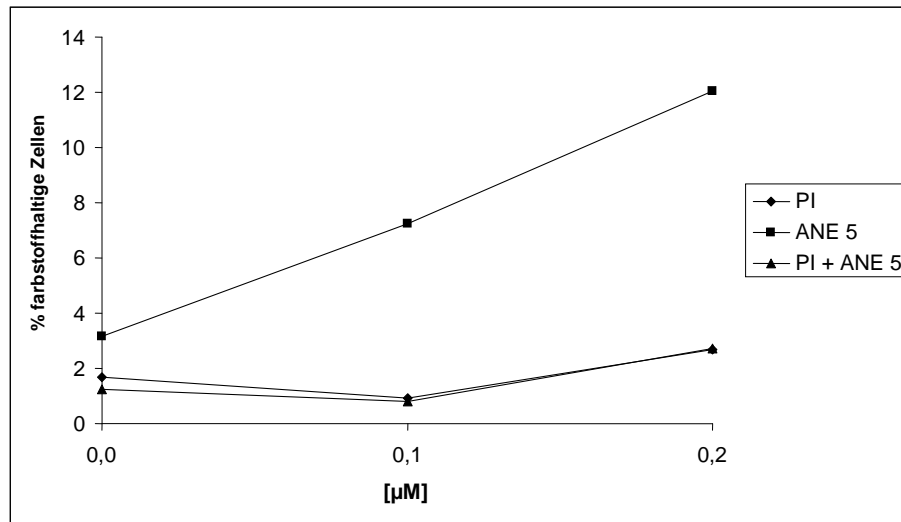
Anschließende Proliferationsmessungen unter Inkubation mit 5-Azacytidin in verschiedenen Konzentrationen (0 bis 0,2 µM) alleine und in Kombination mit 2 µM NaAsO<sub>2</sub> ergaben, dass 5-Azacytidin alleine in der Konzentration 0,2 µM leicht proliferationsinhibierend wirkte. Wurde NaAsO<sub>2</sub> mit inkubiert, hatte 5-Azacytidin keine zusätzliche Wirkung auf die Proliferation (Abb. 48).



**Abb. 48:** Proliferation [10<sup>5</sup> Zellen/ml] von L5178Y-Zellen nach der Inkubation mit 2 µM NaAsO<sub>2</sub> (A) simultan mit 5-Azacytidin (5-Aza) in verschiedenen Konzentrationen (0 bis 0,2 µM) und mit den unterschiedlichen 5-Aza-Konzentrationen allein über einen Zeitraum von 35 h. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Einzelversuchen.

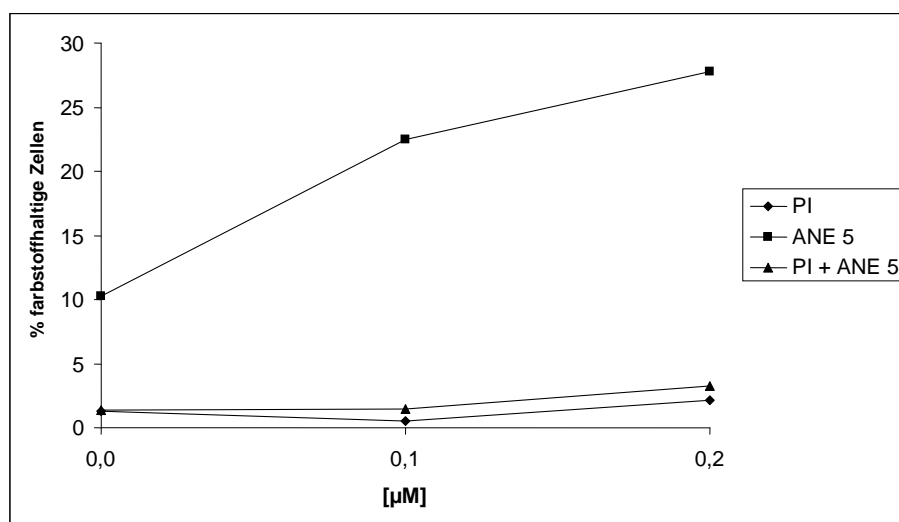
Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der Inzidenz von frühen Apoptosen, späten Apoptosen/Nekrosen und der Vitalität der Zellen konnte festgestellt werden, dass bei Inkubation mit 5-Azacytidin die Zahl der toten und spät apoptotischen bzw.

nekrotischen Zellen nicht anstieg, die Zahl der frühen Apoptosen aber konzentrationsabhängig deutlich zunahm (Abb. 49.1).



**Abb. 49.1:** Inzidenz PI-positiver, Annexin-5-positiver und PI-/Annexin-5-positiver L5178Y-Zellen [%] nach Inkubation mit verschiedenen 5-Azacytidin-Konzentrationen (5-Aza) (0 bis 0,2 µM) für 35 h gemessen am Durchflusszytometer.

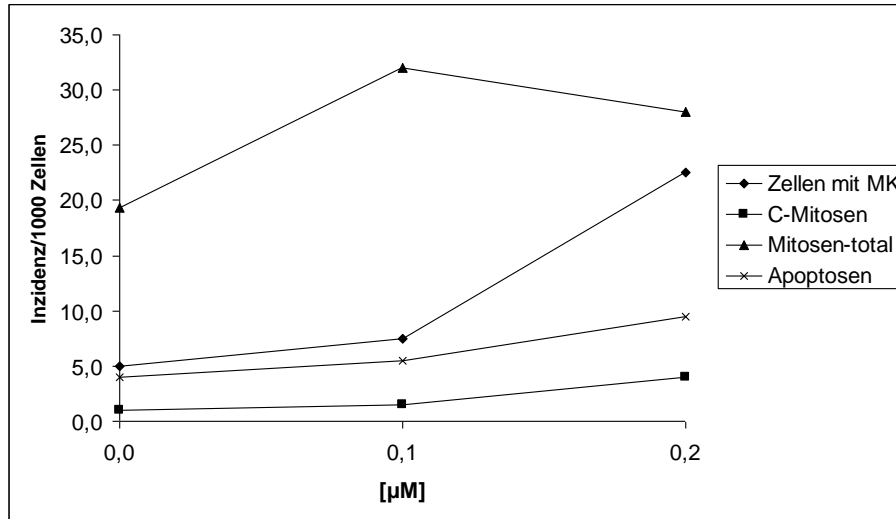
Wurde die gleiche Messung nach Inkubation mit NaAsO<sub>2</sub> und 5-Azacytidin durchgeführt, war deutlich erkennbar, dass 5-Azacytidin die – NaAsO<sub>2</sub>-bedingt – sowieso höhere Anzahl der apoptotischen Zellen noch weiter ansteigen ließ. Auf die Zahl der toten Zellen und späten Apoptosen/Nekrosen hatte die Simultaninkubation der beiden Substanzen keinen Einfluss (Abb. 49.2)



**Abb. 49.2:** Inzidenz PI-positiver, Annexin-5-positiver und PI-/Annexin-5-positiver L5178Y-Zellen [%] nach Inkubation mit 2 µM NaAsO<sub>2</sub> simultan mit verschiedenen 5-Azacytidin-Konzentrationen (0 bis 0,2 µM) für 35 h gemessen am Durchflusszytometer.

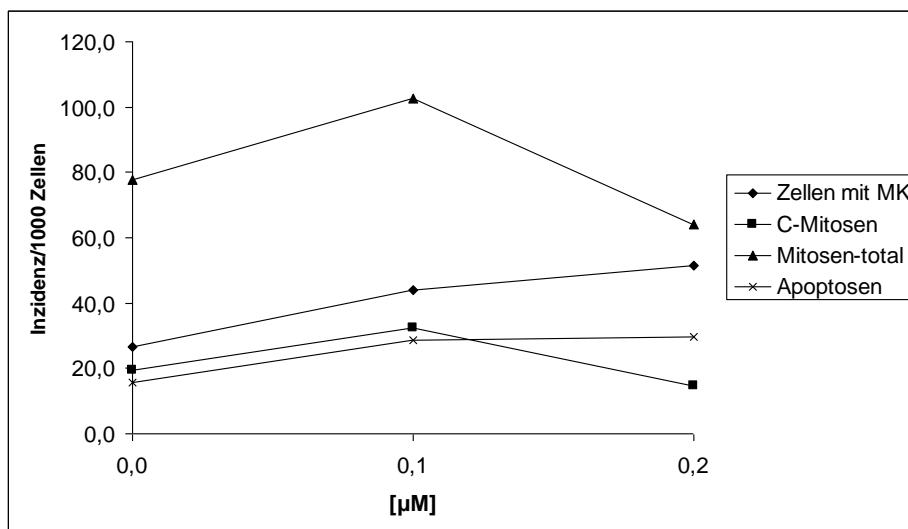
Die Behandlung von L5178Y-Zellen mit 5-Azacytidin bewirkte einen deutlichen Anstieg der mikrokernhaltigen Zellen. Weniger deutlich, aber nichtsdestotrotz eben-

falls erhöht war auch bei der mikroskopischen Auswertung die Zahl der Apoptosen und auch die der unnatürlichen Mitosen (C-Mitosen). Auch die Zahl der Mitosen insgesamt nahm bei der niedrigeren Konzentration zuerst zu, fiel jedoch bei der höheren Konzentration von 0,2  $\mu\text{M}$  wieder leicht ab (Abb. 50.1).



**Abb. 50.1:** Inzidenz mikrokernhaltiger Zellen, C-Mitosen, Mitosen und Apoptosen in L5178Y-Zellen pro 1000 insgesamt ausgezählten Zellen nach Inkubation mit verschiedenen 5-Azacytidin-Konzentrationen (5-Aza) (0 bis 0,2  $\mu\text{M}$ ) untersucht am Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 35 h.

Die Zahl der mikrokernhaltigen Zellen, der C-Mitosen, der Mitosen insgesamt und der Apoptosen wurde durch die Behandlung mit 2  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  jeweils deutlich erhöht. Simultaninkubation mit 5-Azacytidin hatte keine weitere Erhöhung aber auch keine Erniedrigung zur Folge (Abb. 50.2).

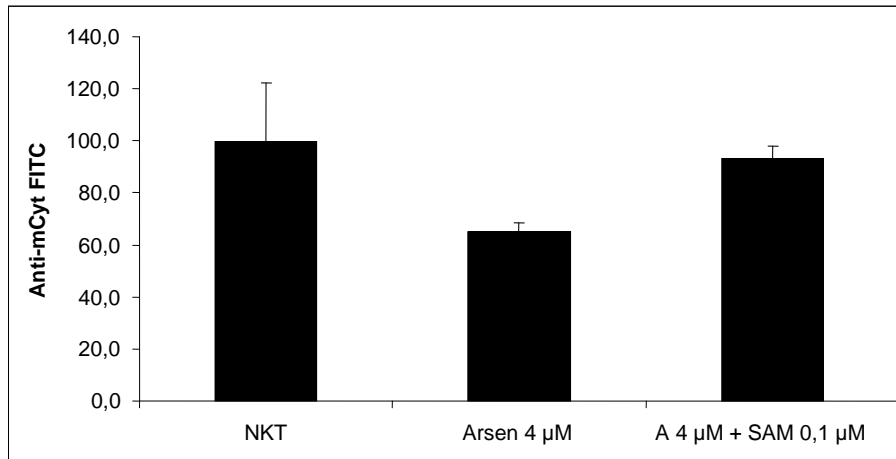


**Abb. 50.2:** Inzidenz mikrokernhaltiger Zellen, C-Mitosen, Mitosen und Apoptosen in L5178Y-Zellen pro 1000 insgesamt ausgezählten Zellen nach Inkubation mit 2  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  simultan mit verschiedenen 5-Azacytidin-Konzentrationen (5-Aza) (0 bis 0,2  $\mu\text{M}$ ) untersucht am Fluoreszenz-Mikroskop über einen Zeitraum von 35 h.



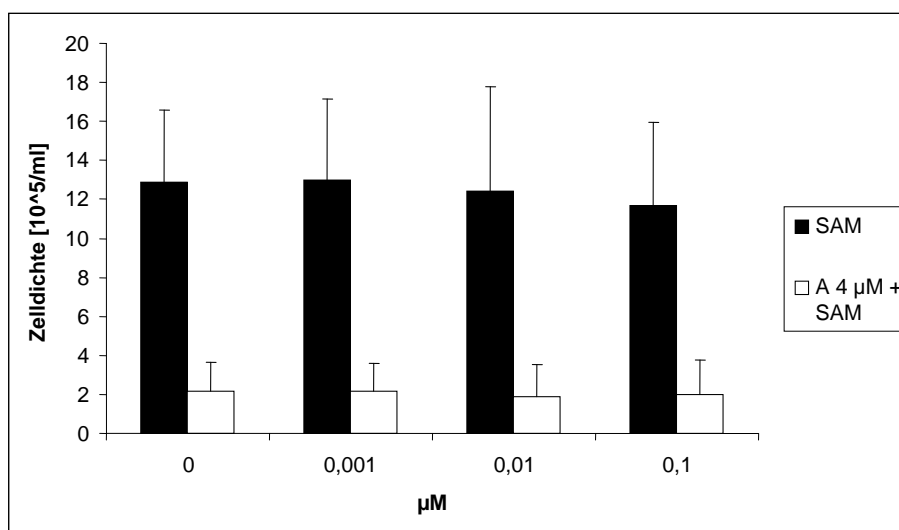
### 4.3.3.2. S-Adenosylmethionin (SAM)

Als potenziell hypermethylierendes Agens wurde S-Adenosylmethionin getestet. Wie der Quantifizierung der methylierten Cytosine am Durchflusszytometer zu entnehmen war, war S-Adenosylmethionin auch tatsächlich in der Lage, die durch 4  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  hervorgerufene Hypomethylierung fast komplett zu verhindern (Abb. 51).



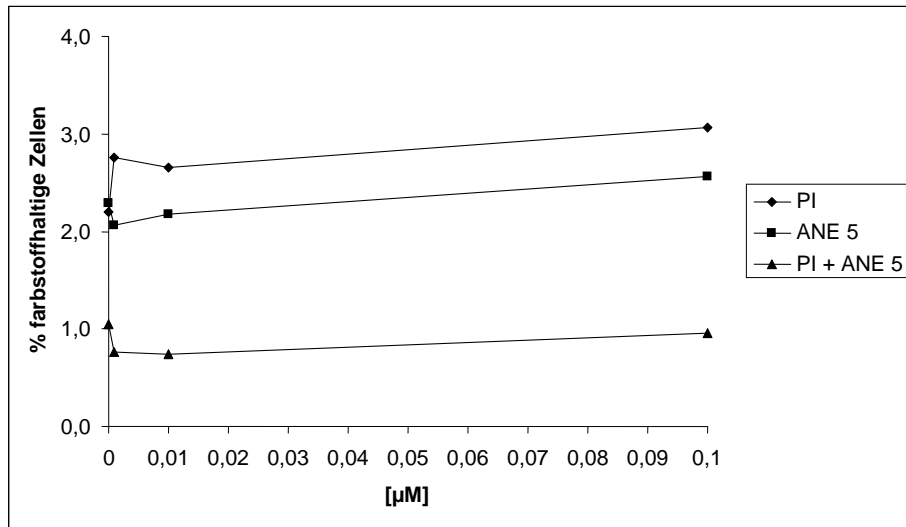
**Abb. 51:** Zunahme der ROS-induzierten Fluoreszenz von Anti-Methyl-Cytosin-FITC durch Inkubation mit 4  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  (Arsen bzw. A) alleine und simultan mit 100 nM S-Adenosylmethionin (SAM) nach 72 h in L5178Y-Zellen gemessen am Durchflusszytometer. NKT = Negativkontrolle PBS. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Einzelversuchen.

Die Untersuchung der Auswirkungen verschiedener S-Adenosylmethionin-Konzentrationen (0 bis 0,1  $\mu\text{M}$ ) auf die Proliferation ergab, dass keine der getesteten Konzentrationen auf das Zellwachstum inhibierend wirkte. Die Co-Inkubation mit 4- $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  zeigte allerdings auch keine Verbesserung der  $\text{NaAsO}_2$ -induzierten Proliferationsinhibierung (Abb. 52).



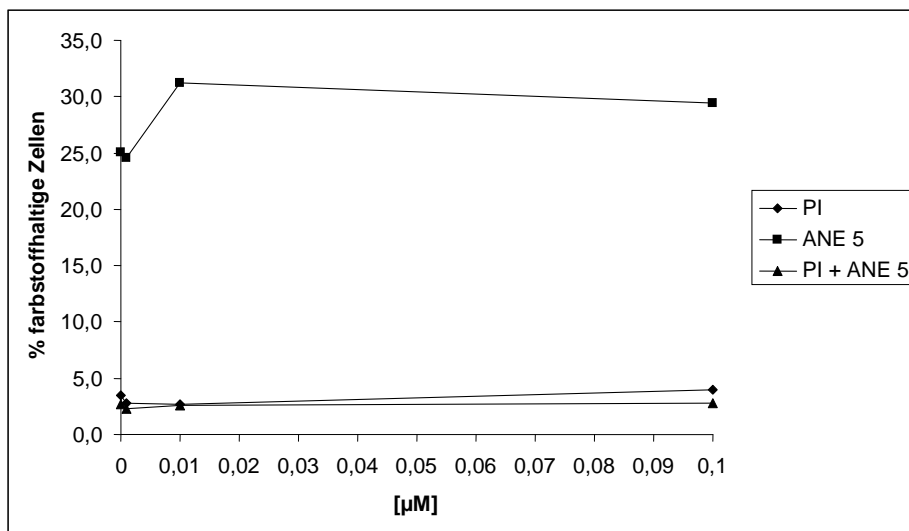
**Abb. 52:** Proliferation [ $10^5$  Zellen/ml] von L5178Y-Zellen nach der Inkubation mit 4  $\mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  (A) simultan mit S-Adenosylmethionin (SAM) in verschiedenen Konzentrationen (0 bis 0,1  $\mu\text{M}$ ) und mit den unterschiedlichen S-Adenosylmethionin-Konzentrationen alleine über einen Zeitraum von 35 h. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Einzelversuchen.

Wie der durchflusszytometrischen Bestimmung der prozentualen Anteile zu entnehmen war, induzierte S-Adenosylmethionin alleine in keiner Konzentration tote Zellen, frühe Apoptosen oder späte Apoptosen/Nekrosen (Abb. 53.1).



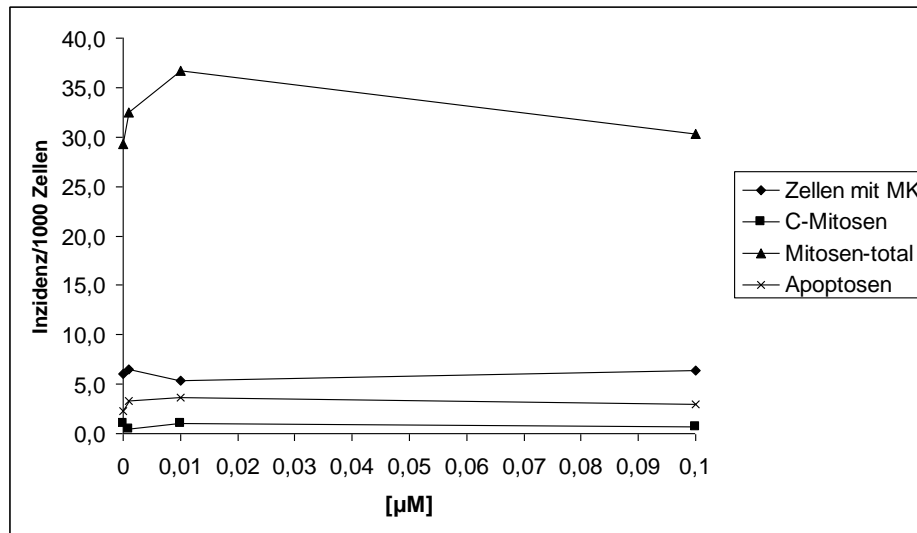
**Abb. 53.1:** Inzidenz PI-positiver, Annexin-5-positiver und PI-/Annexin-5-positiver L5178Y-Zellen [%] nach Inkubation mit S-Adenosylmethionin (SAM) in verschiedenen Konzentrationen (0 bis 0,1 µM) für 35 h gemessen am Durchflusszytometer.

Wurde die gleiche Messung nach Simultaninkubation von 4 µM NaAsO<sub>2</sub> und verschiedenen S-Adenosylmethionin-Konzentrationen durchgeführt, zeigte sich, dass die NaAsO<sub>2</sub>-bedingte Induktion PI-positiver, Annexin-5-positiver und PI-/Annexin-5-positiver Zellen durch S-Adenosylmethionin auch nicht verhindert werden konnte (Abb. 53.2).



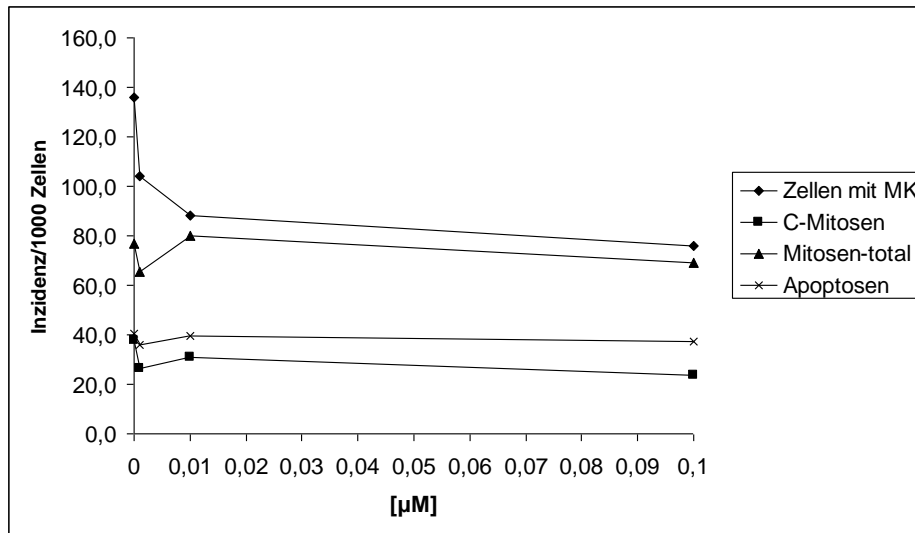
**Abb. 53.2:** Inzidenz PI-positiver, Annexin-5-positiver und PI-/Annexin-5-positiver L5178Y-Zellen [%] nach Inkubation mit 4 µM NaAsO<sub>2</sub> simultan mit S-Adenosylmethionin (SAM) in verschiedenen Konzentrationen (0 bis 0,1 µM) für 35 h gemessen am Durchflusszytometer.

Die mikroskopische Auswertung der mit verschiedenen S-Adenosylmethionin-Konzentrationen inkubierten Proben ergab eine leichte Proliferationsförderung, da ein Anstieg der Gesamtzahl der Mitosen zu verzeichnen war. Die Zahl der mikrokernhaltigen Zellen, der unnatürlichen Mitosen und der Apoptosen blieb unbeeinflusst von der Behandlung mit S-Adenosylmethionin (Abb. 54.1).



**Abb. 54.1:** Inzidenz mikrokernhaltiger Zellen, C-Mitosen, Mitosen und Apoptosen in L5178Y-Zellen pro 1000 insgesamt ausgezählten Zellen nach Inkubation mit S-Adenosylmethionin (SAM) in verschiedenen Konzentrationen (0 bis 0,1 µM) untersucht am Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 35 h.

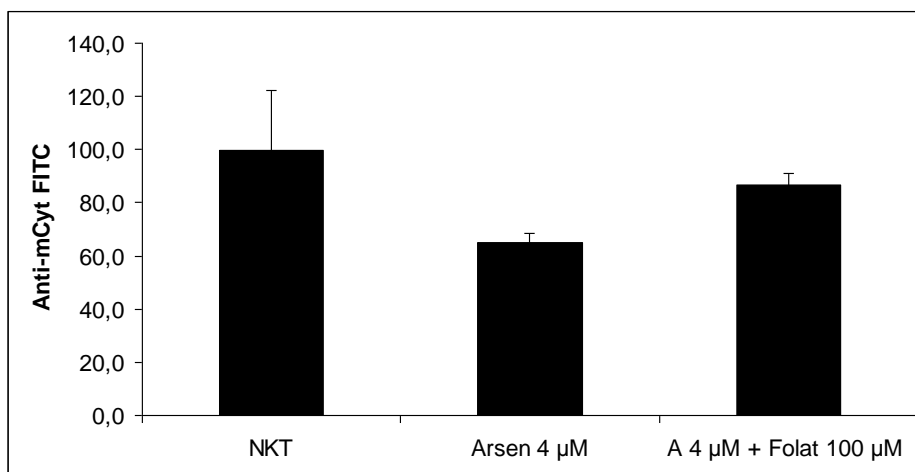
Die Auswertung der mit 4 µM NaAsO<sub>2</sub> und verschiedenen Konzentrationen von S-Adenosylmethionin gleichzeitig behandelten Proben ergab, dass SAM in der Lage war, die durch 4 µM NaAsO<sub>2</sub> erhöhten Mikrokernlevel zu senken. Auch die Zahl der unnatürlichen Mitosen (C-Mitosen), der Mitosen insgesamt und der hier ebenfalls ausgezählten Apoptosen sank mit steigender S-Adenosylmethionin-Konzentration (Abb. 54.2).



**Abb. 54.2:** Inzidenz mikrokernhaltiger Zellen, C-Mitosen, Mitosen und Apoptosen in L5178Y-Zellen pro 1000 insgesamt ausgezählten Zellen nach Inkubation mit 4 µM NaAsO<sub>2</sub> simultan mit S-Adenosylmethionin (SAM) in verschiedenen Konzentrationen (0 bis 0,1 µM) untersucht am Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 35 h.

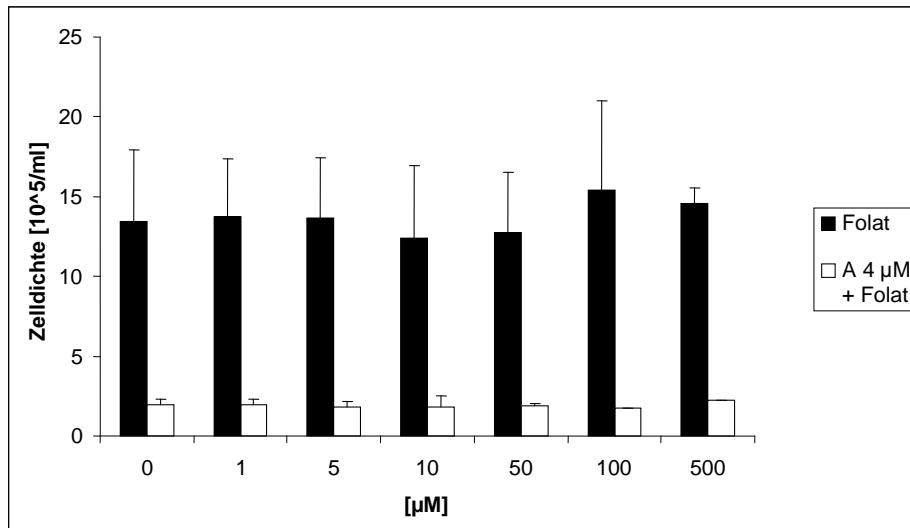
#### 4.3.3.3. Folat

Als nächste Substanz wurde Folat untersucht, da von diesem Agens angenommen werden konnte, dass es die NaAsO<sub>2</sub>-induzierte Hypomethylierung potenziell wieder aufheben kann. Die Bestimmung des Methylierungsstatus zeigte dann auch, dass dies bei Co-Inkubation von 4 µM NaAsO<sub>2</sub> und 100 µM Folat der Fall war (Abb. 55).



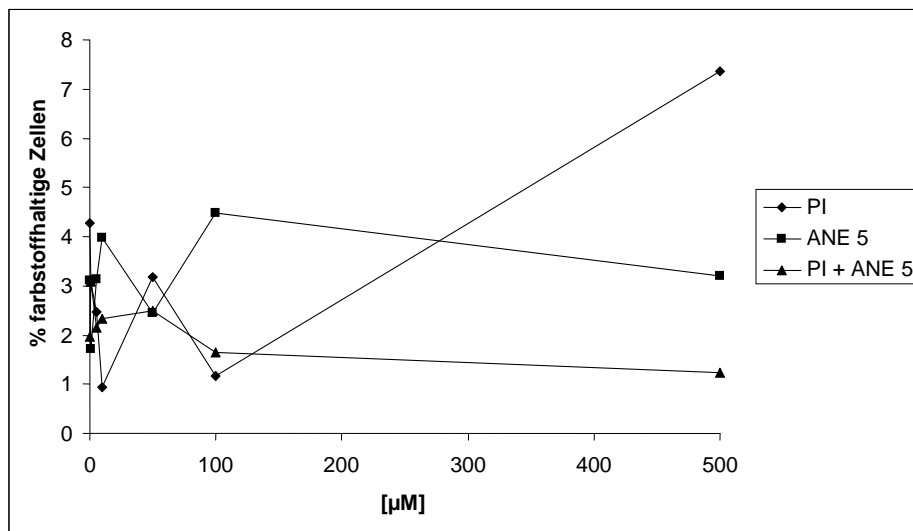
**Abb. 55:** Zunahme der ROS-induzierten Fluoreszenz von Anti-Methyl-Cytosin-FITC durch Inkubation mit 4 µM NaAsO<sub>2</sub> (Arsen) alleine und simultan mit 100 µM Folat nach 72 h in L5178Y-Zellen gemessen am Durchflusszytometer. NKT = Negativkontrolle PBS. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Einzelversuchen.

Auch die Bestimmung der Auswirkungen von verschiedenen Folat-Konzentrationen (0 bis 500 µM) auf die Proliferation von Zellen nach 35 h zeigte keine inhibierenden Effekte von Folat alleine. Die NaAsO<sub>2</sub>-bedingte Proliferationsinhibierung konnte allerdings durch Folat-Co-Inkubation auch nicht aufgehoben werden (Abb. 56).



**Abb. 56:** Proliferation [ $10^5$  Zellen/ml] von L5178Y-Zellen nach der Inkubation mit  $4 \mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  (A) simultan mit Folat in verschiedenen Konzentrationen (0 bis  $500 \mu\text{M}$ ) und mit den unterschiedlichen Folat-Konzentrationen allein über einen Zeitraum von 35 h. Darstellung des Mittelwerts mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Einzelversuchen.

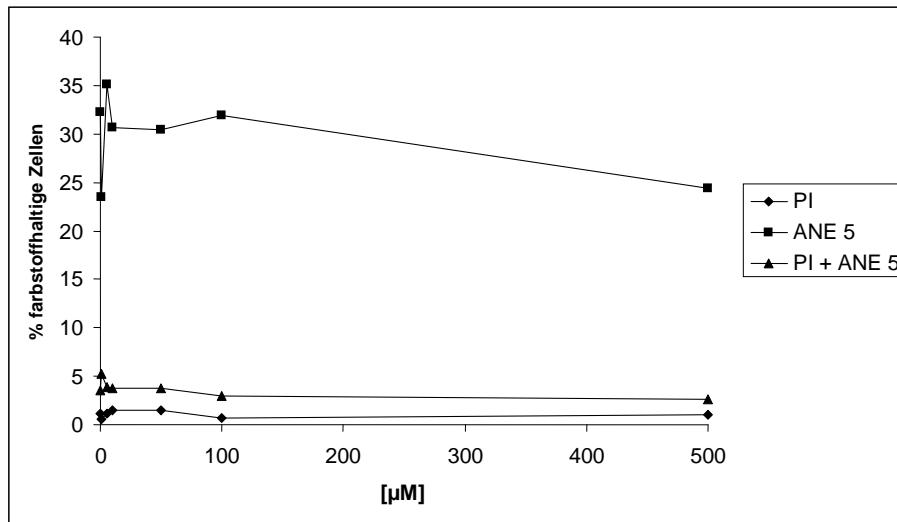
Wurde die Wirkung von Folat auf das Auftreten toten Zellen, früher Apoptosen und später Apoptosen/Nekrosen durchflusszytometrisch gemessen, zeigte sich, dass die Werte in den Konzentrationen bis  $100 \mu\text{M}$  starken Schwankungen unterlagen. Frühe Apoptosen und späte Apoptosen/Nekrosen wurden nicht induziert, lediglich die Zahl der toten Zellen nahm mit steigender Folat-Konzentration zu (Abb. 57.1).



**Abb. 57.1:** Inzidenz PI-positiver, Annexin-5-positiver und PI-/Annexin-5-positiver L5178Y-Zellen [%] nach Inkubation mit verschiedenen Folat-Konzentrationen (0 bis  $500 \mu\text{M}$ ) für 35 h gemessen am Durchflusszytometer.

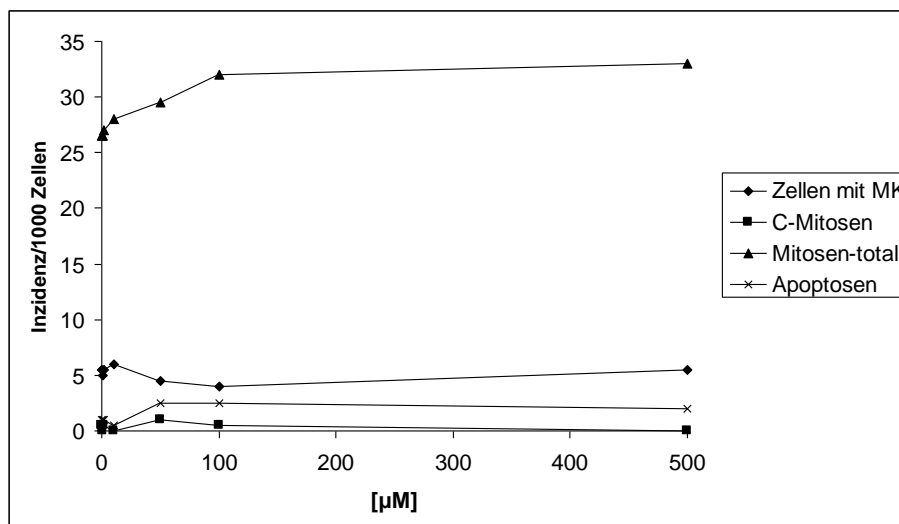
Co-Inkubation von  $4 \mu\text{M}$   $\text{NaAsO}_2$  mit verschiedenen Folat-Konzentrationen (0 bis  $500 \mu\text{M}$ ) zeigte im Durchflusszytometer, dass Folat in der Lage war, sowohl die  $\text{NaAsO}_2$ -induzierte Anzahl der frühen Apoptosen als auch die der späten

Apoptosen/Nekrosen und die der toten Zellen konzentrationsabhängig zu senken (Abb. 57.2).



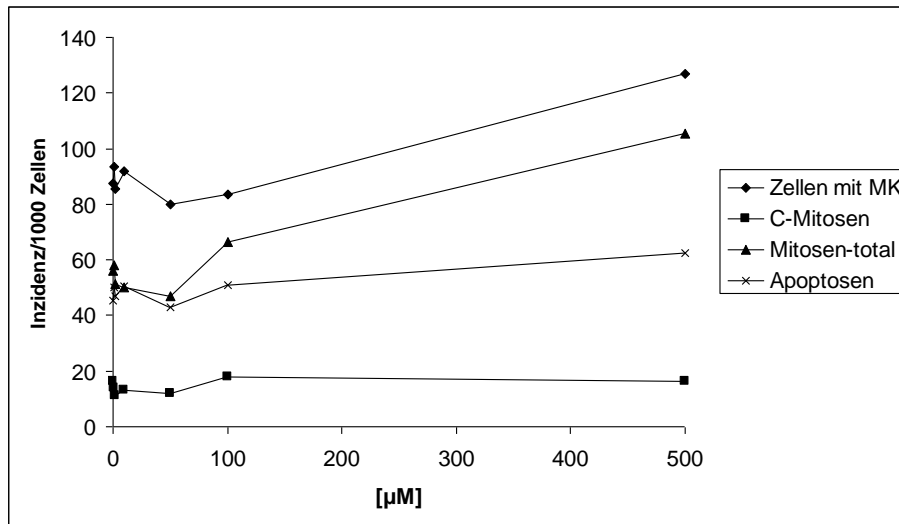
**Abb. 57.2:** Inzidenz PI-positiver, Annexin-5-positiver und PI-/Annexin-5-positiver L5178Y-Zellen [%] nach Inkubation mit 4 µM NaAsO<sub>2</sub> simultan mit verschiedenen Folat-Konzentrationen (0 bis 500 µM) für 35 h gemessen am Durchflusszytometer.

Bei der mikroskopischen Auswertung der Effekte verschiedener Folat-Konzentrationen auf die Inzidenz mikrokernhaltiger Zellen, unnatürlicher Mitosen (C-Mitosen), der Mitosen insgesamt und der Apoptosen zeigte sich, dass Folat alleine einen leicht proliferationsfördernden Effekt hatte – ablesbar am Anstieg der Zahl der Mitosen insgesamt –, aber weder Mikrokernne noch C-Mitosen noch Apoptosen induzierte (Abb. 58.1).



**Abb. 58.1:** Inzidenz mikrokernhaltiger Zellen, C-Mitosen, Mitosen und Apoptosen in L5178Y-Zellen pro 1000 insgesamt ausgezählten Zellen nach Inkubation mit Folat-Konzentrationen (0 bis 500 µM) untersucht am Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 35 h.

Die NaAsO<sub>2</sub>-induzierte Erhöhung der bereits genannten Parameter konnte durch Co-Inkubation mit verschiedenen Folat-Konzentrationen nicht verhindert werden. Die Zahl der unnatürlichen Mitosen (C-Mitosen) blieb unverändert, Mikrokerne, Apoptosen und Mitosen insgesamt traten sogar vermehrt auf (Abb. 58.2).



**Abb. 58.2:** Inzidenz mikrokernhaltiger Zellen, C-Mitosen, Mitosen und Apoptosen in L5178Y-Zellen pro 1000 insgesamt ausgezählten Zellen nach Inkubation mit 4 µM NaAsO<sub>2</sub> simultan mit Folat-Konzentrationen (0 bis 500 µM) untersucht am Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 35 h.

## 5. Diskussion

Es gibt heute eine Vielzahl von Testsystemen, die schadstoffinduzierte DNA-Schäden detektieren. Als modernes Verfahren zur Untersuchung auf gentoxisches Potential verschiedenster Substanzen wird heute häufig der sogenannte Comet Assay, auch Einzelzellgelelektrophorese (Single cell gel electrophoresis, SCG) genannt, routinemäßig eingesetzt. Dieses *in-vitro*-Verfahren eignet sich vorzüglich als Screening-Methode, da aufgrund des einfachen und schnellen Versuchsaufbaus, eine große Zahl an Proben bearbeitet werden kann. Es wird dazu jeweils nur eine geringe Menge an Zellen aus Zellkultur, Blut oder Gewebeproben benötigt, die direkt auf DNA-Schäden untersucht werden kann, d.h. es werden individuelle, nicht proliferierende Zellen untersucht. Die hier angewandte alkalische SCG kann Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA sowie abasische Stellen in einzelnen Zellen nachweisen, indem nach entsprechender Schädigung die Wanderung der denaturierten DNA aus dem Kern im elektrischen Feld verfolgt wird.

Gerade vor dem Hintergrund der enormen Popularität dieses Testsystems zur Erfassung möglicher gentoxischer Effekte von Substanzen stellte sich die vorliegende Arbeit die Aufgabe, mögliche Fehlinterpretationen bei alleiniger Anwendung der SCG durch die Entwicklung einer Kombination verschiedener Testsysteme zu verhindern. Die Wanderung von DNA im elektrischen Feld nach Schadstoffinkubation muss nämlich nicht zwingend auf einem gentoxischen Effekt beruhen, sondern kann auch auf DNA-Frakturierung im Rahmen eines apoptotischen Prozesses zurückgehen. Häufig wird davon ausgegangen, dass apoptotische Zellen in der SCG charakteristische große und diffuse Kometen zeigen, die eine eindeutige Zuordnung erlauben und eine Fehlinterpretation als gentoxischer Effekt verhindern. Möglicherweise existiert jedoch auf dem Weg zu diesem charakteristischen mikroskopischen Bild („Ghost Cell“) ein Zeitfenster, in dem die Kometen fälschlicherweise als gentoxischer Schaden interpretiert werden. Diese Möglichkeit sollte durch Schadstoffinkubation in verschiedenen Konzentrationen und über verschiedene Zeiträume am Beispiel von Arsen ( $\text{NaAsO}_2$ ) an Mauslymphomzellen (L5178Y) aufgezeigt werden. Um den tatsächlichen Zeitpunkt früher Apoptosen genauer definieren zu können, wurden parallel zur SCG durchflusszytometrische Daten erhoben, und es erfolgte jeweils eine mikroskopische Auszählung der Apoptosen und Mitosen nach Acridinorange-Färbung. Durch die Ermittlung des



Anteils mikrokernhaltiger Zellen wurde ein aussagekräftiger Endpunkt für potenzielle gentoxische Effekte erfasst. Mikrokerne entstehen entweder durch den Versuch einer vitalen und teilungsaktiven Zelle, genetischen Schaden zu reparieren, oder bei Schädigung des Mitosevorganges. Fehlende Mikrokerninduktion im Zeitverlauf bei vorhandener Proliferation spricht also gegen aneugene oder klastogene Effekte des zugeführten Schadstoffes und macht bei Wanderung von DNA-Fragmenten in der SCG einen apoptotischen nekrotischen oder zytotoxischen Prozess als Ursache wahrscheinlich.

Zur Beurteilung ob der Comet Assay eine geeignete Methode für die Detektion NaAsO<sub>2</sub>-induzierter DNA-Schäden ist, war eine Modellschubstanz nötig, die anerkanntermaßen kaum Apoptosen induziert. Eine solche Schubstanz konnte mit Methylmethansulfonat (MMS) identifiziert werden (Brink, Schulz et al. 2006). Über einen Zeitraum von 4 h beobachtet, induzierte MMS in einer Dosis, die noch nicht zytotoxisch war, DNA-Strangbrüche. Bei der Auswertung des prozentualen Anteils der Schadensklassen C0, C1 und C2 war deutlich erkennbar, dass die Schadensklasse C2 kaum vorkam. Dies ist ein Hinweis darauf, dass unter unseren Versuchsbedingungen keine Apoptosen auftraten, da diese vornehmlich in Schadensklasse C2 zu finden gewesen wären (Tice, Agurell et al. 2000; Brink, Schulz et al. 2006). Auch durchflusszytometrische Ergebnisse anderer Gruppen (Brink, Schulz et al. 2006) bestätigen dies. Aus diesen Erkenntnissen konnte also gefolgert werden, dass der Comet Assay MMS-induzierten DNA-Schaden korrekt detektieren und wiedergeben kann und hier keine Ergebnis-Verfälschungen durch Zytotoxizität oder Apoptose-Bildung erwartet werden müssen.

Bei der Untersuchung, ob dies auch für NaAsO<sub>2</sub>-induzierte Schäden gilt, wurden zunächst unterschiedliche Konzentrationen und Inkubationszeiten verwendet. Es sollten Versuchsbedingungen entwickelt werden, bei denen eine beginnende Zytotoxizität ausgeschlossen und die Apoptose-Induktion genau charakterisiert werden konnte. Versuche mit sehr langen Inkubationszeiten (50 h), dafür niedrigeren Konzentrationen (1 bis 50 µM) und Versuche mit kürzeren Inkubationszeiten (27 h), dafür höheren Konzentrationen (1 bis 1000 µM) ergaben, dass unter diesen Bedingungen die Zytotoxizität zu hoch war. Dies zeigte sich sowohl in der inhibierten Proliferation als auch im steilen Anstieg der unnatürlichen Mitosen (C-Mitosen), der Apoptosen und der Mikrokerne. Während die niedrigeren Konzentrationen diese

Parameter noch überhaupt nicht beeinflussten, war bei den höheren Konzentrationen bereits nach kurzen Inkubationszeiten ein Anstieg von „0 auf 100 %“ zu beobachten. DNA-Strangbrüche konnten jedoch auch schon bei Inkubation mit niedrigen NaAsO<sub>2</sub>-Konzentrationen, die auch pathophysiologische Relevanz besitzen, beobachtet werden. Dies stimmt mit Ergebnissen nach Inkubation mit Metallen wie Cadmium oder Chrom überein (Cavigelli, Li et al. 1996; Liu, Guyton et al. 1996; Simeonova, Wang et al. 2000), widerspricht jedoch früheren Beobachtungen (Bau, Wang et al. 2002), die - wie in der vorliegenden Arbeit - NaAsO<sub>2</sub> betreffen.

Aufgrund der wenig geeigneten Ergebnisse nach langen Inkubationszeiten wurde für die folgenden Versuche eine kurze Behandlungsdauer von 4 h gewählt. Es hatte sich gezeigt, dass nach 4 h der DNA-Schaden bereits auf das 2,5-fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht war, nach 5 h dann aber wieder deutlich niedriger war. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen in der Lage sind, durch NaAsO<sub>2</sub> induzierte Strangbrüche mit Hilfe von Basenexzisions-Reparaturmechanismen zu beheben, was für Arsen bereits gezeigt wurde (Sykora 2008), oder dass nach 5 h Inkubation mit 50 µM die Zytotoxizität ebenfalls schon so hoch war, dass diese Zellen im Comet Assay gar nicht mehr sichtbar waren und deshalb dort scheinbar weniger Strangbrüche detektiert wurden (Laparra, Velez et al. 2006).

Bis zum Zeitpunkt 4 h war ein von der zunehmenden Inkubationsdauer abhängiger Anstieg der DNA-Strangbrüche beobachtbar. Die Aufschlüsselung der zum jeweiligen Zeitpunkt auftretenden Schadensklassen zeigte, dass hauptsächlich Zellen der Schadensklasse C1 für den Anstieg der detektierbaren Strangbrüche verantwortlich waren. Nach 3 h waren auch Zellen der Schadensklasse C2 vorhanden, verbunden mit einer Abnahme an C1 Zellen. Dies geht konform mit Effekten, die schon in anderen Zellsystemen beobachtet werden konnten (Wang, Hsu et al. 2001; Brink, Schulz et al. 2006). Nach 6-stündiger Inkubationsdauer war der prozentuale Anteil der migrierten DNA wieder geringer als nach 4 h und der Anteil der Zellen in Schadensklasse C1 und C2, der zwischenzeitlich zugenommen hatte, wieder rückläufig. Dies konnte darauf schließen lassen, dass ab einer Inkubationsdauer von 4 h mit 100 µM NaAsO<sub>2</sub> bereits apoptotische Zellen vorlagen, die im Comet Assay nicht mehr zuverlässig detektierbar waren. Noch deutlicher war dieser Effekt bei der Auswertung der für 8 h inkubierten Zellen. Auch hier lag der Peak der detektierbaren Strangbrüche bei 4 h, danach war der Anteil der migrierten DNA wieder rückläufig.

Auch diese Beobachtungen decken sich mit denen anderer Arbeitsgruppen (Wang, Hsu et al. 2001), die dieses Phänomen darauf zurückführen, dass ein großer Teil der Arsen-induzierten DNA-Strangbrüche aus der Exzision oxidativer DNA-Addukte und DNA-Protein-Crosslinks resultiert und dieser Zustand nur kurz während der Basen-Exzisions-Reparatur existent ist.

Zusätzlich wurde im Zuge dieser Experimente die Apoptosefrequenz bestimmt. Die durchflusszytometrische Messung der toten, der frühen apoptotischen und der späten apoptotischen/nekrotischen Zellen zeigte einen kontinuierlichen Anstieg parallel zur Zunahme der C1-Zellen über den Messzeitraum von 4 h. Eine Messung darüber hinaus war nicht möglich, da die Zytotoxizität wohl schon zu hoch war.

Die in diesen Experimenten gewonnenen Ergebnisse ließen darauf schließen, dass, obwohl die  $\text{NaAsO}_2$ -induzierte Gentoxizität sicher eine Rolle spielt, ein großer Teil der Zellen, die in Schadensklasse C1 einzuordnen waren, Vorläufer von C2-Zellen waren und deshalb nicht in die Quantifizierung des gentoxischen Potentials von  $\text{NaAsO}_2$  einbezogen werden dürfen. Hierfür spricht einerseits die steigende Zahl apoptotischer Zellen im Durchflusszytometer, andererseits die Tatsache, dass C1-Zellen entweder durch Gentoxizität oder durch Apoptose entstehen können. Resultierend daraus können aufgrund solcher Comet Assay-Ergebnisse Substanzen fälschlicherweise als gentoxisch eingeordnet werden, die in Wirklichkeit keine Induktoren der Gentoxizität, sondern der Apoptose sind (Brink, Schulz et al. 2006).

Abschließend lässt sich sagen, dass die Detektion von DNA-Schäden im Comet Assay induziert durch  $\text{NaAsO}_2$  anfällig für Fehlinterpretationen ist. Sie muss auf jeden Fall unter Hinzuziehung einer jeweils geeigneten Positivkontrolle und unter paralleler Messung der Apoptose-Frequenz und der Vitalität der Zellen durchgeführt werden. Des Weiteren ist es von Nachteil, den Schaden nur zu einem einzigen Zeitpunkt zu quantifizieren, da die Effekte von  $\text{NaAsO}_2$  sehr zeitabhängig sind. Unter den genannten Voraussetzungen jedoch ist der hier verwendete alkalische Comet Assay eine geeignete Methode, DNA-Strangbrüche und auch abasische Stellen, induziert durch  $\text{NaAsO}_2$ , zu detektieren.

Die im ersten Teil der Arbeit gewonnenen Ergebnisse bezüglich der Eignung des Comet Assay zur Beurteilung der Gentoxizität von  $\text{NaAsO}_2$  wurden als abgeschlossene Experimentreihe zu sehen und wurden nicht auf den zweiten Teil der Arbeit, der sich mit Modulatoren des oxidativen Stress und der DNA-Methylierung befasst, übertragen.

Die Mechanismen, durch die NaAsO<sub>2</sub> seine mutagenen und karzinogenen Effekte ausübt, sind schon seit geraumer Zeit Gegenstand der Forschung, sind aber bis heute noch nicht endgültig aufgeklärt. Es werden jedoch verschiedene Ansätze wie zum Beispiel die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (Sinha, Dey et al. 2007) oder Veränderung des epigenetischen Musters der DNA diskutiert (Simeonova, Wang et al. 2000). Diese beiden Mechanismen wurden im Zuge dieser Arbeit untersucht.

Die nicht dosisabhängige Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies in Verbindung mit unnatürlichen Mitose-Zyklen, Zellzyklusarrest und daraus resultierender Zytotoxizität wurde bereits früher beobachtet (Laparra, Velez et al. 2006). Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies nach Behandlung mit NaAsO<sub>2</sub> konnte in zwei verschiedenen Zellsystemen, nämlich HL60- und L5178Y-Zellen, beobachtet werden. In beiden Zelllinien war eine zwar dosisunabhängige aber deutliche Induktion von oxidativem Stress durch Arsen in Konzentrationen, die im Trinkwasser mancher Regionen tatsächlich erreicht werden können (Pi, Kumagai et al. 2000), erkennbar. Mit Hilfe verschiedener Substanzen, die entweder für ihre prooxidativen oder für ihre antioxidativen Eigenschaften bekannt sind, wurde nun untersucht, ob eine NaAsO<sub>2</sub>-induzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies tatsächlich verantwortlich ist für die chromosomalen Aberrationen und die Apoptose-Induktion. Der prooxidative Effekt von 4-Nitrochinolin-1-Oxid (NQO), das Superoxid und Wasserstoffperoxid freisetzt, war bei der durchflusszytometrischen Messung des oxidativen Stress deutlich erkennbar. Ebenso zeigte die mikroskopische Auswertung einen deutlichen Anstieg der mikrokernhaltigen Zellen bei Simultanbehandlung mit NQO und NaAsO<sub>2</sub>. Diese Ergebnisse bestätigen die Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls einen Anstieg chromosomaler Aberrationen unter diesem Behandlungsregime beobachten konnten (Lee, Tzeng et al. 1986). Da dieser Effekt zwar bei der Kombination NaAsO<sub>2</sub> mit NQO auftrat, nicht aber zum Beispiel, wenn NaAsO<sub>2</sub> zusammen mit dem alkylierenden Agens Methylmethansulfonat (MMS) inkubiert wurde, war dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Freisetzung oxidativer Sauerstoffspezies der zugrundeliegende Mechanismus dieser Effekte ist. Des Weiteren wurden drei potenzielle Antioxidantien untersucht, die ihre Effekte auf völlig unterschiedliche Art und Weise ausüben und die zur Nahrungsergänzung eingenommen werden können.

Für Benfotiamin, ein lipophiles Prodrug von Vitamin B<sub>1</sub>, werden verschiedene Wirkmechanismen diskutiert wie zum Beispiel Aktivierung der Transketolase oder Anregung bzw. Normalisierung von verschiedenen Signalwegen. Seit kurzem existieren auch Daten, die auf eine direkte antioxidative Kapazität von Benfotiamin *in vitro* und in zellfreien Systemen wie dem FRAP Assay hinweisen (Schmid 2008). Diese Daten decken sich mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen, da auch hier eine Wirksamkeit von Benfotiamin bei Simultaninkubation mit NaAsO<sub>2</sub> beobachtet werden konnte. Außerdem wirkte Benfotiamin auch präventiv gegenüber Arsen-induzierten chromosomalen Aberrationen, die unserer Hypothese zufolge die Spätfolgen der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sind. Dies war erkennbar in der Anzahl der Mikrokerne, die mit steigender Benfotiamin-Konzentration kontinuierlich sank. Auch dies spricht für die Beteiligung von ROS, da ja, wie schon erwähnt, MMS als methylierendes Agens nicht in der Lage war, sich auf den durch NaAsO<sub>2</sub> induzierten Schaden auszuwirken, wohingegen Benfotiamin präventiv sowohl auf die Freisetzung der Radikale als auch auf die daraus resultierenden DNA-Schäden wirkte. Dies konnte im Zuge dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden.

Einen anderen antioxidativen Wirkmechanismus besitzt N-Acetylcystein (NAC). Es besitzt auch direkte antioxidative Eigenschaften, wirkt aber wohl hauptsächlich über die Auffüllung endogener Glutathion-Speicher, dessen Vorläufer NAC ist (Atkuri, Mantovani et al. 2007). NaAsO<sub>2</sub>-induzierte GSH-Depletion durch oxidative Schäden und deren Prävention durch NAC konnte bereits in Zellen des Spinalganglions nachgewiesen werden (Chao, Fan et al. 2007). Dort wurde außerdem eine Herunterregulation zweier Enzyme, des Heat Shock Proteins 70 und der Häm-Oxygenase, gemessen, die in Zusammenhang mit durch oxidativen Stress induzierten Schäden gebracht werden. Des Weiteren existieren *in-vivo*-Ergebnisse, die zeigen, dass die Behandlung durch Arsen hervorgerufenem oxidativen Stress mit NAC in Ratten zu einer Wiederauffüllung der GSH-Speicher führt (Flora 1999). Darüber hinaus ist ein Fall beschrieben, bei dem ein Mann nach einer lebensgefährlichen Arsen-Intoxikation mit NAC behandelt wurde und nach einer Woche aus dem Krankenhaus entlassen werden konnte (Martin, Willis et al. 1990). Hier existieren zwar keine sonstigen Parameter betreffend die Glutathionspiegel, die Wirksamkeit von NAC bei durch Arsen hervorgerufenen Schäden ist jedoch deutlich ersichtlich. Auch in den von uns verwendeten L5178Y-Zellen konnte die NaAsO<sub>2</sub>-

induzierte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies durch NAC inhibiert werden. Eine leichte Abnahme der mikrokernhaltigen Zellen war ebenfalls erkennbar, allerdings war der Effekt nicht so stark wie bei der Co-Inkubation mit Benfotiamin. Trotzdem konnte auch aus den Versuchen mit NAC geschlossen werden, dass ein möglicher Mechanismus für die NaAsO<sub>2</sub>-induzierten Schäden über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt.

Als letzte Substanz zur Prüfung der Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an der durch NaAsO<sub>2</sub> hervorgerufenen Schadensentstehung wurde das als Antioxidans anerkannte Vitamin E herangezogen. Vitamin E ist keine einheitliche Substanz, sondern der Trivialname für eine Mischung aus 8 Verbindungen, von denen  $\alpha$ -Tocopherol die aktivste ist. Vitamin E ist ein gebräuchliches Nahrungsergänzungsmittel und wird vor allem zur Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Atherosklerose und Krebserkrankungen im Rahmen der Selbstmedikation eingenommen. Schon seit langem ist bekannt, dass Vitamin E die der Lipidperoxidation zugrunde liegende Radikalkettenreaktion unterbrechen kann, indem es selbst zum Radikal oxidiert wird. Das Vitamin-E-Radikal kann durch andere im Körper vorkommende Antioxidantien, wie zum Beispiel Ascorbinsäure oder auch Glutathion, wieder zu Vitamin E reduziert werden, das dann wieder antioxidativ wirksam ist. Deshalb wird Vitamin E oft mit Erfolg in der Forschung als Antioxidans eingesetzt; daneben ist es als Nahrungsergänzungsmittel förderlich (Traber, Frei et al. 2008).

Studien belegen, dass eine Supplementierung mit Vitamin E sowohl *in vitro* (Chen, Cao et al. 2002) als auch *in vivo* (Ramanathan, Anusuyadevi et al. 2005) adversen Effekten, ausgeübt durch unterschiedliche Arsenverbindungen, entgegenwirken kann. Dazu gehören zum Beispiel die Normalisierung der Aktivität von antioxidativen Enzymen wie der Superoxiddismutase, der Catalase und der Glutathionperoxidase (Mittal and Flora 2007), die Normalisierung des TNF- $\alpha$ -Spiegels und die Inhibierung der Aktivierung der Caspase-Spiegel (Ramanathan, Anusuyadevi et al. 2005). Unsere Ergebnisse zeigten, dass Vitamin E ein potenter Inhibitor der NaAsO<sub>2</sub>-induzierten Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies ist. Des Weiteren konnten die Apoptosen, die durch NaAsO<sub>2</sub> verursacht wurden, bei Co-Inkubation mit Vitamin E verringert werden. Die beobachtete Inhibierung der Ausschüttung von ROS könnte in dieser geringeren Apoptosefrequenz resultieren. Ähnliches konnte auch schon in Ratten gezeigt werden (Ramanathan, Anusuyadevi et al. 2005). Zusätzlich wurde

noch die Zahl der mikrokernhaltigen Zellen am Fluoreszenzmikroskop bestimmt; auch hier war ein deutlicher Rückgang bei Simultanbehandlung von NaAsO<sub>2</sub> und Vitamin E erkennbar. Die Tatsache, dass Vitamin E auch der Lage war, Arsen-induzierte und über die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies hervorgerufene chromosomale Spätschäden zu verringern, konnte im Zuge dieser Arbeit zum ersten Mal nachgewiesen werden.

Nach den viel versprechenden Ergebnissen bezüglich einer Beteiligung von oxidativem Stress an der Verursachung NaAsO<sub>2</sub>-induzierter DNA-Schäden, wurde mit der Untersuchung von Veränderungen der DNA-Methylierung noch ein weiterer, ebenfalls für Arsen diskutierter Mechanismus mit Hilfe von Modulatoren untersucht. Die Messung des Methylierungsstatus nach Behandlung der L5178Y-Zellen mit NaAsO<sub>2</sub> ergab eine deutliche Hypomethylierung im Vergleich zu unbehandelten Zellen, ein Effekt, der auch schon früher beobachtet wurde (Reichard, Schnekenburger et al. 2007). Den Nachweis, dass das von uns eingesetzte und eine Hypomethylierung auslösende NaAsO<sub>2</sub> den gleichen Wirkmechanismus besitzt wie die bereits besser untersuchte Substanz 5-Azacytidin (Khan, Schmidt-Mende et al. 2008), erbrachte mit der weiteren Verringerung der methylierten CpG-Inseln der Versuch einer Co-Inkubation mit NaAsO<sub>2</sub> und 5-Azacytidin. Die ebenfalls untersuchte Apoptoserate zeigte eine Erhöhung bereits bei einer Inkubation mit 5-Azacytidin alleine und eine weit deutlichere Erhöhung bei Simultaninkubation der beiden Substanzen. Zusätzlich zu der Erhöhung der Apoptosefrequenz vervierfachte sich auch die Anzahl der mikrokernhaltigen Zellen in Proben, die mit beiden Substanzen gleichzeitig behandelt wurden. All diese Parameter ließen darauf schließen, dass NaAsO<sub>2</sub> tatsächlich einen Einfluss auf die epigenetischen Strukturen hat. Die hervorgerufene Hypomethylierung könnte sehr wohl in einer deutlichen Erhöhung der Apoptose- und Mikrokernfrequenz resultieren.

Es ist bekannt, dass NaAsO<sub>2</sub> sich neben seinen Haupteffekten wie der Generation von oxidativem Stress, der Inhibition der DNA-Reparatur und der Modulation von Signalkaskaden in einer Depletion des wichtigsten Methyl donors für die DNA, nämlich S-Adenosylmethionin (SAM), auswirkt (Ramirez, Eastmond et al. 1997), was wiederum unserer Hypothese zufolge in der Entstehung von Apoptosen und chromosomalen Aberrationen resultiert. SAM wurde nun im Hinblick darauf untersucht, ob es in der Lage ist, die durch NaAsO<sub>2</sub> hervorgerufene DNA-Hypomethylierung und die postulierten Spätfolgen wie zum Beispiel Apoptose- oder

Mikrokern-Induktion durch Bereitstellung von Methylgruppen wieder auszugleichen. Die Reduktion mikrokernhaltiger Zellen nach Behandlung mit  $\text{NaAsO}_2$  und SAM konnte bereits in humanen Fibroblasten beobachtet werden (Ramirez, Stopper et al. 2007).

SAM war in der durchflusszytometrischen Bestimmung des Methylierungsstatus in der Lage, die Anzahl der methylierten CpG-Inseln fast wieder auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle zu erhöhen. Dies war ein deutlicher Hinweis auf die Beteiligung der DNA-Methylierung an den  $\text{NaAsO}_2$ -bedingten Effekten. Die Zahl der mikrokernhaltigen Zellen wurde durch Co-Inkubation mit SAM ebenfalls stark vermindert. SAM konnte somit nicht nur den potenziellen Auslöser für chromosomale Aberrationen, nämlich die Hypomethylierung der DNA, verhindern, sondern auch die daraus resultierenden Spätfolgen deutlich reduzieren, was sich in der gesunkenen Mikrokernrate manifestierte.

Zuletzt sollte mit Folat noch eine weitere Substanz mit möglichem Einfluss auf den DNA-Methylierungsstatus getestet werden. War SAM der direkte Methylgruppen-Donor der DNA, ist Folat die Verbindung, die für den Transfer von C1-Einheiten verantwortlich ist, wobei eine Methylgruppe entsteht, die auf SAM übertragen werden kann. SAM wiederum überträgt dann die Methylgruppe an die DNA. Ferner existieren Studien, die belegen, dass in menschlichen Lymphozyten, die mit niedrigen Folsäure-Konzentrationen kultiviert werden, vermehrt chromosomale Strangbrüche auftreten (Sutherland 1979). Ebenso ist bekannt, dass bei Personen mit niedrigen Folsäurespiegeln in Lymphozyten, Erythrozyten und Knochenmarkzellen erhöhte Mikrokernfrequenzen und vermehrt chromosomale Strangbrüche auftreten (MacGregor, Wehr et al. 1997). Die Vermutung lag also nahe, dass auch eine Folat-Behandlung durch die Verhinderung oder Verminderung der  $\text{NaAsO}_2$ -bedingten Hypomethylierung solche Schäden verhindern könnte: dies entweder einfach durch die Bereitstellung von Methylgruppen (Glynn and Albanes 1994) oder auch durch die reduktive Methylierung von  $\text{NaAsO}_2$  und die daraus resultierende Detoxifizierung (Pourahmad, Rabiei et al. 2005). Die im Laufe dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten zum ersten Mal, dass Folat den Methylierungsstatus nach Behandlung mit  $\text{NaAsO}_2$  und der daraus resultierenden Hypomethylierung wieder normalisieren konnte, wenn es auch nicht so potent war wie SAM. Auf die Zahl der Apoptosen und der mikrokernhaltigen Zellen hatte die Inkubation von Folat zusätzlich zu  $\text{NaAsO}_2$  keine Auswirkung, die erhöhten Level konnten nach 35-stündiger



Inkubation durch Folat nicht gesenkt werden. Epigenetische Veränderungen benötigen meist längere Behandlungszeiten, um sich manifestieren zu können, als schnelle Effekte wie zum Beispiel die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies. Ein weiterer Mitosezyklus hätte einen eventuell vorhandenen Effekt möglicherweise noch sichtbar gemacht, wenn Arsen nach derart langen Inkubationszeiten die Proliferation nicht bereits vollständig inhibieren würde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durch  $\text{NaAsO}_2$  induzierte Gentoxizität sehr schwer zu charakterisieren und zu quantifizieren ist. Ein Standard-Gentoxizitätstest wie der Comet Assay gibt nur unter bestimmten, sehr eng gefassten Rahmenbedingungen den hervorgerufenen DNA-Schaden korrekt wieder, weil andere Parameter wie Zytotoxizität, Apoptose-Induktion und auch während der Basenexzisionsreparatur zeitweise vermehrt auftretende DNA-Strangbrüche ein gentoxisches Potential vorspiegeln, das vermutlich so gar nicht existiert. Im Zuge dieser Studie wurden verschiedene Möglichkeiten aufgezeigt, mit deren Hilfe im Comet Assay erzielte Ergebnisse korrekt ausgewertet werden können. Dazu zählen vor allem: parallel durchzuführende Vitalfärbungen, um Einflüsse der Zytotoxizität eliminieren zu können, Apoptose-Messung, um gegebenenfalls solche Zellen bei der Auswertung ausschließen zu können, die Mitführung einer geeigneten Positivkontrolle sowie Messungen über einen ganzen Konzentrationsbereich zu verschiedenen Zeitpunkten, um auch den verfälschenden Einfluss der Basenexzisionsreparatur zu vermeiden. Unter diesen Voraussetzungen kann der Comet Assay, der aufgrund seiner schnellen und einfachen Durchführung sehr beliebt ist, für die Charakterisierung des gentoxischen Potentials einer Substanz, als eine geeignete und verlässliche Methode angesehen werden.

Der Nachweis von  $\text{NaAsO}_2$ -induzierten DNA-Schäden warf die Frage auf, durch welchen Mechanismus diese Schäden zustande kommen. Die Literaturrecherche lieferte mit der Freisetzung freier Radikale oder der epigenetischen Veränderung der DNA zwei potenzielle Wege. Die nachfolgenden Ergebnisse lieferten dann auch viele Hinweise auf die Beteiligung sowohl von oxidativem Stress als auch von epigenetischen Veränderungen der DNA als Mechanismen für die  $\text{NaAsO}_2$ -induzierten DNA-Schäden. Substanzen, die entweder für den einen oder den anderen Mechanismus eine Rolle als Induktor oder Inhibitor spielen, wurden zur genaueren Untersuchung herangezogen. Die als Prooxidans ausgewählte Substanz 4-Nitrochinolin-1-Oxid (NQO) potenzierte sämtliche von  $\text{NaAsO}_2$  induzierten Effekte.

Mit der Hilfe der Antioxidantien Benfotiamin, N-Acetylcystein und Vitamin E hingegen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass diese nicht nur in der Lage sind, die Ausschüttung der reaktiven Sauerstoffspezies zu inhibieren. Es konnte auch gezeigt werden, dass die potenziell daraus entstehenden Spätfolgen wie die Erhöhung der Apoptosefrequenz und die Entstehung chromosomaler Aberrationen verhindert wurden.

Ähnliches galt für den Einfluss der gewählten Modulatoren auf den Methylierungsstatus. Die durch NaAsO<sub>2</sub> induzierte Hypomethylierung konnte durch das ebenfalls für seine hypomethylierenden Effekte bekannte 5-Azacytidin verstärkt, durch die Methylgruppen-Donoren S-Adenosylmethionin (SAM) und Folat hingegen fast vollständig inhibiert werden. Die weiteren Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Effekte auf die Apoptose- und Mikrokernraten bei SAM weniger ausgeprägt als die der Antioxidantien waren. Hier wäre der Einfluss der Inkubationsdauer noch gesondert zu untersuchen.

In der vorliegenden Studie wurden wesentliche neue Erkenntnisse gewonnen, die zur Aufklärung der NaAsO<sub>2</sub>-induzierten Effekte einschließlich möglicher Quantifizierungsmethoden sowie der zugrunde liegenden Mechanismen beitragen. Des Weiteren wurden verschiedene Substanzen identifiziert, die als Additiva zur täglichen Ernährung in Frage kommen oder bereits eingesetzt werden und so das Krebsrisiko bei Arsen-exponierten Personen unter Umständen minimieren könnten. Bevor ein solcher Ansatz jedoch empfohlen werden könnte, bleiben viele Aspekte, die noch der Aufklärung bedürfen.

## 6. Zusammenfassung

Arsen ist dafür bekannt, dass es mutagen und kanzerogen wirkt und ein gentoxisches Potential besitzt. Die Mechanismen, durch die diese Effekte ausgeübt werden, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Parameter, die mit der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), z.B. Superoxiddismutaseaktivität und Hämoxygenase-Genexpression, und Veränderungen des epigenetischen Musters der DNA, z.B. Depletion von S-Adenosylmethionin, in Zusammenhang stehen, durch Arsen beeinflusst werden.

In dieser Studie wurde versucht, das gentoxische Potential von Arsen mit Hilfe des Comet Assay, eines Standard-Gentoxizitätstests, zu charakterisieren sowie zu prüfen, ob dieser Test eine geeignete Messmethode für die gentoxische Wirkung von Arsen darstellt. Dies wurde unter Heranziehung verschiedener additiver Messgrößen wie der Vitalität und der Proliferation sowie der parallelen Quantifizierung der Mitose-, C-Mitose-, Mikrokern- und Apoptosefrequenzen der verwendeten murinen L5178Y-Zellen durchgeführt.

Des Weiteren wurde der den Arsen-bedingten DNA-Schäden zugrundeliegende Mechanismus genauer beleuchtet. Unter Zuhilfenahme verschiedener Modulatoren wurden durch Arsen induzierter oxidativer Stress und durch Arsen induzierte Veränderung der epigenetischen DNA-Struktur untersucht. Ferner wurde geprüft, inwieweit die Inhibition von oxidativem Stress und Hypomethylierung der DNA zur Verringerung von potenziellen Folgen wie der Entstehung unnatürlicher Mitosemorphologien und chromosomaler Aberrationen beitragen können, die wiederum eventuell in der Entstehung von Karzinomen resultieren können.

Für die Modulation der Freisetzung von ROS wurden als prooxidative Substanz 4-Nitrochinolin-1-Oxid und als Antioxidantien Benfotiamin (Vitamin-B<sub>1</sub>-Prodrug), N-Acetylcystein (NAC) und  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) ausgewählt. Das Methylierungsmuster der DNA sollte durch das hypomethylierende Agens 5-Azacytidin und durch die potenziell hypermethylierenden Verbindungen S-Adenosylmethionin (SAM) und Folat beeinflusst werden.

Die Untersuchungen bezüglich des gentoxischen Potentials von Arsen und die Eignung des Comet Assay für dessen Quantifizierung ergaben, dass unter Miteinbeziehung der erwähnten additiven Parameter und der Quantifizierung nach Behandlung mit unterschiedlichen Arsen-Konzentrationen nach unterschiedlich langen Behandlungszeiten die im Comet Assay erzielten Werte als korrekt und

---

zuverlässig angesehen werden können. Des Weiteren zeigten die Untersuchungen der Freisetzung von ROS und der Veränderung des DNA-Methylierungsmusters mit Hilfe von Modulatoren, dass beide Mechanismen an den Arsen-induzierten Effekten beteiligt sind. Nicht nur konnte mit Hilfe der Modulatoren jeweils die Inhibition der Freisetzung von ROS und der DNA-Hypomethylierung erreicht werden, es konnte zudem gezeigt werden, dass die Substanzen auch die Reduktion der erhöhten Anzahl unnatürlicher Mitosemorphologien und chromosomaler Aberrationen bewirkten.

Dieser Zusammenhang konnte in dieser Studie zum ersten Mal aufgezeigt werden und könnte im Hinblick auf die potenzielle Erniedrigung der Krebsinzidenzen durch Supplementierung der Bevölkerung in Gebieten mit Arsen-belastetem Trinkwasser mit den genannten Modulatoren von Bedeutung sein.

## 7. Literaturverzeichnis

- (2006). "Benfotiamine. Monograph." Altern Med Rev **11**(3): 238-42.
- Abernathy, C. O., Y. P. Liu, et al. (1999). "Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues." Environ Health Perspect **107**(7): 593-7.
- Akerlund, B., C. Jarstrand, et al. (1996). "Effect of N-acetylcysteine(NAC) treatment on HIV-1 infection: a double-blind placebo-controlled trial." Eur J Clin Pharmacol **50**(6): 457-61.
- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Forth, W. (2006). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban & Fischer Bei Elsevier.
- Anderson, K. C., L. H. Boise, et al. (2002). "Arsenic trioxide in multiple myeloma: rationale and future directions." Cancer J **8**(1): 12-25.
- Anderson, K. J., E. G. Leighty, et al. (1972). "Evaluation of herbicides for possible mutagenic properties." J Agric Food Chem **20**(3): 649-56.
- Aposhian, H. V. (1997). "Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 397-419.
- Aruoma, O. I., B. Halliwell, et al. (1989). "The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid." Free Radic Biol Med **6**(6): 593-7.
- Atkuri, K. R., J. J. Mantovani, et al. (2007). "N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency." Curr Opin Pharmacol **7**(4): 355-9.
- Attwood, J. T., R. L. Yung, et al. (2002). "DNA methylation and the regulation of gene transcription." Cell Mol Life Sci **59**(2): 241-57.
- Babcock, D. F., J. Herrington, et al. (1997). "Mitochondrial participation in the intracellular Ca<sup>2+</sup> network." J Cell Biol **136**(4): 833-44.
- Bachleitner-Hofmann, T., M. Kees, et al. (2002). "Arsenic trioxide: acute promyelocytic leukemia and beyond." Leuk Lymphoma **43**(8): 1535-40.
- Bailleul, B., S. Galiegue, et al. (1981). "Adducts from the reaction of O,O'-diacetyl or O-acetyl derivatives of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide with purine nucleosides." Cancer Res **41**(11 Pt 1): 4559-65.
- Basu, A., J. Mahata, et al. (2001). "Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review." Mutat Res **488**(2): 171-94.

- Bau, D. T., T. S. Wang, et al. (2002). "Oxidative DNA adducts and DNA-protein cross-links are the major DNA lesions induced by arsenite." Environ Health Perspect **110 Suppl 5**: 753-6.
- Beltramo, E., E. Berrone, et al. (2004). "Thiamine and benfotiamine prevent increased apoptosis in endothelial cells and pericytes cultured in high glucose." Diabetes Metab Res Rev **20**(4): 330-6.
- Bendich, A. and L. J. Machlin (1988). "Safety of oral intake of vitamin E." Am J Clin Nutr **48**(3): 612-9.
- Benson, A. M. (1993). "Conversion of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) to 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide by a dicumarol-resistant hepatic 4NQO nitroreductase in rats and mice." Biochem Pharmacol **46**(7): 1217-21.
- Berrone, E., E. Beltramo, et al. (2006). "Regulation of intracellular glucose and polyol pathway by thiamine and benfotiamine in vascular cells cultured in high glucose." J Biol Chem **281**(14): 9307-13.
- Borgono, J. M., P. Vicent, et al. (1977). "Arsenic in the drinking water of the city of Antofagasta: epidemiological and clinical study before and after the installation of a treatment plant." Environ Health Perspect **19**: 103-5.
- Bosco, P., R. M. Gueant-Rodriguez, et al. (2003). "Methionine synthase (MTR) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome." Am J Med Genet A **121**(3): 219-24.
- Brink, A., B. Schulz, et al. (2006). "Time-dependent effects of sodium arsenite on DNA breakage and apoptosis observed in the comet assay." Mutat Res **603**(2): 121-8.
- Cai, X., Y. Yu, et al. (2003). "Arsenic trioxide-induced mitotic arrest and apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells." Leukemia **17**(7): 1333-7.
- Cancer, I. A. f. R. o. (1980). "Some metals and metallic compounds." Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans(23): 1-415.
- Cantoni, G. L. (1985). "The role of S-adenosylhomocysteine in the biological utilization of S-adenosylmethionine." Prog Clin Biol Res **198**: 47-65.
- Cavigelli, M., W. W. Li, et al. (1996). "The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase." Embo J **15**(22): 6269-79.

- Cebrian, M. E., A. Albores, et al. (1983). "Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico." Hum Toxicol **2**(1): 121-33.
- Chao, P. L., S. F. Fan, et al. (2007). "N-acetylcysteine attenuates arsenite-induced oxidative injury in dorsal root ganglion explants." Ann N Y Acad Sci **1122**: 276-88.
- Chen, A., E. H. Cao, et al. (2002). "Arsenite-induced reactive oxygen species and the repression of alpha-tocopherol in the MGC-803 cells." Eur J Pharmacol **448**(1): 11-8.
- Chen, C. J., C. W. Chen, et al. (1992). "Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water." Br J Cancer **66**(5): 888-92.
- Chen, R. Z., U. Pettersson, et al. (1998). "DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates." Nature **395**(6697): 89-93.
- Cheng, H. Y., P. Li, et al. (2004). "Arsenic inhibition of the JAK-STAT pathway." Oncogene **23**(20): 3603-12.
- Chiang, P. K., R. K. Gordon, et al. (1996). "S-Adenosylmethionine and methylation." Faseb J **10**(4): 471-80.
- Chow, C. K. (1985). "Vitamin E and blood." World Rev Nutr Diet **45**: 133-66.
- Christensen, B. (1996). "[Folate deficiency, cancer and congenital abnormalities. Is there a connection?]." Tidsskr Nor Laegeforen **116**(2): 250-4.
- Christiansen, D. H., M. K. Andersen, et al. (2003). "Methylation of p15INK4B is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia." Leukemia **17**(9): 1813-9.
- Christman, J. K., N. Mendelsohn, et al. (1983). "Effect of 5-azacytidine on differentiation and DNA methylation in human promyelocytic leukemia cells (HL-60)." Cancer Res **43**(2): 763-9.
- Chuang, L. S., H. I. Ian, et al. (1997). "Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1." Science **277**(5334): 1996-2000.
- Corporation, S. A. I. (1987). "Estimated national occurrence and exposure to arsenic in public drinking water supplies." US Environmental Protection Agency, Washington DC.
- Cotgreave, I. A. (1997). "N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications." Adv Pharmacol **38**: 205-27.

- Council, N. R. (1999). "Arsenic in drinking water." Washington DC, National Academy Press.
- Council, N. R. (2001). "Arsenic in drinking water 2001 update." Washington DC, National Academy Press.
- Dekhuijzen, P. N. (2004). "Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease." Eur Respir J **23**(4): 629-36.
- Dopp, E., L. M. Hartmann, et al. (2004). "Environmental distribution, analysis, and toxicity of organometal(loid) compounds." Crit Rev Toxicol **34**(3): 301-33.
- Dopp, E., L. M. Hartmann, et al. (2004). "Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells." Toxicol Appl Pharmacol **201**(2): 156-65.
- Droge, W., H. P. Eck, et al. (1992). "HIV-induced cysteine deficiency and T-cell dysfunction--a rationale for treatment with N-acetylcysteine." Immunol Today **13**(6): 211-4.
- Ficsor, G. "Survey of pesticides for mutagenicity by the bacterial plate assay method." Newsletter of the Environmental Mutagen Society **6**: 6-11.
- Flora, S. J. (1999). "Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of N-acetylcysteine and meso 2,3-dimercaptosuccinic acid in rats." Clin Exp Pharmacol Physiol **26**(11): 865-9.
- Fritsma, G. A. (1983). "Vitamin E and autoxidation." Am J Med Technol **49**(6): 453-6.
- Gadai, S., C. Emanuelli, et al. (2006). "Benfotiamine accelerates the healing of ischaemic diabetic limbs in mice through protein kinase B/Akt-mediated potentiation of angiogenesis and inhibition of apoptosis." Diabetologia **49**(2): 405-20.
- Germolec, D. R., J. Spalding, et al. (1997). "Arsenic can mediate skin neoplasia by chronic stimulation of keratinocyte-derived growth factors." Mutat Res **386**(3): 209-18.
- Glover, A. B. and B. Leyland-Jones (1987). "Biochemistry of azacitidine: a review." Cancer Treat Rep **71**(10): 959-64.
- Glynn, S. A. and D. Albanes (1994). "Folate and cancer: a review of the literature." Nutr Cancer **22**(2): 101-19.
- Griffith, O. W. and A. Meister (1979). "Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(11): 5606-10.



- Gronbaek, K., C. Hother, et al. (2007). "Epigenetic changes in cancer." *Apmis* **115**(10): 1039-59.
- Gurr, J. R., Y. C. Lin, et al. (1993). "Induction of chromatid breaks and tetraploidy in Chinese hamster ovary cells by treatment with sodium arsenite during the G2 phase." *Mutat Res* **319**(2): 135-42.
- Hammes, H. P., X. Du, et al. (2003). "Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy." *Nat Med* **9**(3): 294-9.
- Haque, R., D. N. Mazumder, et al. (2003). "Arsenic in drinking water and skin lesions: dose-response data from West Bengal, India." *Epidemiology* **14**(2): 174-82.
- Hartwig, A. and T. Schwerdtle (2002). "Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications." *Toxicol Lett* **127**(1-3): 47-54.
- Healy, S. M., E. A. Casarez, et al. (1998). "Enzymatic methylation of arsenic compounds. V. Arsenite methyltransferase activity in tissues of mice." *Toxicol Appl Pharmacol* **148**(1): 65-70.
- Hei, T. K., S. X. Liu, et al. (1998). "Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: role of reactive oxygen species." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14): 8103-7.
- Herman, J. G. and S. B. Baylin (2003). "Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation." *N Engl J Med* **349**(21): 2042-54.
- Hinwood, A. L., M. R. Sim, et al. (2004). "Exposure to inorganic arsenic in soil increases urinary inorganic arsenic concentrations of residents living in old mining areas." *Environ Geochem Health* **26**(1): 27-36.
- Hozumi, M. (1969). "Production of hydrogen peroxide by 4 hydroxyaminoquinoline 1-oxide." *Gann* **60**(1): 83-90.
- Huang, C., Q. Ke, et al. (2004). "Molecular mechanisms of arsenic carcinogenesis." *Mol Cell Biochem* **255**(1-2): 57-66.
- Huang, R. N., I. C. Ho, et al. (1995). "Sodium arsenite induces chromosome endoreduplication and inhibits protein phosphatase activity in human fibroblasts." *Environ Mol Mutagen* **25**(3): 188-96.
- Huang, S., C. F. Huang, et al. (2000). "Induction of mitosis-mediated apoptosis by sodium arsenite in HeLa S3 cells." *Biochem Pharmacol* **60**(6): 771-80.
- Huang, S. C. and T. C. Lee (1998). "Arsenite inhibits mitotic division and perturbs spindle dynamics in HeLa S3 cells." *Carcinogenesis* **19**(5): 889-96.

- Hutchinson, J. (1887). "Arsenic cancer." Br Med J(2): 1280-1.
- Hutchinson, J. (1888). "On some examples of arsenic-keratosis of the skin and of arsenic-cancer." Trans Pathol Soc London(39): 352-63.
- Issa, J. P., H. M. Kantarjian, et al. (2005). "Azacitidine." Nat Rev Drug Discov **4**(4): 275-6.
- Iwama, K., S. Nakajo, et al. (2001). "Apoptosis induced by arsenic trioxide in leukemia U937 cells is dependent on activation of p38, inactivation of ERK and the Ca<sup>2+</sup>-dependent production of superoxide." Int J Cancer **92**(4): 518-26.
- Jabbour, E. J. and F. J. Giles (2005). "New agents in myelodysplastic syndromes." Curr Hematol Rep **4**(3): 191-9.
- Jackson, R. and J. W. Grainge (1975). "Arsenic and cancer." Can Med Assoc J **113**(5): 396-401.
- Jing, Y. W., J. Yi, et al. (2004). "Dicoumarol alters cellular redox state and inhibits nuclear factor kappa B to enhance arsenic trioxide-induced apoptosis." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **36**(3): 235-42.
- Jones, P. A. and S. B. Baylin (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." Nat Rev Genet **3**(6): 415-28.
- Jongen, W. M., J. M. Cardinaals, et al. (1985). "Genotoxicity testing of arsenobetaine, the predominant form of arsenic in marine fishery products." Food Chem Toxicol **23**(7): 669-73.
- Kanojia, D. and M. M. Vaidya (2006). "4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis." Oral Oncol **42**(7): 655-67.
- Kasielski, M. and D. Nowak (2001). "Long-term administration of N-acetylcysteine decreases hydrogen peroxide exhalation in subjects with chronic obstructive pulmonary disease." Respir Med **95**(6): 448-56.
- Khan, R., J. Schmidt-Mende, et al. (2008). "Hypomethylation and apoptosis in 5-azacytidine-treated myeloid cells." Exp Hematol **36**(2): 149-57.
- Kharab, P. and I. Singh (1985). "Genotoxic effects of potassium dichromate, sodium arsenite, cobalt chloride and lead nitrate in diploid yeast." Mutat Res **155**(3): 117-20.
- Kitchin, K. T. (2001). "Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites." Toxicol Appl Pharmacol **172**(3): 249-61.

- Kochhar, T. S., W. Howard, et al. (1996). "Effect of trivalent and pentavalent arsenic in causing chromosome alterations in cultured Chinese hamster ovary (CHO) cells." Toxicol Lett **84**(1): 37-42.
- Koh, A. S., T. A. Simmons-Willis, et al. (2002). "Identification of a mechanism by which the methylmercury antidotes N-acetylcysteine and dimercaptopropanesulfonate enhance urinary metal excretion: transport by the renal organic anion transporter-1." Mol Pharmacol **62**(4): 921-6.
- Laird, P. W. (2005). "Cancer epigenetics." Hum Mol Genet **14 Spec No 1**: R65-76.
- Laparra, J. M., D. Velez, et al. (2006). "Cytotoxic effect of As(III) in Caco-2 cells and evaluation of its human intestinal permeability." Toxicol In Vitro **20**(5): 658-63.
- Larson, C. (1989). "Historical development of the national primary drinking water regulations." Lewis Publishers: 3-15.
- Lau, A. T., Q. Y. He, et al. (2004). "A proteome analysis of the arsenite response in cultured lung cells: evidence for in vitro oxidative stress-induced apoptosis." Biochem J **382**(Pt 2): 641-50.
- Lee, T. C., M. Oshimura, et al. (1985). "Comparison of arsenic-induced cell transformation, cytotoxicity, mutation and cytogenetic effects in Syrian hamster embryo cells in culture." Carcinogenesis **6**(10): 1421-6.
- Lee, T. C., S. F. Tzeng, et al. (1986). "Post-treatments with sodium arsenite during G2 enhance the frequency of chromosomal aberrations induced by S-dependent clastogens." Mutat Res **163**(3): 263-9.
- Li, D., P. F. Firozi, et al. (2002). "DNA adducts, genetic polymorphisms, and K-ras mutation in human pancreatic cancer." Mutat Res **513**(1-2): 37-48.
- Li, E., T. H. Bestor, et al. (1992). "Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality." Cell **69**(6): 915-26.
- Li, J. H. and T. G. Rossman (1991). "Comutagenesis of sodium arsenite with ultraviolet radiation in Chinese hamster V79 cells." Biol Met **4**(4): 197-200.
- Li, L. H., E. J. Olin, et al. (1970). "Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia." Cancer Res **30**(11): 2760-9.
- Liebler, D. C., D. S. Kling, et al. (1986). "Antioxidant protection of phospholipid bilayers by alpha-tocopherol. Control of alpha-tocopherol status and lipid peroxidation by ascorbic acid and glutathione." J Biol Chem **261**(26): 12114-9.

- Liu, Q., S. Hilsenbeck, et al. (2003). "Arsenic trioxide-induced apoptosis in myeloma cells: p53-dependent G1 or G2/M cell cycle arrest, activation of caspase-8 or caspase-9, and synergy with APO2/TRAIL." Blood **101**(10): 4078-87.
- Liu, Y., K. Z. Guyton, et al. (1996). "Differential activation of ERK, JNK/SAPK and P38/CSBP/RK map kinase family members during the cellular response to arsenite." Free Radic Biol Med **21**(6): 771-81.
- Loew, D. (1996). "Pharmacokinetics of thiamine derivatives especially of benfotiamine." Int J Clin Pharmacol Ther **34**(2): 47-50.
- Luchtrath, H. (1983). "The consequences of chronic arsenic poisoning among Moselle wine growers. Pathoanatomical investigations of post-mortem examinations performed between 1960 and 1977." J Cancer Res Clin Oncol **105**(2): 173-82.
- Lüllmann, H. (1999). Pharmakologie und Toxikologie. Stuttgart, Thieme Verlag.
- Luster, M. I., J. L. Wilmer, et al. (1995). "Role of keratinocyte-derived cytokines in chemical toxicity." Toxicol Lett **82-83**: 471-6.
- MacGregor, J. T., C. M. Wehr, et al. (1997). "'Spontaneous' genetic damage in man: evaluation of interindividual variability, relationship among markers of damage, and influence of nutritional status." Mutat Res **377**(1): 125-35.
- Malins, D. C., P. M. Johnson, et al. (2001). "Age-related radical-induced DNA damage is linked to prostate cancer." Cancer Res **61**(16): 6025-8.
- Marcus, w. (1988). "Threshold carcinogenicity using arseni as an example." Advances in modern environmental toxicology(15): 133-58.
- Martin, D. S., S. E. Willis, et al. (1990). "N-acetylcysteine in the treatment of human arsenic poisoning." J Am Board Fam Pract **3**(4): 293-6.
- Mass, M. J., A. Tennant, et al. (2001). "Methylated trivalent arsenic species are genotoxic." Chem Res Toxicol **14**(4): 355-61.
- Mestyan, I., K. Jobst, et al. (1986). "Erythrocyte transketolase activity in patients with chronic renal disease." Acta Med Hung **43**(3): 315-9.
- Miller, W. H., Jr., H. M. Schipper, et al. (2002). "Mechanisms of action of arsenic trioxide." Cancer Res **62**(14): 3893-903.
- Milner, J. E. (1969). "The effect of ingested arsenic on methylcholanthrene-induced skin tumors in mice." Arch Environ Health **18**(1): 7-11.
- Mitchell, N. and G. Stohrer (1986). "Mutagenesis originating in site-specific DNA damage." J Mol Biol **191**(2): 177-80.

- Mittal, M. and S. J. Flora (2007). "Vitamin E supplementation protects oxidative stress during arsenic and fluoride antagonism in male mice." Drug Chem Toxicol **30**(3): 263-81.
- Moore, M. M., K. Harrington-Brock, et al. (1997). "Relative genotoxic potency of arsenic and its methylated metabolites." Mutat Res **386**(3): 279-90.
- Morales, K. H., L. Ryan, et al. (2000). "Risk of internal cancers from arsenic in drinking water." Environ Health Perspect **108**(7): 655-61.
- Morgan, H. D., F. Santos, et al. (2005). "Epigenetic reprogramming in mammals." Hum Mol Genet **14 Spec No 1**: R47-58.
- Nakahara, W., F. Fukuoka, et al. (1957). "Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxide." Gan **48**(2): 129-37.
- Namgung, U. and Z. Xia (2001). "Arsenic induces apoptosis in rat cerebellar neurons via activation of JNK3 and p38 MAP kinases." Toxicol Appl Pharmacol **174**(2): 130-8.
- Neubauer, O. (1947). "Arsenical Cancer: A Review." Br J Cancer(1): 192-251.
- Niculescu, M. D. and S. H. Zeisel (2002). "Diet, methyl donors and DNA methylation: interactions between dietary folate, methionine and choline." J Nutr **132**(8 Suppl): 2333S-2335S.
- Paschen, W. (2003). "Mechanisms of neuronal cell death: diverse roles of calcium in the various subcellular compartments." Cell Calcium **34**(4-5): 305-10.
- Peplow, D. and R. Edmonds (2004). "Health risks associated with contamination of groundwater by abandoned mines near Twisp in Okanogan County, Washington, USA." Environ Geochem Health **26**(1): 69-79.
- Petrick, J. S., F. Ayala-Fierro, et al. (2000). "Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes." Toxicol Appl Pharmacol **163**(2): 203-7.
- Pi, J., Y. Kumagai, et al. (2000). "Decreased serum concentrations of nitric oxide metabolites among Chinese in an endemic area of chronic arsenic poisoning in inner Mongolia." Free Radic Biol Med **28**(7): 1137-42.
- Piccolo, G. N. L. (1972). "M. A. Thesis." Western Michigan University, Kalamazoo.
- Poirier, L. A. (2002). "The effects of diet, genetics and chemicals on toxicity and aberrant DNA methylation: an introduction." J Nutr **132**(8 Suppl): 2336S-2339S.

- Pomero, F., A. Molinar Min, et al. (2001). "Benfotiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose." Acta Diabetol **38**(3): 135-8.
- Pourahmad, J., M. Rabiei, et al. (2005). "A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for chromate and arsenite." Toxicology **206**(3): 449-60.
- Puglia, C. D. and S. R. Powell (1984). "Inhibition of cellular antioxidants: a possible mechanism of toxic cell injury." Environ Health Perspect **57**: 307-11.
- Qian, Y., V. Castranova, et al. (2003). "New perspectives in arsenic-induced cell signal transduction." J Inorg Biochem **96**(2-3): 271-8.
- Ramanathan, K., M. Anusuyadevi, et al. (2005). "Ascorbic acid and alpha-tocopherol as potent modulators of apoptosis on arsenic induced toxicity in rats." Toxicol Lett **156**(2): 297-306.
- Ramirez, P., D. A. Eastmond, et al. (1997). "Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide." Mutat Res **386**(3): 291-8.
- Ramirez, T., H. Stopper, et al. (2007). "Prevention of aneuploidy by S-adenosyl-methionine in human cells treated with sodium arsenite." Mutat Res **617**(1-2): 16-22.
- Rasmuson, A. (1985). "Mutagenic effects of some water-soluble metal compounds in a somatic eye-color test system in *Drosophila melanogaster*." Mutat Res **157**(2-3): 157-62.
- Reichard, J. F., M. Schnekenburger, et al. (2007). "Long term low-dose arsenic exposure induces loss of DNA methylation." Biochem Biophys Res Commun **352**(1): 188-92.
- Reik, W. and J. Walter (2001). "Genomic imprinting: parental influence on the genome." Nat Rev Genet **2**(1): 21-32.
- Rideout, W. M., 3rd, G. A. Coetzee, et al. (1990). "5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes." Science **249**(4974): 1288-90.
- Rossman, T. G. (1981). "Enhancement of UV-mutagenesis by low concentrations of arsenite in *E. coli*." Mutat Res **91**(3): 207-11.
- Rossman, T. G. (2003). "Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach." Mutat Res **533**(1-2): 37-65.

- Rossman, T. G., D. Stone, et al. (1980). "Absence of arsenite mutagenicity in E coli and Chinese hamster cells." Environ Mutagen **2**(3): 371-9.
- Rossman, T. G., A. N. Uddin, et al. (2004). "Evidence that arsenite acts as a cocarcinogen in skin cancer." Toxicol Appl Pharmacol **198**(3): 394-404.
- Roth, F. (1956). "[Chronic arsenic poisoning of Moselle vineyard-workers, with special reference to arsenic cancer.]." Z Krebsforsch **61**(3): 287-319.
- Schmid, S., Heidland, Schupp (2008). "Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage in vitro." Diabetes Metab Res Rev **Epub ahead of print**.
- Schwerdtle, T. (2004). "Kombinationswirkung umweltrelevanter Metallverbindungen in Lungenzellen." Abschlussbericht, Förderkennzeichen BWB 99007.
- Schwerdtle, T. (2004). "Vergleich der direkten und indirekten Gentoxizität toxischer und essentieller Metallverbindungen." GUM-Tagung, Würzburg.
- Schwerdtle, T., I. Walter, et al. (2003). "Induction of oxidative DNA damage by arsenite and its trivalent and pentavalent methylated metabolites in cultured human cells and isolated DNA." Carcinogenesis **24**(5): 967-74.
- Sciandrello, G., R. Barbaro, et al. (2002). "Early induction of genetic instability and apoptosis by arsenic in cultured Chinese hamster cells." Mutagenesis **17**(2): 99-103.
- Shelby, M. D. (1988). "The genetic toxicity of human carcinogens and its implications." Mutat Res **204**(1): 3-15.
- Shen, Z. Y., W. Y. Shen, et al. (2002). "Nitric oxide and calcium ions in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenite." World J Gastroenterol **8**(1): 40-3.
- Sies, H. (1989). "Relationship between free radicals and vitamins: an overview." Int J Vitam Nutr Res Suppl **30**: 215-23.
- Silverman, L. R. (2004). "The role of methyltransferase inhibitors in the management of the myelodysplastic syndromes." Cancer Control **11**(6 Suppl): 11-5.
- Simeonova, P. P., S. Wang, et al. (2000). "Arsenic mediates cell proliferation and gene expression in the bladder epithelium: association with activating protein-1 transactivation." Cancer Res **60**(13): 3445-53.
- Sinha, D., S. Dey, et al. (2007). "In vitro mitigation of arsenic toxicity by tea polyphenols in human lymphocytes." J Environ Pathol Toxicol Oncol **26**(3): 207-20.

- Slater, T. F. (1984). "Free-radical mechanisms in tissue injury." Biochem J **222**(1): 1-15.
- Sordo, M., L. A. Herrera, et al. (2001). "Cytotoxic and genotoxic effects of As, MMA, and DMA on leukocytes and stimulated human lymphocytes." Teratog Carcinog Mutagen **21**(4): 249-60.
- Strugger, S. (1949). Fluoreszenzmikroskopie und Biologie, Schnapper, Hannover.
- Styblo, M., L. M. Del Razo, et al. (2000). "Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells." Arch Toxicol **74**(6): 289-99.
- Sutherland, G. R. (1979). "Heritable fragile sites on human chromosomes I. Factors affecting expression in lymphocyte culture." Am J Hum Genet **31**(2): 125-35.
- Sykora, S. (2008). "Modulation of DNA polymerase beta-dependent base excision repair in cultured human cells after low dose exposure to arsenite." Toxicol Appl Pharmacol **Epub ahead of print**.
- Tang, X. H., B. Knudsen, et al. (2004). "Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice." Clin Cancer Res **10**(1 Pt 1): 301-13.
- Tchounwou, P. B., B. Wilson, et al. (1999). "Important considerations in the development of public health advisories for arsenic and arsenic-containing compounds in drinking water." Rev Environ Health **14**(4): 211-29.
- Thomas, D. J., M. Styblo, et al. (2001). "The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic." Toxicol Appl Pharmacol **176**(2): 127-44.
- Thompson, D. J. (1993). "A chemical hypothesis for arsenic methylation in mammals." Chem Biol Interact **88**(2-3): 89-14.
- Tice, R. R., E. Agurell, et al. (2000). "Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing." Environ Mol Mutagen **35**(3): 206-21.
- Tinwell, H., S. C. Stephens, et al. (1991). "Arsenite as the probable active species in the human carcinogenicity of arsenic: mouse micronucleus assays on Na and K arsenite, orpiment, and Fowler's solution." Environ Health Perspect **95**: 205-10.
- Tirouvanziam, R., C. K. Conrad, et al. (2006). "High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(12): 4628-33.



- Tomatis, L., A. Aitio, et al. (1989). "Human carcinogens so far identified." Jpn J Cancer Res **80**(9): 795-807.
- Traber, M. G., B. Frei, et al. (2008). "Vitamin E revisited: do new data validate benefits for chronic disease prevention?" Curr Opin Lipidol **19**(1): 30-8.
- Tseng, W. P., H. M. Chu, et al. (1968). "Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan." J Natl Cancer Inst **40**(3): 453-63.
- Vahter, M. (1981). "Biotransformation of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice and rats." Environ Res **25**(2): 286-93.
- Vahter, M. (1994). "Species differences in the metabolism of arsenic." Arsenic Exposure and Health, Science and Technology Letters: 171-79.
- Vahter, M. and G. Concha (2001). "Role of metabolism in arsenic toxicity." Pharmacol Toxicol **89**(1): 1-5.
- Valko, M., C. J. Rhodes, et al. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact **160**(1): 1-40.
- Vega, L., M. E. Gonsebatt, et al. (1995). "Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: an individual susceptibility effect detected." Mutat Res **334**(3): 365-73.
- Vered, M., N. Yarom, et al. (2005). "4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations." Oral Oncol **41**(4): 337-9.
- Vignais, P. V. (2002). "The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism." Cell Mol Life Sci **59**(9): 1428-59.
- Von Hoff, D. D., M. Slavik, et al. (1976). "5-Azacytidine. A new anticancer drug with effectiveness in acute myelogenous leukemia." Ann Intern Med **85**(2): 237-45.
- Wallenius, K. and U. Lekholm (1973). "Oral cancer in rats induced by the water-soluble carcinogen 4-nitrochinoline N-oxide." Odontol Revy **24**(1): 39-48.
- Walter, I., T. Schwerdtle, et al. (2007). "Impact of arsenite and its methylated metabolites on PARP-1 activity, PARP-1 gene expression and poly(ADP-ribose)ation in cultured human cells." DNA Repair (Amst) **6**(1): 61-70.
- Wang, T. S., T. Y. Hsu, et al. (2001). "Arsenite induces oxidative DNA adducts and DNA-protein cross-links in mammalian cells." Free Radic Biol Med **31**(3): 321-30.
- Wiencke, J. K., J. W. Yager, et al. (1997). "Study of arsenic mutagenesis using the plasmid shuttle vector pZ189 propagated in DNA repair proficient human cells." Mutat Res **386**(3): 335-44.

- 
- Willson, R. L. (1983). "Free radical protection: why vitamin E, not vitamin C, beta-carotene or glutathione?" Ciba Found Symp **101**: 19-44.
- Woelk, H., S. Lehl, et al. (1998). "Benfotiamine in treatment of alcoholic polyneuropathy: an 8-week randomized controlled study (BAP I Study)." Alcohol Alcohol **33**(6): 631-8.
- Yamanaka, K., H. Hayashi, et al. (1997). "Metabolic methylation is a possible genotoxicity-enhancing process of inorganic arsenics." Mutat Res **394**(1-3): 95-101.
- Yih, L. H., S. W. Hsueh, et al. (2005). "Arsenite induces prominent mitotic arrest via inhibition of G2 checkpoint activation in CGL-2 cells." Carcinogenesis **26**(1): 53-63.
- Yih, L. H. and T. C. Lee (1999). "Effects of exposure protocols on induction of kinetochore-plus and -minus micronuclei by arsenite in diploid human fibroblasts." Mutat Res **440**(1): 75-82.
- Ziment, I. (1988). "Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic." Biomed Pharmacother **42**(8): 513-9.

## **8. Danksagung**

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von April 2004 bis Mai 2008 am Institut für Toxikologie der bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Frau Prof. Dr. H. Stopper angefertigt, der ich für die professionelle Betreuung und für das mir entgegengebrachte Vertrauen zu großem Dank verpflichtet bin.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern des 2. Stockes für das stets freundliche und kollegiale Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt dabei Herrn Michael Kessler und Frau Maria Scheurich, die mir bei Problemen immer fachlich kompetente Hilfestellung und auch sonst immer die Zeit für viele wertvolle und hilfreiche Gespräche fanden.



## 9. Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Name: Dr. med. René Jonas

Anschrift: Am Steingraben 41, 97456 Dittelbrunn

Telefon: Festnetz: 09721 45809  
Mobil: 0179 912 90 40

E-Mail: [drjonas@kabelmail.de](mailto:drjonas@kabelmail.de)

Geburtsdatum / Ort: 10. Mai 1977 / Werneck

Familienstand: Ledig

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Eltern (Name / Beruf): Josef Jonas / Leitender Angestellter  
Olga Jonas, geb. Göb / Hausfrau

Geschwister: Schwester Verena Jonas

### **Kurzprofil**

Berufsziel: ab 01.06.2008 Weiterbildung zum Facharzt für Mund-, Kiefer- und Gesichts-Chirurgen am Klinikum der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

Studiums-Anford./ Erfüllungsgrad: Doppelapprobation in Human- und Zahnmedizin  
→ Studium Humanmedizin abgeschlossen im Mai 2004  
→ Studium Zahnmedizin: abgeschlossen in April 2008

Promotionen: Promotion zum Dr. med. 12/2004. Seit 04/2004 experimentelle Arbeit an der Dissertation zur Erlangung des zahnmedizinischen Doktorgrades.

### **Schulbildung**

09/1983 – 07/1987 Grundschule in Dittelbrunn

09/1987 – 07/1996 Walther-Rathenau-Gymnasium, Schweinfurt  
Abschluss Abitur mit Gesamtnote: 1,7

### **Zivildienst**

- 10/1996 – 05/1997 Koch und Hausmeister im Kindergarten Dittelbrunn
- 06/1997 – 10/1997 Pflegedienst im Kreiskrankenhaus Werneck

### **Studium**

- 04/1998 – 02/2000 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, Abschluss Physikum
- 04/2000 – 02/2001 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg; Klinikum; Abschluss 1. Staatsexamen
- 04/2001 – 02/2003 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg; Klinikum Abschluss 2. Staatsexamen
- 04/2003 – 03/2004 Praktisches Jahr an Ausbildungskrankenhäusern der Julius-Maximilians-Universität Würzburg:  
1. Tertial: Psychiatrie  
2. Tertial: Chirurgie  
3. Tertial: Innere Medizin  
Abschluß 3. Staatsexamen (Gesamtnote: Gut)
- 04/2004 – 10/2004 Forschungssemester am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
- 10/2004 – 02/2008 Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
- 02-2008-04-2008 Staatsexamen Zahnmedizin (Gesamtnote: Sehr Gut)

### **Dissertationen**

- 04/2001 – 12/2004 Promotion zum Dr. med. mit experimenteller Arbeit „Toxizität und Gentoxizität von Phytohormonen und deren Metaboliten“ am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg mit der Gesamtnote „Magna Cum Laude“.
- 04/2004 – 02-2008 Experimentelle Arbeit an der Dissertation „Arseninduzierte Zyto- und Gentoxizität sowie deren Modulation“ am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizinischen Fakultät. Das Rigorosum wird im Anschluss an das Staatsexamen Zahnmedizin stattfinden.

### **Publikationen**

Buchbeitrag zum Kapitel „Genotoxicity of phytoestrogens“ (Stopper, Jonas, Schmitt) in „Natural and Synthetic Estrogens: Aspects of the Cellular and Molecular Activity“. Editors: Dopp, Stopper, Gerrit, Alink; 2002, p89-101

Schmitt E., Metzler M., Jonas R., Dekant W., Stopper H., (2003) Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein, Mutation Research, 542(1-2):43-8

### **Praktika / Famulatur**

- |                   |   |
|-------------------|---|
| 09/1993 – 07/1994 | Schülerforschungsprojekt im Fachbereich „Biologie“ mit Teilnahme bei „Jugend forscht“                               |
| 06/1997 – 10/1997 | 5-monatiges Pflegepraktikum am Kreiskrankenhaus Werneck (siehe auch unter Zivildienst)                              |
| 08/2000 – 10/2000 | 2-monatige Famulatur auf der chirurgischen Abteilung am Krankenhaus St. Josef, Schweinfurt                          |
| 02/2002 – 04/2002 | 2-monatige Famulatur an urologischer Praxis in Schweinfurt  |
| 07/2002 – 08/2002 | 14-tägige Famulatur auf der chirurgischen und viszeralchirurgischen Abteilung am Krankenhaus St. Josef, Schweinfurt |









